

Vom Forschungszentrum Borstel
Direktor: Prof. Dr. Stefan Ehlers
Aus dem Programmbereich Infektionen
Programmdirektor: Prof. Dr. Ulrich Schaible

Forschungsgruppe Biophysik
Prof. Dr. Thomas Gutschmann

Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen dem bakteriellen Protein VapA und der Phagosomenmembran an Modellmembransystemen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

vorgelegt von

Christian Nehls

aus Hamburg

Lübeck 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Gutschmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Hübner

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2016

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 18.07.2016

Für Florentina und Frederico

Wir müssen davon überzeugt sein, dass das Wahre die Natur hat,
durchzudringen, wenn seine Zeit gekommen, und dass es nur
erscheint, wenn diese gekommen, und deswegen nie zu früh erscheint,
noch ein unreifes Publikum findet.

- *Georg Friedrich Wilhelm Hegel*

Kurzdarstellung

Um sich einer Infektion durch bakterielle Krankheitserreger zu erwehren, verfügt das menschliche Immunsystem über eine Vielzahl potenter Abwehrmechanismen. Hierzu gehört die Phagozytose der Krankheitserreger durch professionelle Phagozyten, durch die als neues Zellkompartiment das Phagosom gebildet wird. Die Phagosomenreifung besteht aus einer Reihe von fusionsähnlichen Prozessen mit Lysosomen beziehungsweise Endosomen [Desjardins et al., 1994b], die zur Bildung des Phagolysosoms und schließlich zur Zerstörung des eingeschlossenen Krankheitserregers führen. Intrazelluläre Krankheitserreger haben eine Reihe unterschiedlicher Strategien entwickelt, die es ihnen ermöglichen, die Zerstörung durch die Phagosomenreifung zu vermeiden [Haas, 2007; Scott et al., 2003]. Eine Gruppe verwendet das umgebende Phagosom als Nische zur Unterwanderung des Immunsystems und stellt damit eine Bedrohung für die menschliche Gesundheit dar. Der intrazelluläre Krankheitserreger *Rhodococcus equi* (*R. equi*) schafft es, die Phagosomenreifung zu überleben, indem er Phagosomen in einem präphagolysosomal Zustand hält [Fernandez-Mora et al., 2005; von Bargen und Haas, 2009]. Das virulenz-assoziierte Protein A (VapA) von *R. equi* trägt zu diesem Prozess bei [Jain et al., 2003]. Unter Verwendung von rekonstituierten Membranen als Modellsystem befasst sich die vorliegende Arbeit mit dem zugrundeliegenden Wirkmechanismus von VapA an der Phagosomenmembran.

Biosensormessungen zeigten eine Bindung von VapA an die Modellmembranen, die mit einem Anstieg der Membranrigidität einherging. Beide Effekte waren deutlich von dem Anteil negativ geladener Lipide in der Membran abhängig. Gegenüber gängigen porenbildenden Molekülen trat für VapA nur eine schwache Interkalation in die Modellmembranen auf, die von der lateralen Membranspannung abhängig war. Eine starke Aggregation von VapA auf cholesterolarmen Lipidomänen wurde durch rasterkraftmikroskopische Messungen aufgeklärt. Diese führte zu einer Reorganisation der Domänenstruktur der Membran. Zur Erklärung der beobachteten Effekte werden für VapA zwei unterschiedliche Interaktionszustände postuliert, die von der Packungsdichte der Lipide, der Lipidzusammensetzung und dem pH-Wert abhängen. Mit elektrophysiologischen Messungen an freistehenden Membranen konnten definierte und undefinierte Läsionen beobachtet und charakterisiert werden, die zu einem Permeabilitätsanstieg der Membranen und schließlich zur Zerstörung der Membranintegrität führten. Dies deutet darauf hin, dass die Permeabilisierung einen Austausch von Protonen und Ionen über die Phagosomenmembran ermöglicht, der der Ansäuerung des Phagosoms, einem wichtigen Prozess der Phagosomenreifung, entgegenwirkt. Darüber hinaus wurde experimentell gezeigt, dass die Permeabilisierung durch eine fortschreitende Ansäuerung verstärkt wird. Auf der Grundlage der Experimente konnte ein fünfstufiger Wirkmechanismus für VapA vorgeschlagen werden.

Zusammenfassend legen die Daten nahe, dass die Wechselwirkung zwischen VapA und der Phagosomenmembran mehreren essentiellen Mechanismen der Phagosomenreifung entgegenwirkt. Dies könnte es *R. equi* ermöglichen, innerhalb des Phagosoms zu überleben, was wiederum zur intrazellulären Vermehrung des Bakteriums und schließlich zur Nekrose des Phagozyten führen könnte.

Abstract

The human immune system has a large number of potent defence mechanisms to resist bacterial infections. One of them is phagocytosis of pathogens by professional phagocytes leading to the formation of phagosomes. The phagosome maturation, a series of fusion or ‘kiss-and-run’ processes with lysosomes and endosomes [Desjardins et al., 1994b], leads to the formation of phagolysosomes and finally to the destruction of the ingested pathogens. Intracellular pathogens manage to avoid the destruction by phagosome maturation by a variety of different strategies [Haas, 2007; Scott et al., 2003]. One group of these parasites use the surrounding phagosome as a niche to evade the immune system and thus represent a threat for human health. The intracellular pathogen *Rhodococcus equi* (*R. equi*) manages to survive the phagosome maturation by arresting phagosomes in a prephagolysosomal state [Fernandez-Mora et al., 2005; von Bargen und Haas, 2009]. The rhodococcal virulence-associated protein A (VapA) contributes to this process [Jain et al., 2003]. In this thesis the underlying mode of action of VapA at the phagosome membrane was addressed using reconstituted membranes as a model system.

Biosensor experiments indicated a binding of VapA to model membranes being accompanied by an increase of membrane rigidity. These effects depended on the content of negatively charged lipids of the lipid composition. In contrast to common pore-forming molecules only a weak intercalation into model membranes dependent on the lateral membrane pressure occurred. Atomic force microscopic analysis revealed a strong aggregation of VapA on cholesterol-poor lipid domains. This induced a reorganization of the domain structure of the membrane. Two different interaction mechanisms that can be distinguished by the protein conformation can be postulated for VapA which depend on lipid package, lipid composition and pH value. Defined and undefined lesions increasing the permeability of the reconstituted membranes and finally the induction of membrane disintegration by VapA were observed and characterized using electrophysiological measurements on freestanding model membranes. This suggests that the permeabilisation allows an exchange of protons and ions across the phagosome membrane working against the acidification of the phagosome which represents an important mechanism of phagosome maturation. In addition, in this thesis it could be shown that the permeabilisation is increased by a progressing acidification. Based on these experiments a five-step mode of action for VapA could be suggested.

In conclusion, the results indicate that the interaction between VapA and the phagosome membrane works contrary to several essential increments of phagosome maturation. This may allow *R. equi* to survive inside the phagosome, leading to intracellular multiplication of the bacterium and finally to necrosis of the phagocyte.

Inhaltsverzeichnis

Kurzdarstellung	ix
Abstract	xi
1 Einleitung	1
2 Die Modellmembran als biophysikalisches Instrument	3
2.1 Die Thermodynamik und das Leben	4
2.2 Lipide und der Prozess der Selbstaggregation	5
2.3 Entwicklung des Membranmodells	7
2.4 Struktur und mechanische Eigenschaften von Membranen	9
2.5 Mobilität von Membrankomponenten	12
2.6 Elektrische Eigenschaften von Membranen	13
2.7 Membrandomänen	18
2.8 Membranfusionen	21
2.9 Die Diversität biologischer Membranen	23
2.10 Biophysikalische Untersuchungen an Modellmembranen	25
3 <i>Rhodococcus equi</i> und die Phagosomenreifung	31
3.1 Abwehrmechanismen des Körpers	32
3.2 Die Entstehung des Phagosoms durch Phagozytose	34
3.3 Phagosomenreifung	37
3.4 Die Unterwanderung der Phagosomenreifung durch intrazelluläre Pathogene	40
3.5 <i>Rhodococcus equi</i> als intrazelluläres Pathogen	42
3.6 Das virulenz-assoziierte Protein A von <i>Rhodococcus equi</i>	44
4 Material und Methoden	47
4.1 Puffersysteme	49
4.2 Membranlipide	50
4.3 VapA	51
4.3.1 Rekombinante Aufreinigung von VapA	52
4.3.2 Prozessierung von VapA	53
4.4 LL-32 als Vergleichssubstanz zu VapA	54
4.5 Präparation der Lipidsysteme	54
4.5.1 Präparation chloroformischer Lipidlösungen	54
4.5.2 Präparation kleiner Vesikel	55
4.5.3 Präparation festkörperunterstützter Bilayer	55
4.5.4 Präparation von Langmuir-Blodgett-Filmen	57
4.6 Biosensor auf Basis von oberflächennah geführten Volumenwellen	58
4.6.1 Versuchsaufbau und Durchführung der Biosensormessungen	61

4.7	Fluoreszenzspektroskopische Analysen	63
4.7.1	Messaufbau und Durchführung der spektroskopischen Messungen	65
4.8	Messungen an der Filmwaage	67
4.8.1	Messaufbau und Durchführung der Filmwaagenmessungen	69
4.9	Rasterkraftmikroskopie	70
4.9.1	Messaufbau und Durchführung der rasterkraftmikroskopischen Messungen an Monolayern	73
4.9.2	Durchführung der rasterkraftmikroskopischen Messungen an Bilayern	75
4.10	Elektrophysiologie an freistehenden Bilayern	75
4.10.1	Versuchsaufbau und Durchführung der elektrophysiologischen Messungen	77
5	Ergebnisse	81
5.1	Bindungsmessungen an festkörperunterstützten Membranen mit dem Biosensor	82
5.1.1	Bindung von VapA an neutrale und negativ geladene Membranen und Einfluss auf deren Viskosität	82
5.1.2	Bindung von VapA an Membranen und Einfluss auf deren Viskosität bei verschiedenen pH-Werten	84
5.2	Fluoreszenzspektroskopische FRET-Messungen	86
5.2.1	Interkalation von VapA in kleine Vesikel	87
5.2.2	Induktion von Vesikelfusionen durch VapA	88
5.3	Messungen an der Filmwaage	89
5.3.1	Einbau von VapA in Lipidmonolayer in Abhängigkeit vom Lateraldruck	90
5.4	Rasterkraftmikroskopische Messungen an Monolayern	90
5.4.1	Wechselwirkung von VapA mit Monolayern in Abhängigkeit vom Lateraldruck	92
5.4.2	Zeit- und konzentrationsabhängige Wechselwirkung von VapA mit Monolayern	95
5.4.3	Wechselwirkung von VapA mit negativ geladenen Monolayern	98
5.5	Rasterkraftmikroskopische Messungen an Bilayern	100
5.5.1	Wechselwirkung von VapA mit ungeladenen Bilayern	101
5.5.2	Wechselwirkung von VapA mit ungeladenen Bilayern bei reduziertem pH-Wert	103
5.6	Elektrophysiologische Untersuchungen an freistehenden Membranen	105
5.6.1	Einfluss von VapA auf die Kapazität freistehender Membranen	106
5.6.2	Permeabilisierung freistehender Membranen durch VapA	106
5.6.3	Permeabilisierung freistehender Membranen durch VapA bei verschiedenen pH-Werten	110
5.6.4	Permeabilisierung freistehender Membranen durch VapA p12	113
5.6.5	Permeabilisierung freistehender Membranen durch VapB	114
5.6.6	Porendurchmesser definierter Läsionen	118
6	Diskussion	121
6.1	Die Bindung von VapA an Modellmembranen und deren Rigidisierung	122
6.2	Die Interkalation von VapA in Modellmembranen	126
6.3	Die Organisation von VapA an Modellmembranen	129

6.4	Die VapA vermittelte Permeabilisierung von Modellmembranen	137
6.5	Zusammenfassung und Ausblick: Der Wirkmechanismus von VapA	146
6.6	Schlussbemerkung	153
	Literaturverzeichnis	155
	Abbildungsverzeichnis	189
	Tabellenverzeichnis	193
	Abkürzungen	195
	Symbole und Konstanten	199
	Anhang	xvii
	Danksagung	xviii
	Publikationen, Vorträge und Poster	xxi

Kapitel 1

Einleitung

Die Funktionsfähigkeit des menschlichen Organismus hängt wesentlich davon ab, ob er in der Lage ist, sich der Bedrohung durch Krankheitserreger, der er ständig ausgesetzt ist, zu widersetzen. Zu diesem Zweck haben im Laufe der Evolution mehrzellige Organismen ein Immunsystem entwickelt. Unser Wissen über das Immunsystem ist mittlerweile so weitreichend, dass viele Lehrbücher davon gefüllt werden können. Andererseits jedoch ist es so gering, dass der Großteil der zugrundeliegenden Prozesse noch nicht verstanden wird und wir vielen Krankheiten ratlos gegenüberstehen. Es wird Jahrzehnte oder Jahrhunderte der Forschung kosten, um adäquate Gegenmittel zu finden, wohingegen durch Mutationen und Weiterentwicklung ständig neue Krankheitserreger entstehen.

Eine Gruppe der vielfältigen spezialisierten Zellen unseres Immunsystems bilden die professionellen Fresszellen oder Phagozyten, zu deren wichtigsten Funktionen die Erkennung körperfremder Mikroorganismen und deren Phagozytose gehört. Durch diesen Prozess werden Krankheitserreger in die Phagozyten aufgenommen. Dabei entsteht ein neues Zellkompartiment, das Phagosom, welches fortan den Krankheitserreger umgibt. Die Bildung des Phagosoms initiiert einen Prozess, der Phagosomenreifung genannt wird. In dessen Verlauf werden sowohl die Zusammensetzung der Phagosomenmembran als auch des phagosomalen Lumens durch fortlaufende Fusionsereignisse und Austausch mit vesikelartigen Kompartimenten des Phagozyten moduliert. Eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle und Prozesse trägt dazu bei, dass schließlich der Mikroorganismus abgetötet und zersetzt wird. Essentiell sind dabei vor allem die fortlaufende Ansäuerung des Phagosoms und die Mitwirkung von körpereigenen Peptiden der Immunabwehr. Die so hergestellten Fragmente des Bakteriums können wiederum auf der Oberfläche der Fresszelle als Antigene präsentiert werden, um weitere Immunzellen zu aktivieren.

Einige Bakterien haben sich allerdings an den Prozess der Phagosomenreifung angepasst und Mechanismen entwickelt, um der Zersetzung im Phagosom zu entgehen. Zu diesen gehört das fakultativ intrazelluläre Bakterium *Rhodococcus equi* (*R. equi*), das vor allem junge oder immunschwache Pferde befällt [Prescott, 1991; Hondalus, 1997]. Ist es im Normalfall für Menschen ungefährlich, so kommt es doch bei immunschwachen Individuen zu schweren, tuberkuloseähnlichen Krankheitsverläufen [Prescott, 1991; Giles et al., 2014]. In das Phagosom aufgenommen ist *R. equi* in der Lage, die Ansäuerung des Phagosoms und die Aufnahme von speziellen Proteinen in die Phagosomenmembran zu verhindern und so die Phagosomenreifung zu seinen Gunsten zu manipulieren [Fernandez-Mora et al., 2005; von Bargen und Haas, 2009]. Dadurch kann *R. equi* innerhalb des Phagosoms überleben und sich vermehren [Hondalus und Mosser, 1994].

Bei diesem Prozess ist ihm insbesondere ein Protein behilflich, das virulenz-assoziierte Protein A (VapA). Dieses ist sowohl für das Überleben des Bakteriums im Phagosom [Jain et al., 2003] als auch für die Verhinderung der Ansäuerung notwendig [Jain et al.,

2003]. Eine Wechselwirkung des Proteins mit der Phagosomenmembran ist in diesem Zusammenhang eine naheliegende Erklärung. Da die Struktur von VapA aber keinem bekannten Protein ähnelt, konnten über dessen Wirkmechanismus bisher nur wenige Vorhersagen angestellt werden [Geerds et al., 2014].

Möchte man sich der Frage annehmen, auf welche Weise VapA und die Phagosomenmembran interagieren, so ist ein das mögliches Verständnis limitierender Faktor die außerordentliche Komplexität biologischer Membranen und der fortlaufend modulierten Phagosomenmembran im Speziellen. Auch erfordert eine konsequente Erforschung molekularer Prozesse und deren Verknüpfungen die Kontrolle vieler Umgebungsbedingungen. Daher ist es in diesem Fall zweckmäßig, den Schauplatz des Geschehens aus seiner natürlichen Umgebung zu entfernen und ihn, reduziert auf seine wichtigsten Bestandteile, in die kontrollierte Umgebung eines Modellsystems zu verlegen. Als ausgezeichnetes Werkzeug für die Untersuchung von Vorgängen an Membranen haben sich rekonstituierte Modellmembranen erwiesen. Durch die Reduzierung der Anzahl der Membranlipide und die Kontrollierbarkeit verschiedener Membraneigenschaften ermöglichen sie die Beantwortung von Fragestellungen an komplexe Prozesse auf molekularer Ebene. Durch sukzessive Erhöhung der Komplexität lässt sich das Modell schließlich wieder dem natürlichen System annähern. Ein weiterer Vorteil der Modellmembranen ist ihre durch unterschiedliche Rekonstitutionsmethoden nahezu universelle Zugänglichkeit für die Untersuchung mit physikalischen Methoden.

Hiermit lässt sich als Ziel der vorliegenden Arbeit formulieren, den Wirkmechanismus des Proteins VapA an Modellmembranen zu untersuchen, um Hinweise auf dessen Funktion während der Phagosomenreifung zu sammeln und damit einen Beitrag zu der Frage zu erbringen, wie es *R. equi* möglich ist, im Phagosom zu überleben.

Kapitel 2

Die Modellmembran als biophysikalisches Instrument

Sämtliche auf der Erde existierende Lebewesen werden, einem Vorschlag von Woese et al. [1990] folgend in die drei Domänen Archaeen, Bakterien und Eukaryoten eingeteilt. Diese beherbergen nach Schätzungen 13 - 20 Millionen unterschiedlicher Arten, von denen 1,5 bis 1,7 Millionen bekannt sind [Cracraft, 2002]. Sie alle haben eines gemeinsam: die Biomembran als Abgrenzung der Zellen gegen die Umgebung, als Abgrenzung von lebendem Raum gegen toten Raum.

Um die Frage nach der Wechselwirkung zwischen VapA und der Phagosomenmembran beantworten zu können, werden in diesem Kapitel zunächst die im späteren Verlauf zum Verständnis notwendigen Eigenschaften von biologischen Membranen und Modellmembranen behandelt.

Abschnitt 2.1 gibt eine kurze Zusammenfassung ausgewählter thermodynamischer Zusammenhänge, die die Existenz von Lipidmembranen und letztendlich von lebenden Strukturen beschreiben und ermöglichen. Der daraus folgende Prozess der Selbstaggregation von Lipidmolekülen sowie die Beschreibung einiger Membranlipide werden in Abschnitt 2.2 behandelt. Abschnitt 2.3 gibt einen historischen Abriss der Entwicklung unseres heutigen Membranmodells und nennt die wesentlichen charakterisierenden Eigenschaften biologischer Membranen, die dann in den folgenden Abschnitten vertieft werden. Zunächst werden in Abschnitt 2.4 in die mechanischen Eigenschaften von Membranen eingeführt. Hierbei geht es um den Packungsparameter, Membrankrümmung und den Lateraldruck, die in enger Verknüpfung mit wesentlichen Funktionen eines Membransystems stehen. Hierzu gehört auch die Mobilität der Membrankomponenten, die den Inhalt von Abschnitt 2.5 bildet. Elektrische Eigenschaften von Membranen wie die Membrankapazität und das Membranpotential werden in Abschnitt 2.6 erläutert. Sie beschreiben die Funktion der Membran als Barriere zur Aufrechterhaltung von Ionen- und anderen Gradienten. Die Eigenschaften unterschiedlicher Lipidphasen und das Prinzip von deren Organisation in Membrandomänen werden in Abschnitt 2.7 behandelt, gefolgt von einer kurzen Zusammenstellung relevanter Aspekte von Membranfusionen in Abschnitt 2.8, welche eine gesonderte Rolle für die Prozesse der Phagozytose und Phagosomenreifung spielen. In Abschnitt 2.9 wird dann auf die Diversität und Komplexität von biologischen Membranen eingegangen. Warum rekonstituierte Membranen ein geeignetes System sind, um diese Komplexität verstehen zu lernen, wird schließlich in Abschnitt 2.10 anhand von Vor- und Nachteilen erläutert. Darüber hinaus werden hier die in dieser Arbeit verwendeten Rekonstitutionssysteme vorgestellt.

2.1 Die Thermodynamik und das Leben

Die Thermodynamik mit den vier Hauptsätzen bildet eine eigenständige Theorie zur Beschreibung von Prozessen in physikalischen Vielteilchensystemen. Sie erschließt den Zusammenhang zwischen den ein System beschreibenden Zustandsgrößen und den Prozessgrößen, welche zu Änderungen des Systemzustands führen. Dabei lassen sich Zustandsgrößen auch als Energieanteile und Prozessgrößen als Energieformen verstehen, sodass die Bilanzgleichungen der Thermodynamik den Charakter von Energiesätzen erhalten [Fleischer, 2008]. Dies wird plausibel durch die Interpretation des ersten Hauptsatzes der Thermodynamik

$$U_2 - U_1 = Q + W \quad (2.1)$$

als Energieerhaltungssatz für abgeschlossene Systeme¹. Für abgeschlossene Systeme ist diese Summe als Konsequenz der Unmöglichkeit, Energie zu erzeugen oder zu vernichten, immer gleich Null [Planck, 1922, S. 39 f.]. Wie Planck treffend bemerkte, existieren in der Natur allerdings keine komplett abgeschlossenen Systeme. Der zweite Hauptsatz der Thermodynamik erweitert die Eingrenzung der ein System betreffenden Prozesse um einen wesentlichen Aspekt, nämlich die mögliche Richtung dieser Prozesse [Planck, 1922, S. 70]. Rudolf Clausius arbeitete heraus, dass eine Zustandsgröße - die Entropie - existieren muss, welche unter Veränderungen eines Systems entweder konstant bleibt oder ansteigt. Die Entropie S wird im Allgemeinen als Unordnung eines Systems verstanden. Clausius' Formulierung des zweiten Hauptsatzes

$$dS \geq \frac{\partial Q}{T} \quad (2.2)$$

liefert ein Kriterium dafür, ob ein ablaufender Prozess reversibel oder irreversibel ist, wobei die Gleichheit ausschließlich für den idealen Grenzfall eines reversiblen Prozesses gilt [Houlsby und Puzrin, 2000; Planck, 1922, S. 91]. Die Ungleichung wurde schließlich durch Einführung der dissipierten Arbeit W_{diss} zu folgender Gleichung konkretisiert [Houlsby und Puzrin, 2000]:

$$dS = \frac{\partial Q}{T} + \frac{\partial W_{diss}}{T}. \quad (2.3)$$

Hier gibt der letzte Term, die definitionsgemäß niemals negative Entropieerzeugung, den Grad der Irreversibilität eines Prozesses an [Fleischer, 2008]. Die Energie eines Systems wird durch irreversible Prozesse also abgewertet. Ob der im zweiten Hauptsatz der Thermodynamik enthaltene universelle Anstieg der Entropie als Zeitpfeil verstanden werden kann und damit die Asymmetrie der Zeit ausmacht, ist sowohl in der Physik als auch in der Wissenschaftsphilosophie stark umstritten [Schneider, 1994; Uffink, 2001]².

In seinem Werk über die Natur des Lebens wies Schrödinger [1944, S. 25] darauf hin, dass lebende Systeme auf den ersten Blick den zweiten Hauptsatz der Thermodynamik verletzen. Sie erzeugen Ordnung nicht nur aus Ordnung, sondern auch aus Unordnung.

¹Die Änderung der inneren Energie U eines Systems ist also gleich der Summe aus dem System von außen zugeführter Wärme Q und Arbeit W [Planck, 1922, S. 39].

²Es wird sogar diskutiert, ob der zweite Hauptsatz das Wesen der Zeit an sich erklären könnte [Uffink, 2001].

Den thermodynamisch begründeten allmählichen Gewinn an Entropie verstand er als dem Leben an sich entgegenwirkend. Lebenserhaltende Funktionen von Organismen erklärte er durch eine ständige Aufnahme negativer Entropie aus der Umgebung: „Die Essenz des Metabolismus ist, dass der Organismus es schafft, sich von all der Entropie zu befreien, gegen deren Produktion er sich nicht wehren kann, solange er am Leben ist“ [Schrödinger, 1944, S. 26]. Schneider [1994] führt aus, dass lebende Systeme Gradienten schaffen, welche sie fern des thermodynamischen Gleichgewichtszustandes halten. Er bezeichnet die Notwendigkeit eines lebenden Systems, den extern anliegenden Gradienten und damit der Erhöhung ihrer Entropie entgegenzuwirken³, als thermodynamischen Imperativ. Systeme, welche fern des Gleichgewichtszustands durch Dissipation oder Verwertung von Energie eine geordnete Struktur aufrechterhalten oder sogar den Grad der Ordnung weiter erhöhen, werden nach Prigogine und Nicolis [1971] - erstgenannter war ein Schüler von Schrödinger - als dissipative Strukturen bezeichnet. Durch die Dissipation wird die Entropie des umgebenden Systems erhöht, wodurch der zweite Hauptsatz unverletzt bleibt. Diesem Prinzip wiederum wirken Fluktuationen der umgebenden Bedingungen entgegen. Schließlich interpretiert Schneider [1994] lebende Systeme als dynamische dissipative Strukturen, welche mit einer in der DNA kodierten Erinnerung ausgestattet sind, sodass die dissipativen Systeme zeitlich aufrechterhalten werden.

Als Grundeinheiten des Lebens sind Zellen im Sinn des zweiten Hauptsatzes hochgeordnete, thermodynamisch offene Systeme. Die beliebteste als Beispiel für die Ordnung in lebenden Systemen angeführte Untereinheit stellt das Genom mit seinem epigenetischen, genregulatorischen Netzwerk dar [Macklem und Seely, 2010]. Eine weitere an Bedeutung nicht zu unterschätzende Unterstruktur der Zellen sind die sie umgebenden und kompartimentierenden Membransysteme, welche als dissipative Strukturen verstanden werden können [Blumenthal et al., 1970]. Unabhängig von der Debatte, ob sich das Cytoplasma zu Beginn der Evolution lebender Strukturen ausserhalb oder innerhalb („Cytoplasma aussen“ oder „Cytoplasma innen“ Modell) der Membransysteme gebildet hat, war doch in jedem Fall sowohl die Existenz von Vesikeln oder Lipidsystemen als auch das Vorliegen von Protein- und Lipid-synthetisierenden Ribosomen im frühen Cytoplasma für die Entwicklung von Protozellen notwendig [Griffiths, 2007].

2.2 Lipide und der Prozess der Selbstaggregation

Lipide können eingeteilt werden in Fettsäuren, Glycerolipide, Phosphoglycerolipide, Sphingolipide, Steroide, Prenollipide, Saccharolipide und Polyketide [Fahy et al., 2005]. Sie werden von Prokaryoten und eukaryotischen Zellen in einer kaum überschaubaren Heterogenität synthetisiert. Funktionell sind sie zuständig für Energiespeicherung, Signaltransduktion und molekulare Erkennungsprozesse, außerdem stellen membranbildende Lipide die Hauptbestandteile biologischer Membranen dar [van Meer et al., 2008].

Zu den membranbildenden Lipiden werden Glycerolipide, Phosphoglycerolipide und Sphingolipide gezählt⁴. Diese bestehen aus einer Plattform beziehungsweise Kopfgruppe und einer oder mehreren Kohlenwasserstoffketten, auch Fettsäureketten genannt. Eine

³Als bedeutensten Gradienten sieht Schneider [1994] die Temperaturdifferenz zwischen Erde und Sonne: auf einer großen Zeitskala bewege sich das System zu einem Temperatenausgleich und damit zu einer Maximierung der Entropie.

⁴Als nicht membranbildende Lipide fungieren zudem einige Steroide in Membranen als Domänenbildner.

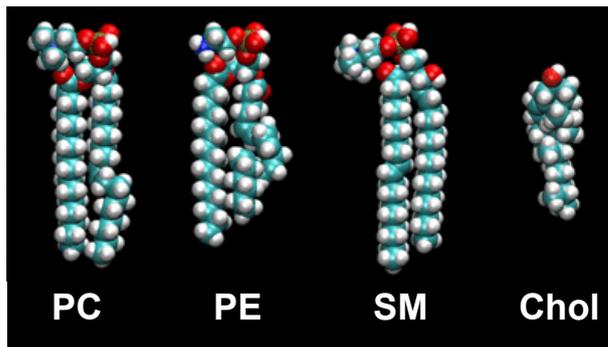


Abbildung 2.1

Darstellung der Strukturen gängiger Membranlipide eukaryotischer Zellen im Kollotenmodell. Ungesättigtes Phosphatidylcholin (PC) führt zu fluiden Membranen, Phosphatidylethanolamin (PE) erzeugt aufgrund der kleinen Kopfgruppe negativen Krümmungsstress. Sphingomyelin (SM) dagegen bildet geordnetere Membransysteme, wird aber durch Cholesterin (Chol) fluidisiert, welches durch seine flache Struktur eine hohe Affinität für die Fettsäureregion von SM hat. Modifiziert nach van Meer [2005]

Auswahl häufiger Membranlipide in eukaryotischen Zellmembranen wird in Abbildung 2.1 gegeben. Da die Fettsäureregion hydrophob, die Kopfgruppe dagegen hydrophil ist, gehören membranbildende Lipide zu den amphiphilen Molekülen. Ihre unpolare Fettsäureketten sind ursächlich für die schlechte Löslichkeit von Lipiden in polaren Lösungsmitteln⁵.

Die einzigartigen Eigenschaften von Wasser als polares Lösungsmittel sind die Folge eines lockeren Netzwerks aus Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen [Latimer und Rodebush, 1920; Teixeira, 1993]. Durch die Anwesenheit von Lipidmonomeren wird aufgrund ihres amphiphilen, unpolaren Charakters eine stärkere Ordnung der benachbarten polaren Wassermoleküle generiert. Diese richten sich an den unpolaren Molekülen aus und verlieren einen Teil ihrer Flexibilität. Die Zusammenlagerung mehrerer Lipidmonomere zu Aggregaten führt zu einer Verringerung der Grenzfläche zum Medium. Weil die durch die Aufhebung der Ordnung der Wassermoleküle erzeugte Entropie die für die Erhöhung der Ordnung der Lipide aufzuwendende Entropie überkompensiert, bilden Lipide im Einklang mit dem zweiten Hauptsatz der Thermodynamik in wässrigem Medium Aggregatstrukturen. Die Selbstaggregation aufgrund dieses sogenannten hydrophoben Effekts ist damit nicht die Folge von anziehenden Kräften zwischen den aggregierenden Molekülen, sondern von abstoßenden Kräften durch das Lösungsmittel [Tanford, 1978] - auf molekularer Ebene begründet durch die Wasserstoffbrückenbindungen.

Ein weiterer Aspekt in diesem Zusammenhang ist die freie Energie der Lipidmoleküle. Durch einerseits abstoßende Kräfte innerhalb der hydrophoben Fettsäureregion, andererseits anziehende Kräfte zwischen hydrophiler Kopfgruppe und den Wassermolekülen nehmen die Lipide durch Selbstaggregation und Abgrenzung der hydrophoben Bereiche vom wässrigen Medium ein energetisches Minimum ein [Israelachvili et al., 1976]. Es soll allerdings nicht unerwähnt bleiben, dass der Anteil des Entropiegewinns durch die Aufhebung der Ordnung der Wassermoleküle zum hydrophoben Effekt umstritten ist. Es gibt experimentelle Hinweise, dass die hauptsächliche treibende Kraft der Selbstaggregation in den Wechselwirkungen der amphiphilen Moleküle untereinander zu suchen ist [Evans und Ninham, 1986]. Letztendlich wird das Resultat eines Aggregationsprozesses immer durch ein Gleichgewicht zwischen energetisch und entropisch begünstigtem Zustand gegeben sein [Israelachvili et al., 1980].

⁵Das Ausmaß der Unlöslichkeit von Fettsäuren in polaren Lösungsmitteln ist abhängig von ihrem Sättigungsgrad, da gesättigte Fettsäuren im Vergleich zu ungesättigten über eine höhere Kontaktfläche zum Medium verfügen [Tanford, 1978].

Für die Entstehung von Aggregaten muss nach Israelachvili et al. [1976] die kritische Mizellenbildungskonzentration

$$\text{CMC} \approx \exp\left(-\frac{\mu_1 - \mu_N}{k_B T}\right) \quad (2.4)$$

der Lipidmonomere im Medium überschritten werden⁶. Daher ist es für die Bildung stabiler Aggregate zwingend erforderlich, dass die mittlere freie Energie pro Molekül μ_N mit steigendem N abfällt oder für einen Wert von N ein Minimum vorliegt [Israelachvili et al., 1976]. Gemeinsam mit durch die Form der Lipide vorgegebenen Packungsvorschriften⁷ bestimmt die Entropie die resultierenden Strukturen der Aggregate. In Abhängigkeit dieser Parameter sind sphärische und zylindrische Mizellen, planare und flexible Doppelschichten - letztere führen zu Vesikeln - sowie invertierte Mizellenstrukturen möglich. Sind mehrere Lipidspezies an den Aggregaten beteiligt, so spielt auch die Mischungsentropie der Lipide eine Rolle [Israelachvili et al., 1980].

2.3 Entwicklung des Membranmodells

Dass Lebewesen aus kleinen, gegeneinander abgegrenzten Einheiten bestehen, die seither Zellen genannt werden, ist schon seit Mitte des siebzehnten Jahrhunderts bekannt. Bis Overton [1896] aus seinen Untersuchungen zum Eintritt von Narkosemitteln in Zellen schloss, dass die Zellmembran aus Lipiden bestehen könnte, dauerte es knapp 250 Jahre⁸.

Von diesem Zeitpunkt an wurde die Modellvorstellung der Zellmembran weiterentwickelt und verfeinert. Gorter und Grendel fanden 1925 heraus, dass die Zellmembran genau zwei Lipidmoleküle dick sein musste, also eine Doppelschicht beziehungsweise ein *Bilayer* vorlag [Gorter und Grendel, 1925]. Sie hatten die Lipide von Erythrozyten extrahiert und deren Fläche mit der der intakten Erythrozyten verglichen. Anhand dieser Erkenntnis nahmen sie an, dass die polaren Kopfgruppen der Lipide in dieser Doppelschicht jeweils nach innen und nach aussen gerichtet waren - und stellten einen Zusammenhang zur Doppelschicht von Seifenblasen her.

Zehn Jahre später wurden Proteine in das Bild der Membran integriert. Danielli und Davson [1935] schlugen für den Aufbau von Membranen das sogenannte Sandwich-Modell vor, welches jeweils eine die Kopfgruppen der Lipide bedeckende Proteinschicht vorsah. Die elektrische Abgrenzung des Zellinneren wurde mit der Permeabilität für bestimmte Substanzen zur Semipermeabilität zusammengefasst. Die Bilayerstruktur wurde bald darauf durch elektronenmikroskopische Bilder verifiziert. Die beiden dunklen Linien, welche auf diesen Bildern die Zelle und ebenso Zellkompartimente umschlossen, führten Robertson [1958] zur Formulierung des Einheitsmembran-Modells, welches von einer Phospholipid-Doppelschicht und an diese angelagerten Proteinschichten ausging [Robertson, 1958, 1981].

⁶Dabei ist μ_N die mittlere freie Energie eines Lipidmoleküls in einem aus N Molekülen bestehenden Aggregats.

⁷Relevante Faktoren sind unter anderem die Anzahl und der Sättigungsgrad der Fettsäureketten sowie die Größe der Kopfgruppen (siehe Abschnitt 2.4).

⁸Die aus den Ergebnissen von Overton [1896] und Meyer [1901] abgeleitete Meyer-Overton-Regel zur von der Löslichkeit in Lipiden abhängigen Aufnahme von Narkosemitteln wurde für rund 100 Jahre als gültig angenommen, es stellte sich aber heraus, dass die Wechselwirkung mit Proteinen die maßgebliche Wirkungsvariable darstellt [Bovill, 2000].

Der Vorschlag, dass sämtliche Membranen einer Zelle sich prinzipiell miteinander verbinden könnten und somit das Zellinnere an einigen Stellen direkt mit dem Zelläusseren in Verbindung stehen könnte, stellt aus heutiger Sicht eine Überbewertung der Uniformität dar. Der prozentuale Anteil von Proteinen variiert je nach Membranfunktionalität zwischen 75% für die Membran von Mitochondrien [Garab et al., 2000] und 30% für die Myelinmembranen an Nervenzellen [Saher et al., 2005].

Als Meilenstein gilt das noch heute mit einigen Erweiterungen akzeptierte Fluid-Mosaik-Modell, das Singer und Nicholson 1972 entwickelten. Sie gingen vom Einheitsmembranmodell für funktionelle Membranen aus und unterstellten eine fluide Mosaizität aus der Phospholipid-Doppelschicht und amphiphilen Proteinen, welche sie in periphere und integrale Proteine einteilten. Die Fluidität der Membran verglichen sie mit einer zweidimensionalen, orientierten und viskosen Lösung von in die Phospholipid-Doppelschicht als Lösungsmittel eingebetteten Membranproteinen [Singer und Nicolson, 1972]. Abbildung 2.2A zeigt die schematische Darstellung des Fluid-Mosaik-Modells. Die Konsequenz einer Rotations- und einer lateralen Freiheit der zufällig verteilten Membrankomponenten muss, wie wir sehen werden, nach heutigem Kenntnisstand korrigiert werden [Vereb et al., 2003].

1984 stellten Mouritsen und Bloom das *Mattress-Modell* (Matratzen-Modell) für Membranen vor, durch welches im Wesentlichen die räumliche Modulierung der Bilayerdicke in der Umgebung integraler Membranproteine ergänzt wurde - ein Umstand, den schon Singer und Nicolson [1972] angedeutet hatten. Konkret stellten sie einen Zusammenhang zwischen den axialen Dimensionen der hydrophoben Bereiche von Lipidbilayer und integralen Proteinen her. Eine Ungleichheit dieser Größen führe zu einer hydrophoben Diskrepanz, welche durch elastische Verformung der Membran in axialer Richtung ausgeglichen werde. Die in dieser Modulierung der Bilayerdicke gespeicherte Energie beeinflusse die elastischen Eigenschaften von Proteinen und Lipiden [Mouritsen und Bloom, 1984]. Die mechanischen Eigenschaften von Membranen werden in Abschnitt 2.4 gesondert behandelt.

In den Folgejahren sammelten sich Hinweise auf eine laterale Heterogenität [Jacobson et al., 1995], beispielsweise aufgrund von Beobachtungen von Sphingolipid-Mikrodomänen, welchen eine Verbindung mit dem Proteintransport zugeschrieben wurde. Diese Beobachtungen griffen Simons und Ikonen [1997] auf und erweiterten das Prinzip der Mikrodomänen um Cholesterol als ordnenden Faktor. Die Zusammenlagerung mehrerer Sphingolipidmoleküle wird dabei durch Cholesterol stabilisiert, welches durch die breiten Kopfgruppen der Sphingolipide eine hohe Affinität für deren hydrophobe Bereiche aufweist. Diese in der fluiden Matrix aus ungesättigten Phosphoglycerolipiden treibenden, geordneteren Domänen nannten sie *Lipid Rafts* (Lipidflöße), da sie offensichtlich eine Rolle bei der Membranmigration spielten [Simons und Ikonen, 1997]. Auch die Bedeutsamkeit dieser Domänen für die intra- und extrazelluläre Signalweiterleitung durch Kolokalisation von relevanten Proteinen erkannten die beiden Wissenschaftler. In Abschnitt 2.7 werden die Eigenschaften von Lipiddomänen weiter vertieft.

Seit der Entdeckung der *Lipid Rafts* vor fast 20 Jahren wurden etliche Merkmale dieser spezifischen Lipiddomänen untersucht und das Bild der biologischen Membran weiter ergänzt, wobei viele Aspekte der Mikrodomänen nach wie vor umstritten sind [Eeman und Deleu, 2010]. Die wesentliche Eigenschaft der *Lipid Rafts*, die laterale Mobilität von Lipiden und Proteinen einzugrenzen, hat großen Einfluss auf die heutige Sichtweise von Biomembranen genommen, nach der die Eigenschaft der Mosaizität vor die Fluidität gestellt wird. Sowohl Gruppen spezifischer Lipide als auch Proteine bilden demnach molekulare und größere Cluster, welche sich wechselseitig in ihrer Verteilung und Mobilität

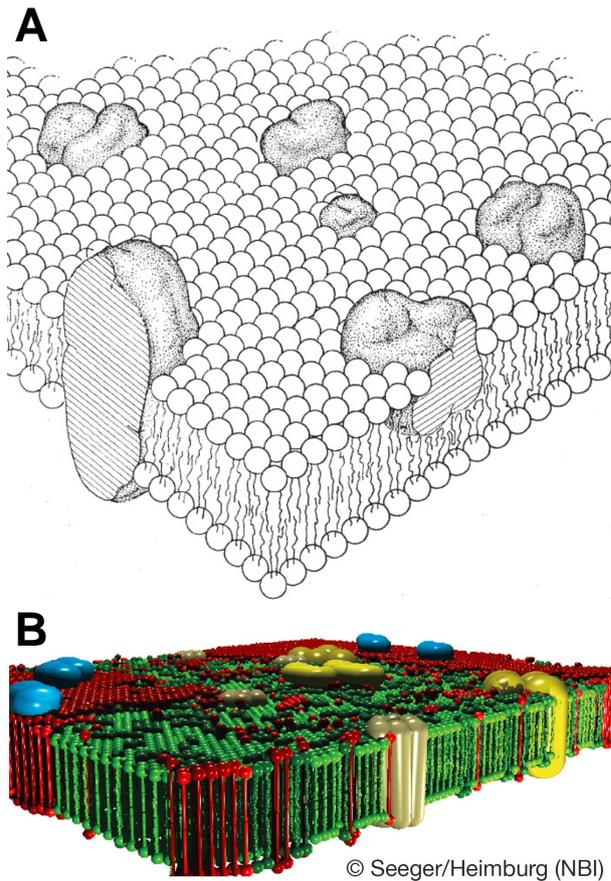


Abbildung 2.2
 Modelle für den Aufbau biologischer Membranen. (A) Fluid-Mosaik-Modell nach Singer und Nicolson. Die Membran wird als Mosaikstruktur aus Lipidbilayermatrix und darin eingebetteten integralen und peripheren Membranproteinen angenommen, wobei Eigenschaften einer viskosen Flüssigkeit unterstellt werden. Aus: [Singer und Nicolson, 1972] (B) Modernes Membranmodell (erstellt von H. Seeger durch Monte-Carlo Simulation), welches wesentliche Membraneigenschaften nach heutigem Kenntnisstand enthält. Der Lipidbilayer bildet Domänen auf kleiner und großer Skala aus, die von ebenfalls unterschiedlich ausgedehnten Proteinclustern unterbrochen werden. Schon bei dem durch die Simulation eingeschränkten Grad an Heterogenität erhält man einen Eindruck der Komplexität und Variabilität natürlicher Membranen. Aus Eeman und Deleu [2010]. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Thomas Heimburg, NBI Kopenhagen.

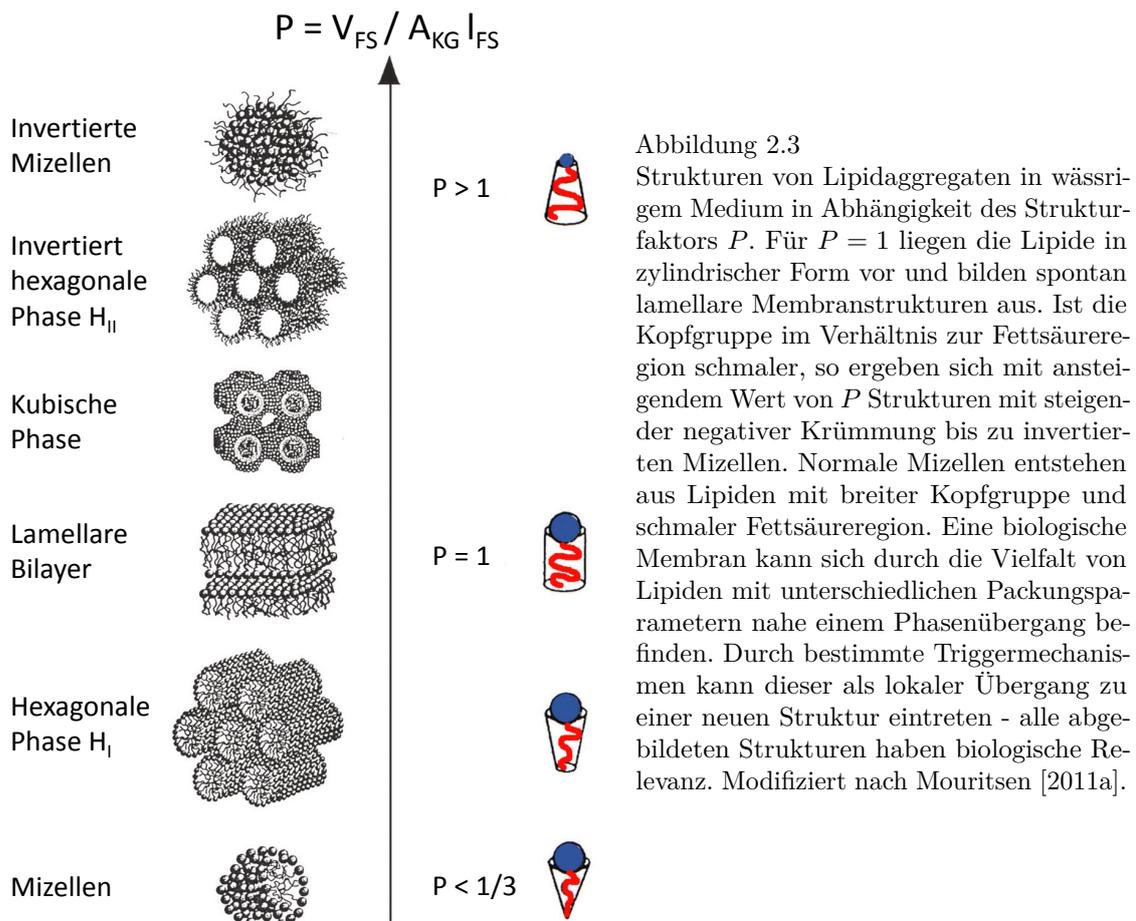
© Seeger/Heimburg (NBI)

beeinflussen können und funktionelle Aufgaben erfüllen [Vereb et al., 2003; Nicolson, 2014]. Die Fluidität wird nach Vereb et al. [2003] als Toleranz der Membranstruktur interpretiert, sich durch dynamische Restrukturierung ständig den Bedürfnissen der Zelle anpassen zu können. Der freien Diffusion nach Singer und Nicolson [1972] werden damit Einschränkungen der Domänen- und intermolekularen Wechselwirkungen auferlegt, innerhalb derer sie jedoch bis auf Weiteres ihre Gültigkeit behält. In Abbildung 2.2B wird ein aus Monte-Carlo Simulation generiertes Membranmodell präsentiert, welches nach aktuellem Kenntnisstand einige der hier umrissenen Eigenschaften veranschaulicht.

2.4 Struktur und mechanische Eigenschaften von Membranen

Eigenschaften funktioneller Membranen wie Organisation und Krümmung werden nicht etwa im Genom festgelegt, sondern sind direkte Konsequenzen der Lipidstruktur und der kollektiven Selbstaggregation [Mouritsen, 2011a]. Die aus der Selbstaggregation resultierende Aggregatstruktur hängt maßgeblich von der Geometrie der Lipidmoleküle, der Entropie und der freien Energie ab, welche im Packungsparameter

$$P = \frac{V_{FS}}{A_{KG} \cdot l_{FS}} \quad (2.5)$$



zusammengefasst werden [Kumar, 1991]⁹. Einerseits gibt P also an, wie gut sich ein Lipid in ein bestehendes Aggregat integrieren kann, andererseits ist der Packungsparameter über

$$P = 1 + k_0 \cdot l_{FS} + \frac{k_G \cdot l_{FS}^2}{3} \quad (2.6)$$

direkt mit den Krümmungen der sich bildenden Aggregatstruktur verknüpft [Antonietti und Förster, 2003]. Dabei ist die intrinsische Krümmung k_0 spezifisch für die einzelnen Lipidspezies und verhält sich in Lipidmischungen additiv [Marsh, 1996a]. Sie gibt an, in welchem Maß sich eine Lipidmischung ohne weitere äußere Einschränkungen krümmen würde. Die Gaußsche Krümmung k_G ist ein Maß für die tatsächliche Krümmung und ist gegeben durch das Produkt der beiden Hauptkrümmungen beziehungsweise durch das inverse Produkt der entsprechenden Radii¹⁰.

Wie aus Abbildung 2.3 ersichtlich ist, entspricht der Packungsparameter $P = 1$ einer zylindrischen Lipidform, welche ebene, lamellare Membranstrukturen ergibt. Abweichungen

⁹Das Volumen V_{FS} der Fettsäurekettenregion wird hier mit dem Produkt aus Kopfgruppenfläche A_{KG} (lateral) und kritischer Fettsäurekettenlänge l_{FS} (axial) in Beziehung gesetzt [Kumar, 1991].

¹⁰Die Hauptkrümmungsradii sind auf senkrecht zueinander stehenden Ebenen definiert, welche so im Raum orientiert sind, dass die Radii den maximal und minimal möglichen Wert annehmen.

von der Zylinderform führen zu Aggregatsformen mit einer Krümmung ungleich 0 [Marsh, 1996a]. Dabei weisen invertierte Mizellen eine negative, normale Mizellen eine positive Krümmung auf. Stimmt die tatsächliche Krümmung nicht mit der intrinsischen Krümmung überein, so resultiert ein Krümmungsstress, der die Tendenz einer Lipidstruktur angibt, einen Phasenübergang zu einer anderen Struktur zu vollziehen [Gruner, 1985].

Die Biegesteifigkeit κ_k , auch elastisches Krümmungsmodul genannt, gibt die Fähigkeit einer Membran an, sich unter geringem Stress zu krümmen [Marsh, 2007]. Sie ist also ein Maß für die Energie, welche zur Verformung eines Bilayers benötigt wird [Helfrich und Servuss, 1984] und ist über

$$E_k = \frac{\kappa_k}{2 \cdot R_k^2} \quad (2.7)$$

direkt mit der Krümmungsenergie E_k verbunden, wobei R_k den Krümmungsradius bezeichnet. Nach Marsh [2007] ist die Biegesteifigkeit als erstes (intrinsische Krümmung) beziehungsweise zweites (gaußsche Krümmung) Moment in dem in eine Taylorreihe entwickelbaren Lateraldruckprofil (siehe unten) enthalten. Entspricht die gaußsche Krümmung der intrinsischen Krümmung, so liegt für die Krümmungsenergie ein Minimum vor. Einen starken Einfluss auf die Krümmungsfähigkeit einer Membran hat deren Lipidzusammensetzung [Gruner, 1985], gegeben durch unterschiedliche Packungsparameter. Beispielsweise führt die Asymmetrie natürlicher Membranen zu einer intrinsischen Krümmung der Membran und somit zu einer Rigidisierung [Elani et al., 2015]. Da die Lipidzusammensetzung natürlicher Membranen sehr heterogen ist [van Meer et al., 2008] und die wenigsten der beteiligten Lipide einen Packungsparameter von 1 haben, weist jede Zell- oder Organellenmembran einen gewissen Krümmungsstress auf. Diesen kann die Zelle durch eine Reihe von Prozessen modulieren, um starke Krümmungsfelder zu erzeugen, die zum Teil zu nicht lamellaren Strukturen führen. Hierzu gehören beispielsweise die Änderung der Molekularstruktur bestimmter Lipide durch enzymatische Abspaltung von Fettsäureketten [Mouritsen, 2011a]. Biologische Relevanz besitzen diese Prozesse unter anderem bei der Einleitung von Fusionsprozessen oder der Vesikelabschnürung [McMahon und Gallop, 2005].

Eng mit der Membrankrümmung in Beziehung steht der in der Membranebene definierte Lateraldruck

$$\Pi = \kappa_d \frac{\Delta A}{A}. \quad (2.8)$$

oder laterale Membranspannung¹¹. Analog zur Biegesteifigkeit charakterisiert das elastische Dehnungsmodul κ_d die Energie, welche zur Verformung der Membran notwendig ist [Diz-Muñoz et al., 2013], die Richtung der Verformung liegt jedoch hier in der Ebene der Membranoberfläche.

Gleichen sich die axial über die Membran integrierten Beiträge zum Nettolateraldruck zwar aus, so erreichen die Einzelbeiträge doch erstaunlich hohe Werte. Das sogenannte Lateraldruckprofil $\Pi(z)dz$, welches in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt ist, setzt sich zusammen aus einem negativen Druck an der Grenzfläche zwischen hydrophilem und hydrophobem Bereich, einem positiven Kettendruck durch die entropische Abstoßung der

¹¹ κ_d ist das elastische Dehnungsmodul mit der Einheit Energie pro Einheitsfläche. Der Lateraldruck Π wird als Kraft pro Strecke beziehungsweise Energie pro Fläche angegeben und entspricht der einer Oberflächenspannung.

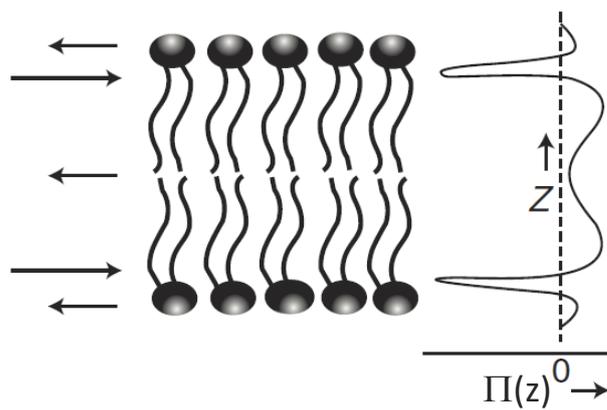


Abbildung 2.4

Lateraldruck-Beiträge einer Doppelschichtmembran (links) und zugehöriges Lateraldruckprofil (rechts) in Abhängigkeit von der axialen Membranposition. Die repulsiven Kräfte zwischen den Kopfgruppen und zwischen den Fettsäureketten erzeugen negative Beiträge zum Druckprofil. Diese werden durch den starken positiven Druck zwischen hydrophobem und hydrophilem Bereich so kompensiert, dass die Fläche unter der Lateraldruckprofil-Kurve Null wird. Modifiziert nach Mouritsen [2011b].

Fettsäureketten sowie einem schwach positiven Beitrag der Kopfgruppenregion [Cantor, 1997].

Die elastischen Membraneigenschaften werden selbstverständlich nicht ausschließlich von den Lipiden bestimmt, sondern auch maßgeblich von den integralen und peripheren Membranproteinen [Israelachvili et al., 1980]. Umgekehrt kann sowohl der Einbau von Proteinen [Marsh, 2008] als auch ihre Konformation [Cantor, 1997] und Aktivität [Perozo et al., 2002] durch Druckprofil, Krümmung und Lipidkomposition beeinflusst werden. Desweiteren spielt die Verknüpfung mit dem Cytoskelett eine wichtige Rolle für den Lateraldruck [Diz-Muñoz et al., 2013], für Mobilität, Krümmung und globale Struktur [Doherty und McMahon, 2008] von biologischen Membranen. Als in eukaryotischen Membranen essentielles, Domänen bildendes Lipid trägt auch Cholesterol wesentlich zu den Membraneigenschaften bei. Durch die Anwesenheit von Cholesterol werden Lateraldruck, Dehnungsmodul und Rigidität deutlich herabgesetzt [Hissa et al., 2013] und die Kopplung an das Cytoskelett reduziert [Sun et al., 2007].

Abschließend ist festzustellen, dass ein enger Zusammenhang zwischen den elastischen Membraneigenschaften und essentiellen Zellfunktionen besteht [Pontes et al., 2013; Diz-Muñoz et al., 2013].

2.5 Mobilität von Membrankomponenten

Zu den Transportprozessen, welche an einer Membran ablaufen, zählen neben dem Transport von membranfremden Molekülen, Ionen und Protonen durch die Membran, also in axialer Richtung, auch laterale Prozesse. Diese beziehen sich auf membraneigene Moleküle und definieren die fluiden Eigenschaften von Biomembranen. Es geht um die laterale und die Rotationsmobilität von Membranlipiden und -proteinen sowie um Austausch- oder Flip-Flop Prozesse.

Dem Vorschlag des Fluid-Mosaik-Modells durch Singer und Nicolson [1972] ging die Beobachtung voraus, dass zwar der Flip-Flop Mechanismus von Lipiden in Modellmembranen sehr langsam vonstatten geht, die laterale Mobilität der Lipide dagegen unerwartet hoch ist [Kornberg und McConnell, 1971]¹². Abhängig von der Lipidstruktur, dem Hydrations-

¹²Interessanterweise spekulierten bereits Kornberg und McConnell [1971] über die mögliche Einschränkung der Mobilität durch „laterale Diffusionsbarrieren“, was der Entdeckung der *Lipid Rafts* vorgriff.

grad¹³, der vorliegenden Lipidphase (siehe Abschnitt 2.7), Temperatur, Cholesterolanteil und Proteinwechselwirkungen [Tocanne et al., 1994] liegt der laterale Diffusionskoeffizient für Lipide in der Größenordnung von 10^{-10} cm²/s bis 10^{-7} cm²/s [Vaz et al., 1984; Edidin, 1974; Eeman und Deleu, 2010]. Vor allem da Proteine größer als die Moleküle der Matrix sind, in welcher sie gelöst sind, ist ihre Diffusionsgeschwindigkeit etwa einhundert mal geringer als die der Lipide [Vaz et al., 1984; Eeman und Deleu, 2010]. Ein weiterer Faktor ist die mögliche hydrophobe Diskrepanz zwischen Proteinen und dem Lipidlayer. Insgesamt führt dies zu Diffusionskoeffizienten zwischen 10^{-9} cm²/s und 10^{-8} cm²/s für unterschiedliche Membranproteine [Cherry, 1979].

Für die Rotation von Lipiden werden zwei Rotationsformen unterschieden: die axiale Rotation um die Lipidachse und, durch die Verkipfung (*Tilt*) der Lipide in der Membran, die schwankende Rotation um die Senkrechte zur Lipidachse (Wobbel-Rotation) - analog zur Präzession eines Kreisels. Es werden Werte von 10^7 s⁻¹ für die axiale Rotationsfrequenz von Membranlipiden angenommen und 10^8 s⁻¹ für die Wobbel-Rotation [Klauda et al., 2008].

Flip-Flop Prozesse, durch welche Lipidmoleküle von einem Lipidlayer in den anderen wechseln, stellen die transversale Mobilität in Membranen dar. Mit 10^{-15} s⁻¹ ist die Austauschrate für Membranlipide bei weitem der langsamste der hier beschriebenen Mobilitätsprozesse und entspricht Lebensdauern in der Größenordnung von Tagen [Contreras et al., 2010]. Zu der langsamen Austauschrate führen einerseits die Energiebarriere, welche die Kopfgruppen der Lipide überwinden müssen, um den hydrophoben Bereich der Membran zu durchqueren. Eine weitere Barriere bildet der Lateraldruck des gegenüberliegenden Layers, der durch das zusätzliche Molekül erhöht werden muss [Devaux et al., 2008]. Für Steroide, insbesondere Cholesterol, sind die Zeitkonstanten für transversale Diffusion in der Membran aufgrund ihrer sehr kleinen Kopfgruppe wesentlich geringer [Müller und Herrmann, 2002]. Es stellt sich die Frage, wie die auf der inneren Seite von Zellmembranen synthetisierten Lipide auf die extrazelluläre Seite gelangen und wie die Asymmetrie funktioneller biologischer Membranen gebildet und aufrechterhalten werden kann. Neben dem spontanen Flip-Flop Prozess existieren Translokationsenzyme, die Phospholipide aktiv durch die Membran bewegen können. Flippasen bringen unter Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) Lipide von der extrazellulären Seite auf die intrazelluläre Seite, Floppasen in die entgegengesetzte Richtung [Devaux et al., 2008]. Für die Umverteilung der synthetisierten Lipide sind Scramblasen zuständig, welche unabhängig von ATP Lipide in beide Richtungen transportieren [Pomorski und Menon, 2006] und somit auch die Asymmetrie der Membran aufrechterhalten [Stout et al., 1996].

2.6 Elektrische Eigenschaften von Membranen

In ihrer Funktion als abgrenzende Schicht zwischen zwei Medien unterschiedlicher Zusammensetzung, insbesondere die Ionenkonzentrationen betreffend, und mit Molekülen von unterschiedlichem Ladungszustand in Wechselwirkung tretend, spielt die natürliche Membran eine entscheidende Rolle für die elektrostatischen und elektrodynamischen Prozesse in und um lebenden Zellen. Selbstverständlich kann man daher Membranen elektrische Eigenschaften zuordnen und diese an natürlichen Membranen messen beziehungsweise die

¹³Lipidmembranen sind generell von einer zwei Wassermoleküle dicken Hydratschicht umgeben, die sich durch eine starke Wasserstoffbrückenvernetzung auszeichnet [Tocanne und Teissié, 1990].

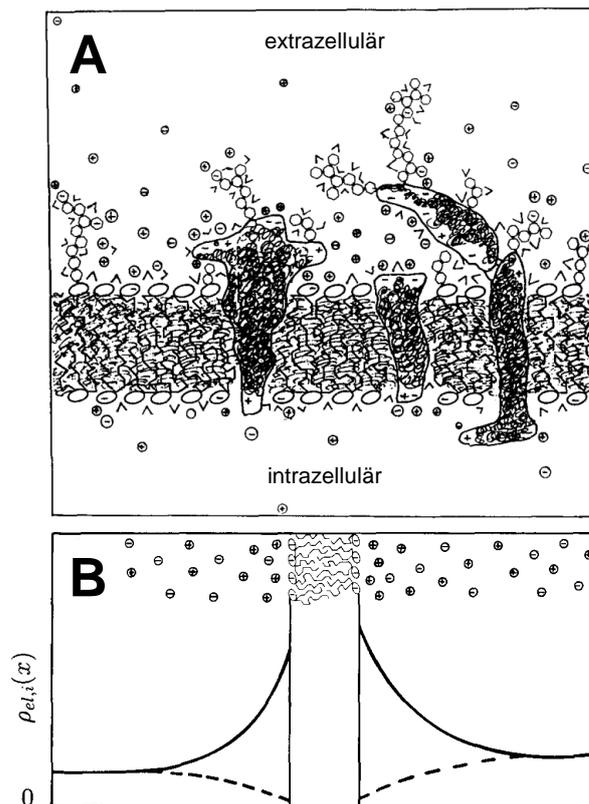


Abbildung 2.5

Schema der elektrostatischen Umstände (A) und Ionendichteprofil $\rho_{el}(x)$ (B) an einer biologischen Membran. (A) Die Lipidmoleküle sind teilweise negativ, Membranproteine verschieden geladen. Die Ladungen von Proteinen und Zuckerketten reichen besonders weit in den extrazellulären Bereich. Die als kleine Kreise dargestellten Ionen der Medien sind mit dem Vorzeichen ihrer Ladung versehen, gebundene Wassermoleküle sind als V abgebildet. (B) Durch die negativ geladenen Membranlipide werden die positiven Ionen (durchgezogene Linien) an der Oberfläche der Membran aufkonzentriert, die negativen Ionen (gestrichelte Linien) werden aus membran nahen Bereichen verdrängt. Dies ist die Ursache des Gouy-Chapman-Potentials. Zum Medium hin nähert sich die Ionenverteilung, die in der oberen Hälfte skizziert ist, an die des Mediums an. Modifiziert nach Cevc [1990].

natürliche Situation im Labor nachstellen. Abbildung 2.5A gibt einen Eindruck von der elektrostatischen Situation an einer Zellmembran.

Durch den hydrophoben Fettsäurebereich ist der Durchgang für hydratisierte Ionen mit einem beträchtlichen Energieaufwand verbunden. Daher ist eine Membran ein sehr guter Isolator und im hydrophoben Bereich die Ionenkonzentration verschwindend gering [Läuger, 1970]. Für Muskelzellen wurden beispielsweise von Tomita [1966] Membranwiderstandsdichten von maximal $10^4 \Omega\text{cm}^2$ gefunden, für Modellmembranen ergeben sich dagegen bis zu $10^9 \Omega\text{cm}^2$ [Läuger, 1970]¹⁴. Die Diskrepanz zwischen Modell- und Zellmembran lässt sich unter anderem auf die Anwesenheit von Membranproteinen zurückführen, von welchen zudem einige für den transmembranen Ladungstransport verantwortlich sind.

Als ladungstrennender Isolator hat eine Membran, insbesondere der hydrophobe Bereich, die Eigenschaft eines Dielektrikums und verfügt daher neben dem Widerstand außerdem über eine Kapazität. Fettiplace et al. [1971] fanden im Vergleich heraus, dass die spezifische Kapazität von Zellmembranen ungefähr $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ betrug, für Modellmembranen dagegen nur rund $0,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Nach

$$C_M = \frac{\epsilon_0 \cdot \epsilon_M \cdot A_M}{d_M} \quad (2.9)$$

ist die Membrankapazität C_M neben Membranfläche A_M und Membrandicke d_M abhängig von der relativen Permittivität ϵ_M der Membran, wobei aufgrund dessen maßgebender

¹⁴Dies entspricht umgerechnet etwa einem spezifischen Widerstand R_s von $10^{10} \Omega\text{cm}$ für natürliche Membranen und $10^{15} \Omega\text{cm}$ für Modellmembranen. Als Widerstandsdichte wird hier der Quotient aus Spannung und Stromdichte bezeichnet.

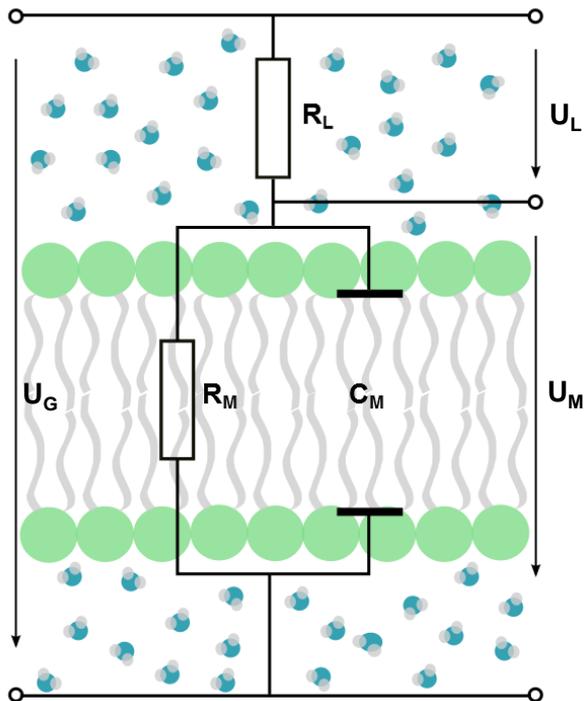


Abbildung 2.6

Elektrisches Ersatzschaltbild einer Membran zwischen zwei wässrigen Medien, mit dem sich die elektrischen Membraneigenschaften vereinfachend zusammenfassen lassen. Der sehr hohe Membranwiderstand R_M ist parallel geschaltet mit der Membrankapazität C_M . Der Lastwiderstand R_L ist gegenüber R_M vernachlässigbar klein, sodass die über der Membran anliegende Spannung U_M in guter Näherung der Gesamtspannung U_G entspricht. Die Wassermoleküle dienen lediglich zur Repräsentation des wässrigen Mediums.

Rolle die Geometrie des Kondensators auf den hydrophoben Bereich der Fettsäureketten beschränkt werden kann¹⁵. Darüber hinaus liegt auch eine Abhängigkeit von der anliegenden Spannung beziehungsweise dem Membranpotential vor [Adrian und Almers, 1976]. Diese ist quadratisch und wird hauptsächlich auf Elektrokompensation zurückgeführt [Alvarez und Latorre, 1978].

Wir haben gesehen, dass eine Membran sowohl über einen sehr hohen elektrischen Widerstand als auch über eine Kapazität verfügt. Für viele Anwendungen ist es daher zweckmäßig, die elektrischen Membraneigenschaften in einem Ersatzschaltbild vereinfachend zusammenzufassen, wie in Abbildung 2.6 dargestellt. Im Wesentlichen wird dafür eine Parallelschaltung aus Widerstand und Kondensator angenommen - ergänzt durch einen damit in Reihe geschalteten Lastwiderstand, welcher durch Medium und gegebenenfalls Messsystem verursacht wird und in den meisten Fällen vernachlässigbar klein ist [Hamill et al., 1981; Tomita, 1966].

Im Inneren einer Zelle liegen, wie eingangs erwähnt, andere Ionenkonzentrationen vor als im extrazellulären Medium. Natrium ist im Cytosol in einer Konzentration von 9 mM vorhanden, extrazellulär beträgt die Konzentration dagegen 120 mM, ähnlich wie für Chlor. Kalium ist innerhalb der Zelle mit etwa 140 mM wesentlich höher konzentriert als außerhalb mit 2,5 mM. Da sich die Ladungen von Natrium- und Chlorionen praktisch kompensieren, entspricht das von außen an der Zellmembran anliegende Transmembranpotential mit ungefähr -70 mV recht gut dem Gleichgewichtspotential von Kalium [Cevc, 1990].

Dass das Potential innerhalb der Membran nicht in einer linearen Verbindung des Transmembranpotentials besteht, erschließt sich durch die amphiphile chemische Struktur der Lipidmoleküle und die Asymmetrie natürlicher Membranen. Tatsächlich setzt sich

¹⁵Für ϵ_M werden in der Literatur Werte zwischen 2 und 2,5 angegeben, die Dicke der Fettsäureregion variiert zwischen 3 und 5 nm [Fettiplace et al., 1971; Cevc, 1990].

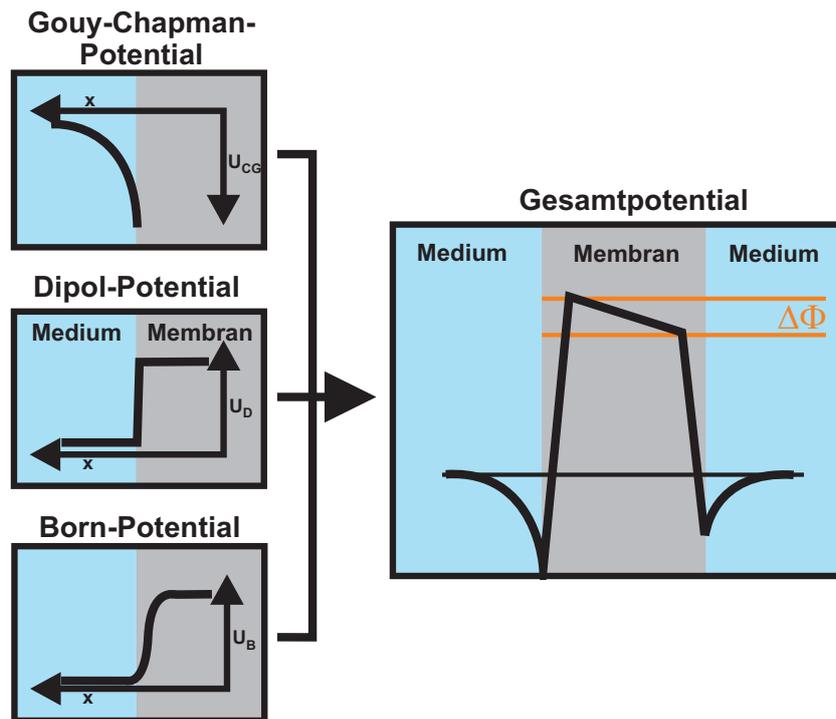


Abbildung 2.7

Das innere Membranpotential setzt sich aus drei Anteilen zusammen. (1) Das (vom Betrag) zur Membranoberfläche stark ansteigende Gouy-Chapman-Potential resultiert aus der Ladungsträgerakkumulation an der Grenzfläche zwischen geladenen Kopfgruppen und Medium. (2) Durch ausgerichtete Dipole von Wassermolekülen und Membranlipiden entsteht das Dipol-Potential als Potentialsprung an der Membranoberfläche. (3) Die stark unterschiedlichen relativen Permittivitäten von wässrigem Medium und Membraninnerem führen zu einer Veränderung des Hydratisierungsgrades von geladenen Teilchen und werden durch das Born-Potential beschrieben. Dieses steigt erst innerhalb der Membran an und verschiebt entsprechend die Ecken des Gesamtpotentialverlaufs nach innen. Die innere Potentialdifferenz $\Delta\Phi$ spiegelt die Asymmetrie der Membran wieder. Modifiziert nach Schoch et al. [1979].

das innere Membranpotential nach Schoch et al. [1979] aus drei Anteilen zusammen, wie Abbildung 2.7 zu entnehmen ist. Ein geladenes Teilchen, welches die Membran durchquert, wird also dieses Potential passieren müssen, was zu Teilen auch für den Einbau und die Funktion von Proteinen gilt [Peterson et al., 2002].

Das Gouy-Chapman-Potential Φ_{GC} entsteht aufgrund der teilweise geladenen Kopfgruppen der Membranlipide [Cevc, 1990]. Die freien Ionen des Mediums bilden an der Membranoberfläche eine nach außen abklingende Gegenionenkonzentration, welche zusammen mit den membrangebundenen Ionen eine Doppelschicht bilden¹⁶ [Schoch et al., 1979]. Das Zustandekommen des Gouy-Chapman-Potentials ist in Abbildung 2.5B am Ionendichteprofil an einer Membran illustriert.

Die an der Membranoberfläche ausgerichteten Wassermoleküle und die ausgerichteten Carbonylgruppen der Lipide führen zu einem Potentialsprung an der Membranoberfläche, dem Dipol-Potential Φ_D [Simon und McIntosh, 1989; Zheng und Vanderkooi, 1992], welches

¹⁶Die sich auf unterschiedlichem Niveau befindenden Ionenkonzentrationen der beiden Medien sind die Ursache des Transmembranpotentials.

indirekt auch von der Packungsdichte der Lipide abhängt [Peterson et al., 2002].

Der dritte Beitrag zum Membranpotential ist nur dann relevant, wenn tatsächlich ein geladenes Teilchen die Membran durchquert. Nach Born [1920] sind Ionen in einem dielektrischen Medium hydratisiert. Für den Übergang in ein zweites Medium mit unterschiedlicher Dielektrizitätskonstante muss für die Änderung des Hydratisierungsgrads die Born-Energie (Eigenenergie) aufgebracht werden [Flewelling und Hubbell, 1986], was das sogenannte Born-Potential Φ_B begründet¹⁷.

Wie in Abbildung 2.7 dargestellt, ergibt sich aus der Überlagerung von Guy-Chapman-Potential, Dipol-Potential und Born-Potential ein trapezförmiger Verlauf des inneren Gesamtmembranpotentials Φ . Die Trapezform berücksichtigt die Asymmetrie der einzelnen Potentiale und hat somit an den beiden Seiten der Membran unterschiedliche Maximalwerte, zwischen denen der Potentialverlauf als linear angenommen wird. Da das Born-Potential durch die Wechselwirkung des Ions mit den Oberflächenladungen vom Membraninneren zu den Seiten hin stark abfällt, sind diese Punkte um den Bruchteil r_1 beziehungsweise r_2 der Membrandicke zum Inneren der Membran verschoben [Schoch et al., 1979]. Die der Asymmetrie geschuldete innere Potentialdifferenz $\Delta\Phi$ ist damit durch den Zusammenhang

$$\Delta\Phi = \Delta\Phi_B(r_1, r_2) + (r_2 - r_1)(\Delta\Phi_{GC} + \Delta\Phi_D) \quad (2.10)$$

gegeben [Schoch et al., 1979]. Sie bezieht sich auf die Situation ohne extern anliegendes Potential. Wird das Potential nicht auf den Membrandurchgang eines geladenen Teilchens bezogen, so reduziert sich die Gleichung um den Beitrag des Born-Potentials zum intrinsischen Membranpotential Ψ mit

$$\Delta\Psi = \Delta\Phi_{GC} + \Delta\Phi_D. \quad (2.11)$$

Die intrinsische Membranpotentialdifferenz $\Delta\Psi$ lässt sich durch Kompensation mit einer externen Spannung (*Inner Field Compensation*) bestimmen [Hagge et al., 2004].

Funktionelle Membranen verfügen also neben den mechanischen Eigenschaften wie dem Lateraldruck (siehe Abschnitt 2.4) auch über elektrische Eigenschaften, welche ihre Funktion als Barriere zwischen innerem und äußerem Medium bestimmen. Der Durchgang von ungeladenen Molekülen und Ionen, welcher zum Erhalt der lebensnotwendigen Funktionen einer Zelle notwendig ist, wird über die Membran kontrolliert, die daher als semipermeabel bezeichnet wird. Schon ausschließlich aus Lipiden aufgebaute Modellmembranen sind für Wassermoleküle und kleine, ungeladene Moleküle in begrenztem Maße durchlässig - und noch eingeschränkter für Ionen und Protonen¹⁸. Man spricht hier von einfacher Diffusion. Diese wird auf transiente Defekte zurückgeführt, welche es den Molekülen erlauben, in den Kopfgruppenbereich der Lipide zu gelangen. Von dort diffundieren sie dann gegebenenfalls durch den hydrophoben Bereich [Deamer und Bramhall, 1986; De Gier, 1992].

Biologische Membranen, welche eine heterogene Vielfalt an Proteinen enthalten, lassen verschiedene Moleküle durch aktive und passive Transportmechanismen passieren, die

¹⁷Die relative Permittivität von Wasser beträgt $\epsilon_W \approx 80$. Der hydrophobe Bereich einer Membran ist mit $\epsilon_M \approx 2$ in Borns Sinn [1920] als nicht dielektrisch anzusehen, die Hydrathülle muss also abgestreift werden.

¹⁸Da die Born-Energie mit ansteigendem Radius abfällt, ist die Permeabilität für größere Ionen im Verhältnis höher als für kleine. Eine Ausnahme hiervon bilden Protonen, für die die Permeabilität wesentlich höher ist als für andere einwertige Ionen [De Gier, 1992].

durch spezielle Proteine ermöglicht werden. Zu den passiven Transportmechanismen gehört einerseits der hochspezifische, durch Carrierproteine vermittelte Transport, andererseits die kanalvermittelte Diffusion [Läuger, 1970]. Kanalproteine verfügen zumeist über eine hydrophile Pore, durch die Ionen unter Abstreifung der Hydrathülle diffundieren können. Ist der Transport entgegen eines Konzentrationsgradienten gerichtet, so muss dafür Energie in Form von ATP aufgewendet werden und man spricht von aktivem Transport [Skou, 1965]. Ein prominentes Beispiel für ein aktives Transportprotein ist das Enzym Natrium-Kalium-ATPase, das unter ATP-Hydrolyse den Natrium- und Kalium-Konzentrationsprung zwischen intra- und extrazellulärem Medium aufrechterhält¹⁹ [Skou, 1965; Whittam und Wheeler, 1970]. Für viele Zellfunktionen, unter anderem die Synthese von ATP und Transportprozesse, wird ein Protonengradient oder Protonensprung benötigt. Um diesen aufzubauen, werden Protonenpumpen eingesetzt. In Transportvesikeln, Lysosomen, Endosomen und Phagosomen übernimmt diese Rolle die v-ATPase [Beyenbach und Wiczorek, 2006; Marshansky und Futai, 2008; Kinchen und Ravichandran, 2008].

2.7 Membrandomänen

Die bizarre Vielgestaltigkeit von Membrandomänen lässt sich in gewisser Weise mit den Wolken am Himmel vergleichen. Ihre Form und Struktur hängt in hohem Maß von den Umgebungsparametern ab, gleichzeitig sind sie für biologische Membranen von entscheidender funktioneller Bedeutung.

In den Abschnitten 2.4 und 2.5 wurden die generellen mechanischen Eigenschaften von Lipidmembranen und die Mobilität von deren Bestandteilen diskutiert. Diese Eigenschaften sind, wie bereits ausgeführt, in einer Membran nicht uniform, sondern lateral heterogen in gegeneinander mehr oder weniger voneinander abgegrenzten Bereichen angeordnet [Tocanne et al., 1989]. Das gilt insbesondere für natürliche Membranen, aber auch Modellmembranen zeigen solche Ausprägungen. Auf molekularer Lipidebene zeigt sich, dass Lipide, abhängig von vielen Faktoren, die in diesem Abschnitt noch dargelegt werden, in unterschiedlichen Phasen vorliegen können [Devaux und Morris, 2004] - analog zu den Aggregatzuständen fest, flüssig und gasförmig. Im Fall einer Phasenkoexistenz sind die in unterschiedlichen Phasen vorliegenden Lipide in voneinander abgegrenzten Bereichen organisiert, welche Domänen genannt werden. Eine Phase bildet dabei häufig die Matrix, in welcher Lipide der anderen Phasen in Domänen von unterschiedlicher Form und Größe koexistieren. Welche Phase dabei das Medium bildet, ist abhängig von Mischungsverhältnis und Umgebungsbedingungen wie Temperatur und Lateraldruck [Zhao et al., 2007]. Eine Übersicht der Phasenzustände und der jeweiligen Übergänge findet sich in Abbildung 2.8.

Dem festen Aggregatzustand entsprechend ist die Gel- oder fest geordnete Phase (L_{β}). Sie ist durch eng gepackte und parallel angeordnete Fettsäureketten charakterisiert, welche mit zunehmendem Hydratisierungsgrad stärker gegen die Membrannormale verkippt sind [Tardieu et al., 1973; Eeman und Deleu, 2010]. Dadurch nimmt die Membrandicke dieser Phase mit zunehmendem Wassergehalt ab. Bei einer hohen chemischen Heterogenität der Fettsäureketten und geringer Hydratisierung richten sich die Ketten in der L_{β} -Phase ohne Verkipfung senkrecht zur Membranoberfläche aus²⁰ [Tardieu et al., 1973]. In der

¹⁹Für die Entdeckung der Natrium-Kalium-ATPase erhielt Skou 1997 den Chemie-Nobelpreis.

²⁰Die Nomenklatur der beiden Ausprägungen ist in der Literatur nicht einheitlich. Die Ausprägung ohne Verkipfung wird teilweise als L_{β} -Phase bezeichnet und diejenige mit Verkipfung als $L_{\beta'}$ -Phase. Es ist

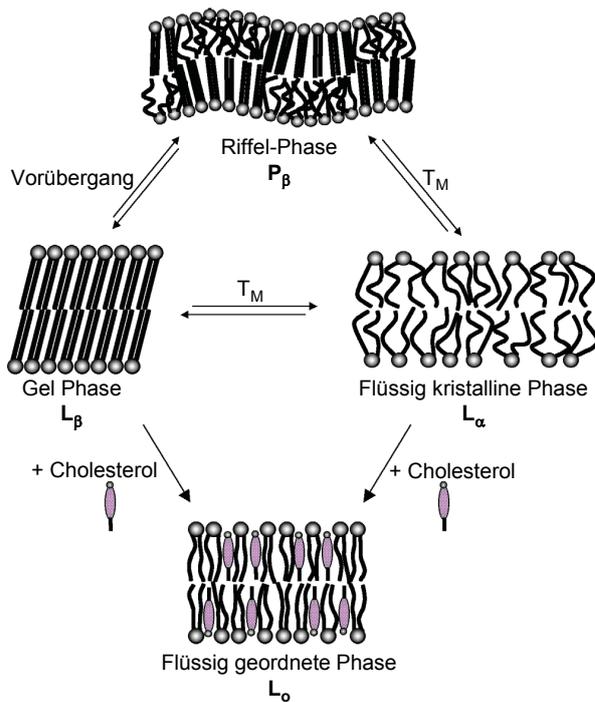


Abbildung 2.8

Schematische Darstellung der Phasenzustände von Membranlipiden. In der Gelphase L_β sind die Lipide dicht gepackt, die Fettsäureketten weisen ein hohes Maß an Ordnung auf. Die flüssig kristalline Phase L_α unterscheidet sich von der L_β -Phase durch ungeordnete Fettsäureketten und eine hohe Mobilität der Lipide. Der Hauptphasenübergang findet bei T_m statt, für einige Lipide existiert ein Vorübergang zur Zwischenphase P_β . In Anwesenheit von Cholesterol bildet sich zusätzlich die flüssig geordnete L_o -Phase aus, die die Ordnung der L_β -Phase mit der Fluidität und Mobilität der L_α -Phase kombiniert. Die L_o -Phase wird als Pendant zu den in natürlichen Membranen beobachteten *Lipid Rafts* angenommen. Modifiziert nach Eeman und Deleu [2010].

Gel-Phase ist die laterale Mobilität der Lipide durch die hohe Ordnung stark reduziert [Eeman und Deleu, 2010].

Bringt man eine Lipidmischung über eine Phasenübergangstemperatur T_m , so findet ein Phasenübergang erster Ordnung zur flüssig kristallinen Phase (L_α) statt [Xie et al., 2002; Janiak et al., 1979]. Diese zeichnet sich durch einen wesentlich schwächeren Ordnungsgrad der Fettsäureketten aus, welche sich flexibel und flüssigkeitsartig verhalten und dabei im Durchschnitt senkrecht zur Membranoberfläche orientiert bleiben [Luzzati und Tardieu, 1974]. Da mit ansteigender Temperatur die Unordnung der Fettsäureketten zunimmt, verringert sich wie bei der L_β -Phase mit ansteigender Temperatur die Membrandicke [Luzzati und Tardieu, 1974]. Unterschieden werden können die L_α - und die L_β -Phase anhand von Röntgenbeugungsexperimenten, die für die flüssig kristalline Phase einen wesentlich breiteren Ketten-Korrelationspeak zeigen als für die Gelphase, in der die Fettsäureketten einen scharf definierten Peak erzeugen [Mills et al., 2008; Tardieu et al., 1973].

Für den Phasenübergang von Gelphase zu flüssig kristalliner Phase wird die Ausbildung fluider „Keime“ beschrieben, welche sich anisotrop zu länglich ausgestreckten Bereichen ausdehnen, die als fluider Stress in der Gelphase interpretiert werden [Xie et al., 2002]. Ferner wird für einige Lipide [McIntosh, 1980] ein Vorübergang zu einer intermediären Phase, der sogenannten Riffelphase (P_β), beschrieben. Diese besteht in einer alternierenden Anordnung geordneter und ungeordneter Bereiche, die als periodische Undulationen der Membranoberfläche in Erscheinung treten - der Vorübergang hat dabei dieselbe physikalische Ursache wie der Hauptübergang [Heimburg, 2000].

Die Bedeutung von Cholesterol, welches einen der Hauptbestandteile eukaryotischer Zellmembranen bildet (siehe auch Abschnitt 2.9), für das Phasenverhalten von Membranli-

aber üblich, beide unter den Oberbegriff L_β zu fassen, was in dieser Arbeit ebenfalls praktiziert wird.

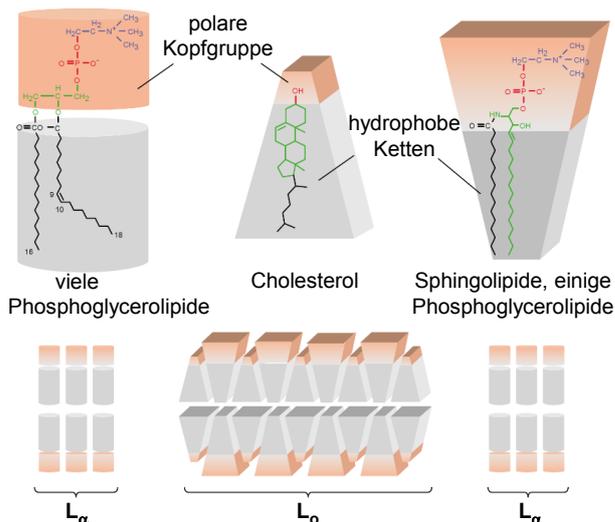


Abbildung 2.9

Der Separation von L_α - und L_β -Phase in einer Dreikomponentenmischung zugrundeliegende Lipidgeometrie (vgl. Abschnitt 2.4). Während ungesättigte Phosphoglycerolipide eine zylinderförmige Struktur ($P \approx 1$) aufweisen und T_M niedrig ist, haben Sphingolipide und gesättigte Phosphoglycerolipide Strukturen mit $P < 1$ und höherem T_M . Für letztere ist es im Bilayer energetisch günstig, sich in Bereichen mit Cholesterolmolekülen zu organisieren. Aus diesen Domänen werden gesättigte Phosphoglycerolipide zu großen Teilen ausgeschlossen. Modifiziert nach Fantini et al. [2002].

piden wurde schon früh erkannt. Die Phase, deren Ausbildung durch die Anwesenheit von Cholesterol induziert wird, und die an Cholesterol angereichert ist, wird flüssig geordnete Phase (L_o) genannt. Ähnlich der L_β -Phase weist sie eine höhere Ordnung der Fettsäureketten auf, die Mobilität der Lipide bleibt dabei jedoch weitestgehend erhalten und ist mit der L_α -Phase vergleichbar [Ipsen et al., 1987; Fantini et al., 2002].

Für zweikomponentige Mischungen aus einem Phosphoglycerolipid und Cholesterol wurden Bedingungen für die Koexistenz von jeweils zwei der drei Phasen L_α , L_β und L_o gefunden, wobei kritische Faktoren der Cholesterolanteil und die Temperatur sind [Vist und Davis, 1990] - ab etwa 25% Cholesterol wird in zwei- aber auch in mehrkomponentigen Systemen die L_o -Phase ausgebildet [Thewalt und Bloom, 1992]. Dies lässt sich allerdings nicht uneingeschränkt verallgemeinern, da die Grenzkonzentration von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird.

Als sie die *Lipid Rafts* als funktionelle Lipiddomänen in das Membranmodell integrierten, beschrieben Simons und Ikonen [1997] Sphingolipide und Cholesterol als Hauptkomponenten der *Rafts*. Durch die Assoziierung mehrerer Sphingolipide [Fantini et al., 2002] bliebe durch deren große Kopfgruppe ein Freiraum im hydrophoben Bereich, welchen die Cholesterolmoleküle als Spacer ausfüllten²¹. Diese *Raft*-Domänen verfügen über eine stärkere Integrität als die umgebenden fluiden Bereiche biologischer Membranen²². Abbildung 2.9 veranschaulicht die der *Raft*-Bildung zugrundeliegenden, lipidgeometrischen Rahmenbedingungen. Die *Lipid Rafts* wurden schnell mit der schon bekannten L_o -Phase in Verbindung gebracht [Brown und London, 1998].

Dreikomponentige Lipidmischungen aus einer PC-Spezies mit niedriger Phasenübergangstemperatur, einem Sphingolipid beziehungsweise PC mit höherer Phasenübergangstemperatur und Cholesterol werden als angemessen angesehen, um die Situation der

²¹Das *Umbrella*-Modell von Huang und Feigenson [1999] stellt die Kopfgruppen der Sphingolipide als Schirme dar, welche die Cholesterolmoleküle, im richtigen Mischungsverhältnis, vom polaren Medium abschirmen.

²²Lange herrschte die Meinung vor, man könne Lipid Rafts über ihre Unlöslichkeit in kaltem Triton X-100 definieren [London, 2002]. Diese Interpretation ist mittlerweile sehr umstritten, da die Löslichkeit in diesem Detergenz stark von den Rahmenbedingungen abhängt, zumal nicht gesichert ist, ob die unlöslichen Fragmente in ihrer Organisation den *Lipid Rafts* entsprechen [Edidin, 2003].

Separation von L_o -Phasen in natürlichen Membranen nachzustellen [Brown und London, 1998; Chen et al., 2007]. Die sich ausbildenden, an Cholesterol und dem Sphingolipid angereicherten Membrandomänen haben mit den *Lipid Rafts* vergleichbare Eigenschaften [Veatch et al., 2004]. In solchen Dreikomponentensystemen kann es in Abhängigkeit von den Randbedingungen zur Koexistenz von zwei, aber auch von drei Phasen kommen [De Almeida et al., 2003; Chen et al., 2007]. Die Höhen der drei Phasen lassen sich in den meisten Fällen voneinander unterscheiden - so bildet die L_o -Phase Domänen aus, die höher als die L_α -Domänen, jedoch niedriger als die L_β -Domänen sind [Maulik und Shipley, 1996].

Für die Struktur und Eigenschaften von Membrandomänen sind selbstverständlich auch Membranproteine ausschlaggebend. Unter anderem in der unterschiedlichen Höhe der verschiedenen Lipidphasen begründet, weisen die meisten Proteine eine Tendenz auf, sich in bestimmte Domänen einzubauen. Dadurch wird ihre Präsenz die Ausbildung bestimmter Domänen in einer Membran begünstigen [Epanand, 2004]. Zudem können Proteine durch Katalyse chemischer Lipidmodifikationen oder durch Lipid-Protein-Aggregation einen Einfluss auf die lokale Lipidkomposition nehmen, was wiederum das lokale Phasenverhalten der Membran beeinflusst [Zhao et al., 2007].

Es wird angenommen, dass *Lipid Rafts* eine wichtige funktionelle Rolle in unterschiedlichen zellulären Prozessen spielen, unter anderem bei Membrantransportprozessen, Zellpolarisierung und Signalweiterleitung [Simons und Ehehalt, 2002; Edidin, 2003; Bromley et al., 2001], indem sie für spezifische *Raft*-assoziierte Proteine räumlich abgegrenzte Interaktionsplattformen bilden. Die Größe der *Lipid Rafts* in natürlichen Membranen wird auf weniger als 70 nm im Durchmesser geschätzt [Varma und Mayor, 1998], für funktionelle Aufgaben könnten sie sich zu größeren Domänen zusammenschließen [Bromley et al., 2001]. Zudem stellen *Lipid Rafts* und *Raft*-assoziierte Proteine für eine Reihe von Krankheitsserregern eine bevorzugte Interaktionsstruktur dar [Simons und Ehehalt, 2002; Fantini et al., 2002; Yandrapalli et al., 2014].

Bisher nur in Ansätzen verstanden ist die Rolle der Domänengrenzen [Pike, 2009]. Analog zu den *Lipid Rafts* bilden sie für spezifische Proteine einen extrem eingeschränkten, zweidimensionalen Interaktionsraum, was auch McConnell und Vrljic [2003] vermuteten²³. Durch die in den unterschiedlichen Domänenhöhen begründete hydrophobe Diskrepanz liegt an Domänengrenzen eine Linienspannung vor, welche Einfluss auf die sich einstellenden Domänengrößen und die Struktur der Domänengrenzen hat [García-Sáez et al., 2007]. Diese Linienspannung kann durch spezielle Lipide oder Proteine kompensiert werden, führt aber in letzter Instanz zu einer negativen Membrankrümmung [Pike, 2009]. Daher können Domänen und speziell die Domänengrenzen einen Einfluss auf Abschnürungseffekte an der Membran haben [Lipowsky, 2002].

2.8 Membranfusionen

Fusionen und die Abtrennungsprozesse zweier Membranen spielen in verschiedenen Bereichen der Biologie eine wichtige Rolle. Zelluläre Transportprozesse [Bonifacino und Glick, 2004], aber auch Teile der Immunabwehr wie Phagozytose [Huynh et al., 2007] sind auf Fusions- und Abtrennungsprozesse wie Exo- und Endozytose angewiesen. Weitere

²³Es wurden bereits erste Proteine identifiziert, welche bevorzugt an den Domänengrenzen lokalisiert sind [Nicolini et al., 2006].

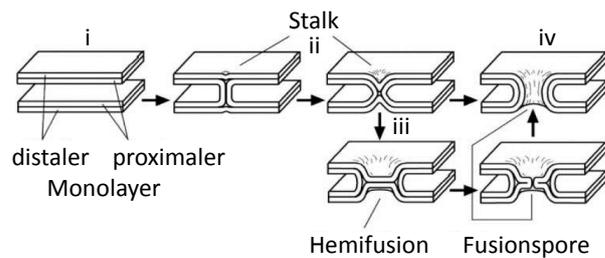


Abbildung 2.10
Stalk-Modell für die Fusion zweier Lipidbilayer. Die Fusion besteht aus den Schritten Membrankontakt (i), *Stalk*bildung durch Fusion der proximalen Monolayer (ii), gegebenenfalls Hemifusion (iii) und Bildung der Fusionspore durch Fusion der distalen Layer (iv). Modifiziert nach Jahn et al. [2003].

essentielle Mechanismen sind Fusionsprozesse zwischen Krankheitserregern, insbesondere Viren, mit Wirtszellmembranen [Epanand, 2003] sowie Fusionen von eukaryotischen Zellen untereinander [Snell, 1990]. Die Einflussnahme auf Fusionsprozesse ist daher eine mögliche Strategie sowohl von Krankheitserregern [Doherty und McMahon, 2009] als auch von körpereigenen [Zasloff, 1992; Roes et al., 2006] und körperfremden [Domingues et al., 2009] Molekülen der Immunabwehr.

Obwohl es verschiedene individuelle Fusionsprozesse gibt, liegt ihnen allen ein gemeinsamer genereller Ablauf zugrunde. Dieser wird in der *Stalk*-Hypothese von Kozlov und Markin [1982] konkretisiert, welche in Abbildung 2.10 skizziert wird. Zunächst müssen die beiden Membranen sich soweit annähern und dabei die unter anderem elektrostatisch bedingte Energiebarriere überwinden, dass molekulare Wechselwirkungen der proximalen Membranlayer möglich werden. Es kommt zum Andocken der Membranen und im Folgenden zur Verbindung und Vermischung der proximalen Layer. Durch den auf die distalen Monolayer wirkenden Krümmungsstress bildet sich ein *Stalk*²⁴ und daraus eine Fusionspore, die eine Verbindung der beiden wässrigen Medien darstellt [Jahn et al., 2003; Chernomordik und Kozlov, 2008].

Das Überwinden der Energiebarriere zur Einleitung eines Fusionsprozesses kann durch verschiedene Mechanismen geschehen. Ihnen ist gemeinsam, dass sie die Integrität der Membran über Defektbildung oder Modifikation der mechanischen Eigenschaften beziehungsweise des Phasenverhaltens beeinflussen [Cevc und Richardsen, 1999]. Virale Fusions-Glycoproteine, welche den gesamten Fusionsprozess bewerkstelligen, werden durch einen Triggermechanismus, beispielsweise eine Senkung des pH-Werts oder die Bindung eines Rezeptors, aktiviert. Sie befördern dann ein C-terminales Fusionspeptid in die Wirtszellmembran, sodass das Protein beide Membranen verbindet [Eckert und Kim, 2001]. Die viralen Fusionspeptide katalysieren die Fusion unter anderem durch die Induzierung von negativer Membrankrümmung, was für Fusionsprozesse im Allgemeinen einen wichtigen Triggermechanismus darstellt [Epanand und Epanand, 2000]. Intrazelluläre Fusionsprozesse, beispielsweise von Transportvesikeln, werden von unterschiedlichen Proteinen im Verbund realisiert. Dabei sind häufig Rab-Proteine für das Andocken an die Zielmembran zuständig, während SNARE-Proteine die eigentliche Fusion bewerkstelligen [Jahn et al., 2003; Bonifacino und Glick, 2004].

Neben Fusionsproteinen oder Peptiden, welche die Membranintegrität beeinflussen und Fusionen forcieren können, haben auch Membranlipide einen großen Einfluss auf Fusionsprozesse. Während PS durch den negativen Ladungsüberschuss eine zusätzliche Barriere

²⁴Ein *Stalk* im Sinne der Membranfusion ist eine in der lateralen Ebene annähernd punktförmige Verbindung der beiden Membranen, deren proximale Monolayer bereits fusioniert sind, während die distalen Monolayer aber noch nicht miteinander im Kontakt stehen.

für Membranfusionen bildet, kann die Anwesenheit von PE, begründet in der negativen Krümmungstendenz, diese Prozesse begünstigen [Domanska et al., 2010]. Eine Relevanz für Fusionsprozesse haben desweiteren der Packungsparameter und Cholesterol durch die Ausbildung cholesterolhaltiger Domänen oder *Lipid Rafts*, welche eine Aktionsplattform für Fusionsproteine und relevante Rezeptoren darstellen [Hissa et al., 2012]. Der Effekt der Linienspannung an Domänengrenzen wurde in Abschnitt 2.7 erläutert.

Schließlich werden Membranfusionen auch direkt durch die Anwesenheit zweiwertiger Ionen wie Kalzium oder Magnesium begünstigt [Papahadjopoulos et al., 1976]. Papahadjopoulos et al. [1977] zeigten, dass dieser Effekt stark mit der Beeinflussung des Phasenverhaltens der Membranlipide assoziiert ist sowie mit einer auftretenden Phasenseparation²⁵.

Kommt es zur Bildung der Fusionspore, so tritt häufig ein Flimmern der Pore auf, welches über Strommessungen nachgewiesen werden kann und unabhängig von der Anwesenheit von Fusionsproteinen ist [Chanturiya et al., 1997]. Letzteres ist ein Hinweis darauf, dass Fusionen zwar durch Proteine katalysiert werden können, die Fusionspore aber rein lipidischer Natur ist. Nach dem Porenflimmern kann sich die Pore entweder wieder schließen oder aber weiter ausdehnen, sodass sich die beiden Membranen vereinigen können [Anantharam et al., 2012].

2.9 Die Diversität biologischer Membranen

Die Diversität unterschiedlicher Lipidspezies in der Natur ist enorm - ist die offensichtlichste Funktion biologischer Membranen die Abgrenzung einzelner Reaktionsräume, so geht die Funktionalität von Lipiden weit darüber hinaus [Dowhan, 1997]. Allein im humanen Blutplasma konnten Quehenberger et al. [2010] knapp 600 verschiedene Lipide identifizieren, davon über 100 verschiedene Sphingomyeline. In eukaryotischen Zellen liegt die Anzahl der chemisch differenzierbaren Lipidspezies weit über 1000 [van Meer et al., 2008], die Anzahl der theoretisch möglichen Subspezies liegt in der Größenordnung von 10^6 [Yetukuri et al., 2008]. Dabei werden Lipide auf funktionaler Ebene teilweise mit hoher Spezifität erkannt [Spector und Yorek, 1985; Scott et al., 2012; Olson et al., 1985; Salim et al., 1996]. Die Lipide können den in Abschnitt 2.2 angeführten Hauptkategorien zugeordnet werden und lassen sich jeweils bestimmten Lipidklassen wie PC oder SM zuordnen. Die Funktionalität von Membranen wird wesentlich durch deren lokale Lipidzusammensetzung bestimmt, welche sowohl zwischen den Membranen unterschiedlicher Spezies und unterschiedlicher Organellen variiert als auch unter den einzelnen Lipidlayern und innerhalb der lateralen Membranebene [van Meer, 2005]. Lipidzusammensetzungen können gut über den molaren Anteil der verschiedenen Lipidklassen charakterisiert werden.

Glycerophospholipide machen zwischen 40% und 60% der Lipide biologischer Membranen aus, hinzu kommen häufig Sphingolipide und Sterole²⁶ [Eeman und Deleu, 2010].

Die Zellhüllen verschiedener Bakterien können eine oder zwei Lipidmembranen aufweisen, wie in Abbildung 2.11 am Beispiel von Mykobakterien, Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien gezeigt ist. Gram-positive Bakterien verfügen über eine einzel-

²⁵Die Autoren spekulieren darüber hinaus über eine mögliche Rolle der Domänengrenzen als „Regionen struktureller Diskontinuität“ in diesem Zusammenhang [Papahadjopoulos et al., 1977, S. 596].

²⁶Cholesterol ist das häufigste Sterol in eukaryotischer Membranen, Ergosterol in Pilzen, Hefen und Protozoen und deren chemischer Vorläufer Lanosterol in Prokaryoten [Eeman und Deleu, 2010].

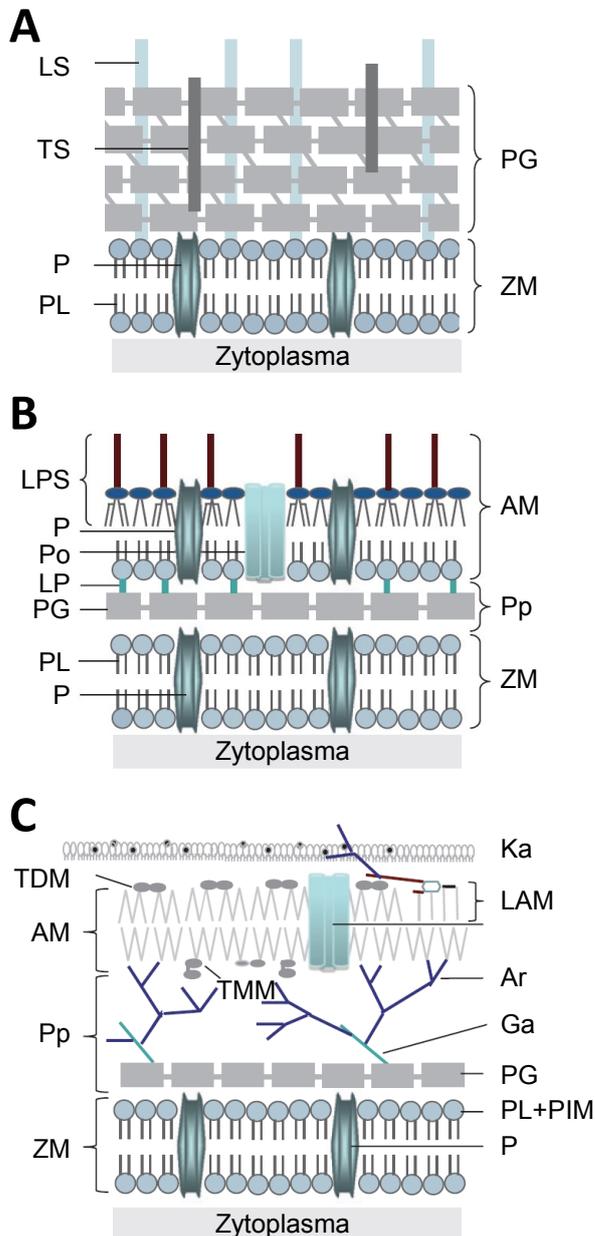


Abbildung 2.11

Schematischer Vergleich von Gram-positiver (A), Gram-negativer (B) und mykobakterieller (C) Zellhülle. Die Zytoplasmamembran (ZM) Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien setzt sich aus Phosphoglycerolipiden (PL) und Membranproteinen (P) zusammen, bei Mykobakterien ist außerdem Phosphatidylinositolmannoside (PIM) enthalten. Während die Gram-positive Zellhülle eine dicke Peptidoglycanschicht (PG) aufweist, ist diese sowohl bei Gram-negativen als auch bei Mykobakterien dünner und bildet das Periplasma (Pp) zwischen der Zytoplasmamembran und einer zweiten, äußeren Membran (AM). Die äußere Membran der Gram-negativen Bakterien besteht aus einem inneren Layer aus Phosphoglycerolipiden und einem äußeren Layer aus Lipopolysacchariden (LPS) und ist durch Lipoproteine (LP) mit dem Peptidoglycan verbunden. Die wachsartige äußere Membran der Mykobakterien ist durch Arabinan (Ar) und Galactan (Ga) mit dem Peptidoglycan verknüpft. Der innere Layer enthält unter anderem Mykolsäuren, der äußere Glycerolipide wie Trehalose Dimykolat (TDM) und Phosphoglycerolipide. Umgeben ist die äußere mykobakterielle Membran von der Kapsel (Ka). Weitere Abkürzungen: Teichonsäure (TS), Lipoteichonsäure (LS), Porin (Po), Lipoarabinomannan (LAM), Trehalose Monomykolat (TMM). Modifiziert nach Catalão et al. [2013].

ne Zytoplasmamembran, welche größtenteils aus Glycerophospholipiden gebildet wird und von einer dicken Peptidoglycanschicht umgeben ist. Die äußere Membran Gram-negativer Bakterien enthält in der äußeren Schicht Lipopolysaccharide (LPS), in der inneren Schicht Glycerophospholipide - die innere Membran dagegen besteht hauptsächlich aus Glycerophospholipiden [Catalão et al., 2013]. Neben LPS sind die häufigsten Lipide, abhängig von der Bakterienspezies, PE, Phosphatidylglycerol (PG) und Cardiolipin (CL) [Epanand und Epanand, 2009]. Die Zellhülle von Mykobakterien, die zu den Gram-positiven Bakterien gehören, ist von komplexerer Natur, auch hier finden sich aber zwei Membranen, von denen wiederum die äußere aus spezifischen Mykolsäure enthaltenden Lipiden aufgebaut ist [Catalão et al., 2013]. Komponenten der inneren mykobakteriellen Membran sind neben PE und PG auch Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylinositolmannoside (PIM) [Brennan und Nikaido, 1995].

Die häufigsten Lipidklassen in eukaryotischen Membranen sind PC, PE, PS, CL, PI, SM und Cholesterol, wobei PC über 50% und PE etwa 20% ausmacht [van Meer, 2005; van Meer et al., 2008]. Die Plasmamembran hat dabei einen höheren Anteil an Sphingolipiden und Sterolen. Abbildung 2.12 zeigt die Lipidzusammensetzung eukaryotischer Plasma- und Organellmembranen, außerdem werden die Syntheseorte verschiedener Lipidklassen angegeben. Die häufigen Lipidklassen PC, PE, PS und PI werden am ER und am Golgi-Apparat synthetisiert [Henneberry et al., 2002], typische bakterielle Lipide wie PG und CL am Mitochondrium. Die lokale Synthese der Lipide ist eine der Ursachen für die unterschiedliche Komposition der Organellmembranen [van Meer et al., 2008]. Eine Reihe von Synthese- und Abbauprozessen findet auch direkt an der Plasmamembran statt [Di Paolo und De Camilli, 2006].

Zur Lipidkomposition von Membranen kann auch deren Asymmetrie gezählt werden. Sämtliche biologische Membranen weisen einen gewissen Grad der Asymmetrie auf, sowohl bakterielle Membranen [Boon und Smith, 2002] als auch eukaryotische Membranen. In diesen befinden sich PE und PS zu einem größeren Anteil im inneren Layer und PC und SM dagegen im Äußeren [Eeman und Deleu, 2010]. Cholesterol ist wegen der hohen Flip-Flop Rate in beiden Lipidschichten gleich verteilt. Eine Aufhebung der Asymmetrie kann für die Membran dramatische Folgen haben, da essentielle Funktionalitäten wie Fusionsprozesse und Signalweiterleitung auf die ungleiche Lipidverteilung angewiesen sind [Verkleij und Post, 2000; Boon und Smith, 2002]. Eine Anreicherung von PS in der äußeren Lipidschicht der Zellmembran stellt zudem ein Anzeichen für die Einleitung eines Apoptoseprozesses dar [Martin et al., 1995]. Die asymmetrische Verteilung von Lipiden kann dabei auch durch einen transmembranen pH-Gradienten beeinflusst werden, so reichern sich Sphingolipide an der Seite niedrigerem pH-Werts an, PG bevorzugt die Seite des höheren pH-Werts [Boon und Smith, 2002].

2.10 Möglichkeiten und Grenzen biophysikalischer Untersuchungen an Modellmembranen

Um Fragestellungen zu universellen und spezifischen Membraneigenschaften und zu molekularen Prozessen an Membranen beantworten zu können, ist es aufgrund der hohen Komplexität natürlicher Membranen oftmals sinnvoll, auf kontrollierbare reduzierte Systeme zurückzugreifen. Solche Systeme sind rekonstituierte Modellmembranen, welche zur Untersuchung mit biologischen oder physikalischen Methoden geeignet sind. Die Reduktion

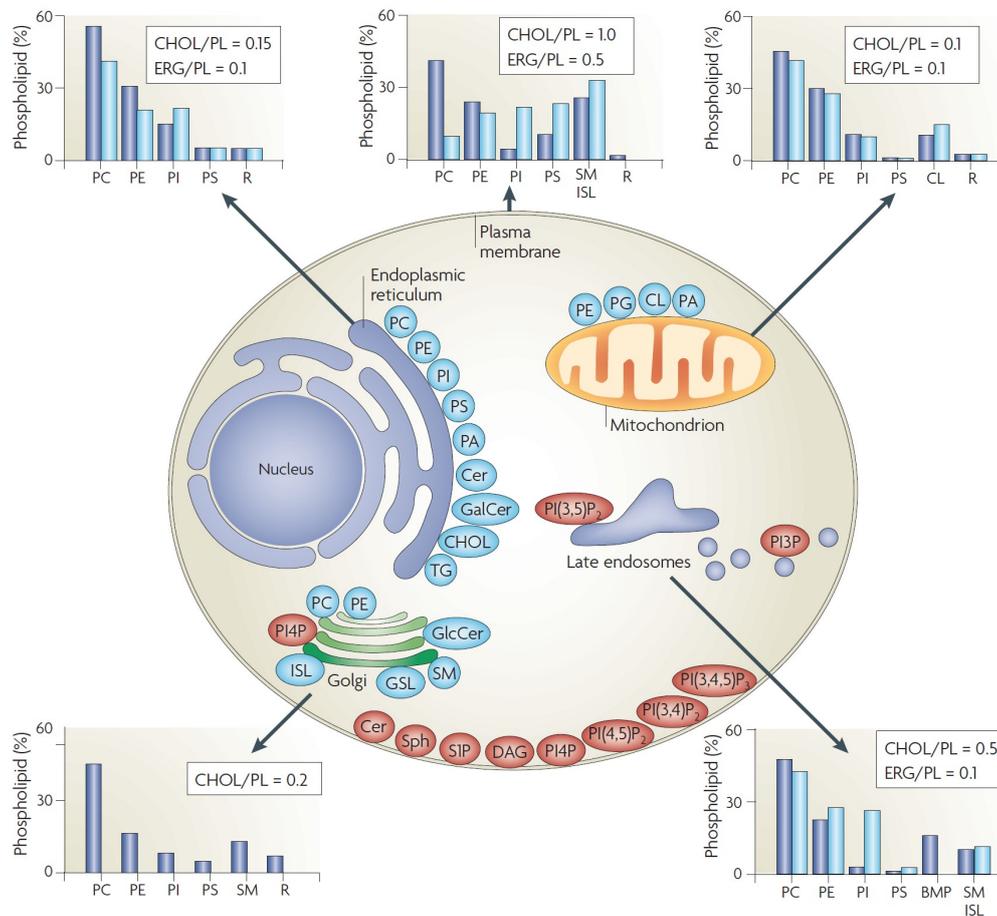


Abbildung 2.12

Intrazelluläre Lipidsynthese und Lipidzusammensetzung von Zell- und Zellorganellmembranen. Die Diagramme geben den prozentualen Anteil verschiedener Lipidspezies in Säugetier- (blau) und Hefemembranen (hellblau) an sowie das molare Verhältnis zwischen den entsprechenden Sterolen und Membranlipiden (hier: PL). In allen Organellmembranen wie auch in der Plasmamembran sind Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) am häufigsten vertreten. Der Anteil von Phosphatidylserin (PS) ist in der Plasmamembran am höchsten, während Sphingomyelin (SM) hauptsächlich in Plasma- und Golgimembranen auftritt. Der Anteil der restlichen Lipide wird mit „R“ angegeben. In der Grafik werden die Orte der Synthese von Membranlipiden (blaue Kreise) und Signal- und Organellerkennungslipiden (rote Kreise) gekennzeichnet. Letztere machen dabei nur einen geringen Anteil der Gesamtlipidmenge aus und werden hauptsächlich an der Plasmamembran synthetisiert. An den Zytosolmembranen von Golgi-Apparat und endoplasmatischem Retikulum (ER) wird der Großteil der Membranlipide synthetisiert, Mitochondrien synthetisieren dagegen auch bakterientypische Lipide wie Phosphatidylglycerol (PG) und Cardiolipin (CL). Aus van Meer et al. [2008].

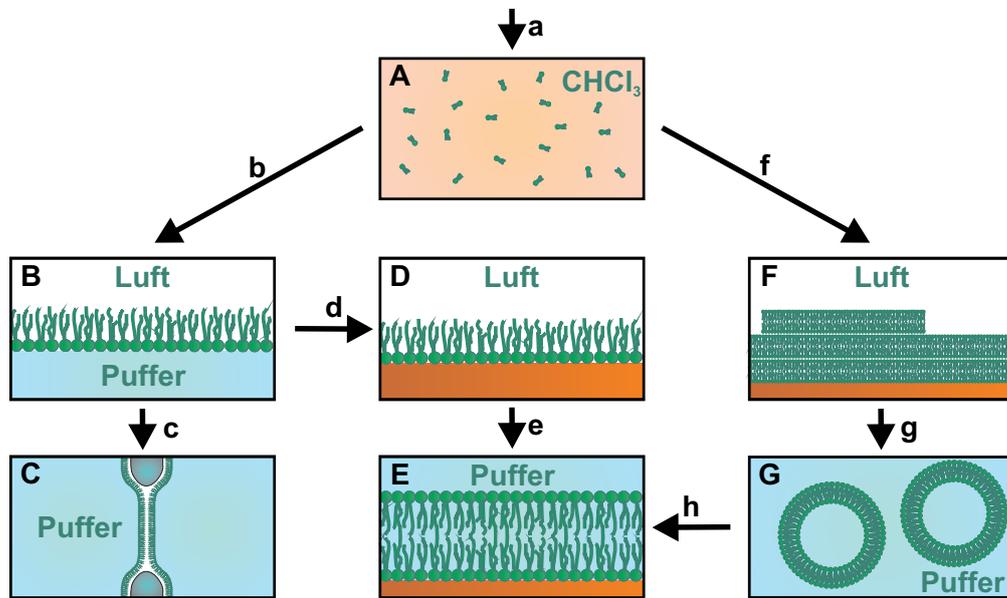


Abbildung 2.13

Unterschiedliche Membranrekonstitutionssysteme (Großbuchstaben) sowie deren präparativer Zusammenhang (Kleinbuchstaben). Die Auswahl ist an die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Methoden angepasst. (A) Freie Lipidmonomere in chloroformischer Phase. (a) Lipidpulver wird in Chloroform gelöst. (B) Lipidmonolayer. (b) Chloroformische Lipidlösung wird auf die Flüssigkeitsoberfläche aufgetropft. (C) Freistehender Lipidbilayer im Montal-Mueller Setup. (c) Lipidmonolayer werden in zwei Kompartimenten, deren Flüssigkeitsspiegel unterhalb einer verbundenen Apertur liegt, präpariert. Bei Erhöhung der Flüssigkeitsspiegel bildet sich über der Apertur spontan ein freistehender Bilayer. (D) Festkörperunterstützter Monolayer; Langmuir-Blodgett-Film. (d) Monolayer wird auf geeignetes Substrat übertragen (Langmuir-Blodgett-Übertrag). (E) Festkörperunterstützter Bilayer. (e) Wiederholter Langmuir-Blodgett-Übertrag führt zu einer Lipiddoppel- oder Mehrschicht. (F) Lipidmultilayer. (f) Chloroformische Lösung wird auf ein Substrat gegeben und unter Stickstoff eingeengt. (G) Lipidliposomen. (g) Kleine unilamellare Vesikel (SUVs): Durch Ultraschallbehandlung schnüren sich Liposomen spontan vom Multilayer ab. (h) SUVs spreiten auf einem geeigneten Substrat. Für eine nähere Beschreibung der einzelnen Präparationstechniken siehe Kapitel 4.

der Lipidzusammensetzung kann den Anforderungen der Fragestellung angepasst werden. Prinzipiell kann sie sich, angefangen bei Einkomponentensystemen chemisch uniformer synthetischer Lipidspezies über symmetrische und asymmetrische Mehrkomponentensysteme, aufgereinigte heterogene Lipidspezies und Gesamtlipidextraktionen bis zur Verwendung kompletter Membranpatches natürlicher Herkunft, dem natürlichen System annähern. Je stärker das Lipidsystem reduziert wird, desto einfacher wird eine Aussage über generelle Mechanismen, je näher am natürlichen System gearbeitet wird, desto besser ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die tatsächliche Situation. Daher ist es häufig eine gute Strategie, von einfachen Systemen beginnend die Komplexität schrittweise zu erhöhen und damit nach und nach weitere Aspekte wie Membranasymmetrie, Lipiddomänen und relevante Proteine in die Experimente einzubeziehen. Eine Einschränkung bildet in vielen Fällen der begrenzte Kenntnisstand über das natürliche System, beispielsweise über die exakte Lipidzusammensetzung.

Eine Übersicht über verschiedene, in der vorliegenden Arbeit verwendete Rekonstitutionsysteme wird in Abbildung 2.13 gegeben. Die einfachsten Systeme sind Lipidmonolayer, welche sich an der Grenzfläche zwischen Luft und einem wässrigen Medium ausbilden. Sie gewähren über die Messung des Lateraldrucks und der mittleren Fläche pro Molekül Zugang zu Phasenverhalten [Blume, 1979] und zu Proteineinbau aus der wässrigen Phase [Schwarz und Taylor, 1995]. Nach Blodgett [1934] können diese Monolayer als Langmuir-Blodgett-Film (LB-Film) auf ein geeignetes Substrat übertragen werden.

Freistehende planare Lipiddoppelschichten überspannen eine zwei Kompartimente verbindende Apertur und können entweder als schwarze Lipidmembran (BLM) direkt auf die Apertur aufgetragen werden (Mueller-Rudin Methode) [Mueller et al., 1962] oder nach Montal und Mueller [1972] aus zwei unabhängigen Lipidmonolayern aufgezogen werden (Montal-Mueller Methode). Sie ermöglichen elektrische Messungen und damit detaillierte Untersuchungen von Membraneigenschaften wie Membranpotential [Hagge et al., 2004] und Membrantransportprozessen [Gutsmann et al., 2015]. Die wesentlichen Nachteile dieser Systeme sind die Instabilität und das Zurückbleiben von Lösungsmittelresten in der Membran [Reimhult und Kumar, 2008].

Lipidmultilayer können außer durch mehrfachen LB-Übertrag auch durch Einengung einer Lipidlösung in organischem Lösungsmittel präpariert werden [Seul und Sammon, 1990], wodurch sich spontan planare lamellare Systeme mit mehreren tausend Schichten bilden. Diese eignen sich aufgrund der hohen Periodizität hervorragend für Röntgenbeugungsanalysen struktureller Membraneigenschaften und deren Beeinflussung durch membranaktive Substanzen [Schneggenburger et al., 2011].

Außerdem bilden Multilayersysteme die Grundlage zur Herstellung von Lipidliposomen. Diese sind in sich geschlossene Lipiddoppel- oder Mehrfachschichten in wässrigem Medium, deren Durchmesser von weniger als 100 nm (kleine uni- oder multilamellare Vesikel, SUVs oder SMVs) über 100 bis 1000 nm (große uni- oder multilamellare Vesikel, LUVs oder LMVs) bis hin zu mehreren Mikrometern (riesige uni- oder multilamellare Vesikel, GUVs oder GMVs) reicht und damit die Abmessungen von Zellen oder Mikroorganismen entsprechen kann [Mouritsen, 2011b; Eeman und Deleu, 2010]. Vesikel werden häufig zur Untersuchung von Fusionsprozessen oder für fluoreszenzspektroskopische Analysen eingesetzt. Durch ihre Größe sind GUVs in Lichtmikroskopen auflösbar und können durch Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen zur optischen Charakterisierung von Phasenverhalten und Domäneneigenschaften verwendet werden [Dietrich et al., 2001]. Darüber hinaus können Liposomen in medizinischen Anwendungen zum Transport von eingeschlossenen

Substanzen eingesetzt werden [Ulrich, 2002]. Die Lipidzusammensetzung von Vesikeln, von der das Phasenverhalten stark abhängig ist, kann präparationsbedingt vom eingesetzten Verhältnis abweichen [Eeman und Deleu, 2010]. Bedingt durch den auf Energiezufuhr basierenden Präparationsprozess befinden sich Liposomen häufig im thermodynamischen Ungleichgewicht, wodurch sie zu Fusionsprozessen neigen können und Alterungseffekten unterliegen [Marques, 2000] - die Qualität der Liposomen hängt also in hohem Maß von den Präparationsbedingungen ab.

Durch Fusionsprozesse auf geeigneten Substraten können Liposomen auf der Oberfläche spreiten und zu festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten verschmelzen [Richter et al., 2006]. Durch zweimaligen LB-Übertrag können ähnliche Systeme generiert werden, hier müssen allerdings der Lateraldruck und die Übertragungsgeschwindigkeit aktiv kontrolliert werden [Schwartz, 1997]. Die Kopplung an eine Oberfläche bietet dem Experimentator eine Reihe von Vorteilen. Dazu gehören die hohe Stabilität, die Möglichkeit von Untersuchungen der Membrantopologie und lateraler Eigenschaften und die Anwendbarkeit oberflächen-sensitiver Techniken [Chan und Boxer, 2007]. Andererseits ist aber die Membran in den meisten Fällen nur von einer Seite zugänglich und Fluidität und Phasenverhalten sind durch Wechselwirkung mit dem Substrat gegenüber der natürlichen Situation modifiziert [Jensen et al., 2007]. Um die Membran von der Oberfläche zu entkoppeln, können Bilayer auf Spacermolekülen (*tethered membrane*) oder unterpolsternden Polymeren (*cushed membrane*) immobilisiert werden, was zudem die Einbettung von größeren Proteinen unter Erhalt der Funktionalität ermöglicht [Sackmann und Tanaka, 2000; Richter et al., 2006]. Planare freistehende Membranen und insbesondere in sich geschlossene Lipidliposomen liefern daher unter diesem Gesichtspunkt realistischere Nachstellungen - allerdings werden Fluidität und Phasenverhalten auch maßgeblich durch die Kopplung an das Zytoskelett reguliert, was keines dieser Modellsysteme adäquat nachstellen kann [Nicolson, 2014].

Wird für die Erzeugung eines Bilayers ein poröses Substrat verwendet, so erhält man eine porenüberspannende Membran, welche die Stabilität von festkörperunterstützten Membranen mit der Flexibilität und Zugänglichkeit von freistehenden Membranen vereint [Reimhult und Kumar, 2008] und damit eine gewisse Ähnlichkeit zur Verankerung am Zytoskelett aufweist [Kocun et al., 2011]. Im einfachsten Fall geschieht dies durch LB-Übertrag [Jones et al., 1990; Reimhult und Kumar, 2008]. Das Spreiten von GUVs auf entsprechenden Substraten führt zu mikrometergroßen Membranpatches, deren Eigenschaften optisch und mechanisch untersucht werden können [Kocun et al., 2011] und die darüber hinaus auch für die Erforschung von Membrantransportprozessen geeignet sind [Wang et al., 2012].

Ein wichtiges Unterscheidungskriterium von Modellsystemen ist die Möglichkeit, die Asymmetrie natürlicher Membranen im Rekonstitutionssystem nachstellen zu können. Nur in wenigen Fällen ist dies im Rahmen der gängigen Präparationstechnik möglich. Dazu gehören die freistehenden, nach der Montal-Mueller Methode präparierten Bilayer. Auch der von Blodgett [1934] entwickelte Übertrag von Monolayern auf ein Substrat ermöglicht bei wiederholter Durchführung die Herstellung asymmetrischer Lipiddoppelschichten [Rinia und de Kruijff, 2001]. Für asymmetrische Lipidliposomen wurden in den letzten Jahren spezielle Präparationstechniken etabliert. So lassen sich durch die Zentrifugation von Monolayer-umschlossenen Wassertröpfchen aus einer unpolaren Phase in eine wässrige Phase und durch einen Monolayer an deren Grenzfläche asymmetrische GUVs präparieren [Pautot et al., 2003]. Durch Cyclodextrin-vermittelten Lipidaustausch können sogar asymmetrische SUVs realisiert werden [Cheng und London, 2009].

Bei der Verwendung von Rekonstitutionssystemen sollten immer die individuellen Eigenschaften des jeweiligen Systems berücksichtigt werden²⁷ - sowohl für den kombinierenden Vergleich der Systeme untereinander als auch für den Rückschluss auf die Eigenschaften natürlicher Membranen. Gerade wegen der begrenzten Gültigkeit der Ergebnisse einzelner Systeme ist es sinnvoll, zur Beantwortung einer biologischen Fragestellung verschiedene Methoden einzusetzen. Die wohl dramatischste Einschränkung der Allgemeingültigkeit von Experimenten an Modellmembranen ist die Reduzierung der Diversität biologischer Membranen auf wenige Lipidspezies sowie auf wenige bis keine Membranproteine. Gleichzeitig definiert dies durch die Vereinfachung der hochkomplexen Situation an natürlichen Membranen den wesentlichen Nutzen von Messungen an Modellmembranen.

²⁷Genannt seien an dieser Stelle beispielhaft Präparationstechnik, Lösungsmittel, Oberflächenkopplung, Beeinflussung des Systems durch den Messprozess, Fluoreszenzmarkierung und mögliche Modifizierung des Phasenverhaltens.

Kapitel 3

Rhodococcus equi und die Phagosomenreifung

Nachdem in Kapitel 2 die grundlegenden Eigenschaften von Lipidmembranen und speziell von Modellmembranen behandelt wurden, wird es in diesem Kapitel um die Thematik der biologischen Fragestellung der vorliegenden Arbeit gehen.

Um die Relevanz der Wechselwirkung zwischen VapA und der Phagosomenmembran einordnen zu können, befasst sich Abschnitt 3.1 zunächst mit wichtigen Aspekten von angeborenem und adaptivem Immunsystem. Der Prozess der Phagozytose von Krankheitserregern durch spezialisierte Phagozyten, der einen Schlüsselprozess der angeborenen Immunität und gleichzeitig eine Verbindung mit der adaptiven Immunität bildet, ist das Thema von Abschnitt 3.2. Das durch die Phagosomenmembran abgegrenzte Phagosom definiert die für den am Rekonstitutionssystem untersuchten Wirkmechanismus relevanten Umgebungsbedingungen. Seine primäre Funktion, die Zersetzung der eingeschlossenen Mikroorganismen, wird durch den Prozess der Phagosomenreifung realisiert, welcher in Abschnitt 3.3 verständlich gemacht werden soll.

Abschnitt 3.4 gibt eine Einführung in die Thematik intrazellulärer Pathogene und stellt verschiedene Vertreter dieser Kategorie und deren Strategien vor, die es ihnen ermöglichen, die Phagosomenreifung zu überleben. Als fakultativ intrazelluläres Bakterium wird die Art *R. equi* in Abschnitt 3.5 vorgestellt. Neben der klassifizierenden Beschreibung und der Anführung einiger epidemiologischer Eigenschaften wird eine Zusammenfassung der wichtigsten bisherigen zellbiologischen Erkenntnisse zur Beeinflussung der Phagosomenreifung gegeben.

Das Protein VapA wird durch *R. equi* im Phagosom exprimiert und freigesetzt und bildet zusammen mit der Phagosomenmembran den Gegenstand der vorliegenden Arbeit. In Abschnitt 3.6 werden der Ursprung, eine mögliche Wirtsspezifität sowie die kürzlich aufgeklärte Struktur des in großen Teilen homologen Proteins VapB erläutert und zudem auf experimentelle Indizien für eine aktive Beteiligung des Proteins am Prozess der Hemmung der Phagosomenreifung hingewiesen.

3.1 Abwehrmechanismen des Körpers

Lebende Organismen müssen ihren Anspruch auf ein Fortbestehen für die gesamte Dauer ihrer Existenz gegenüber anderen Organismen und äußeren Bedrohungen verteidigen, und zwar sowohl auf evolutionärer Ebene als auch auf individueller, existenzieller Ebene. Hierzu gehört auch, sich des ständigen Ansturms von Mikroorganismen erwehren zu können, die die Funktionsfähigkeit mehrzelliger Organismen bedrohen können. In der Evolutionsgeschichte hat sich schon sehr früh ein Abwehrmechanismus, das Immunsystem, etabliert, welcher genau dies bewerkstelligen kann. Das Immunsystem wird generell unterteilt in angeborenes und adaptives Immunsystem. Während letzteres den Wirbeltieren vorbehalten ist, ist das angeborene Immunsystem hochkonserviert in allen mehrzelligen Lebewesen, beispielsweise auch in Pflanzen, ausgebildet und muss sich daher in einem frühen Stadium der Evolution entwickelt haben¹ [Hoffmann et al., 1999].

Allgemein besteht das Immunsystem in der „Fähigkeit, eindringende Mikroorganismen zu erkennen und diese effizient zu eliminieren, ohne sich selbst Schaden zuzufügen“ [Medzhitov und Janeway, 1997a, S. 4]. Die Funktion des angeborenen Immunsystems ist dabei eine schnelle Reaktion auf weit verbreitete Strukturen in Krankheitserregern, was zum einen die Erkennung und zum anderen eine entsprechende Wirkung einschließt. Für die Erkennung besteht die Anforderung, trotz hoher Mutationsraten in Mikroorganismen und einer endlichen Anzahl im Erbgut hinterlegbarer Strukturen auf eine möglichst hohe Bandbreite von eindringenden Krankheitserregern ansprechen zu können [Medzhitov und Janeway, 1997a]. Dies ist die Ursache, warum das angeborene Immunsystem auf die Erkennung sogenannter PAMPs (Krankheitserreger-assoziierte molekulare Strukturen) spezialisiert ist. Bei diesen handelt es sich um unter Krankheitserregern weit verbreitete überlebenswichtige und daher hochkonservierte, molekulare Strukturen, welche im Wirtsorganismus nicht auftreten² [Janeway, 1989]. Strukturmuster erkennende Rezeptoren (PRRs), zu denen die Familie der Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) gehört, sind Proteine des angeborenen Immunsystems, die PAMPs erkennen und die Immunantwort einleiten können. Für sie besteht explizit die Notwendigkeit, Eigenes von nicht Eigenem unterscheiden zu können [Janeway Jr und Medzhitov, 2002].

Darüber hinaus kann das angeborene Immunsystem auch auf molekulare Strukturen reagieren, welche für beschädigtes Gewebe spezifisch und somit körpereigen sind. Diese Strukturen werden als DAMPs (Schädigungs-assoziierte molekulare Strukturen) bezeichnet [Rosin und Okusa, 2011]. Sowohl PAMPs als auch DAMPs führen nach dem Erkennungsprozess den ersten Schritt der Immunantwort, die Ausschüttung von Chemokinen oder Zytokinen, herbei [Medzhitov und Janeway, 1997b; Newton und Dixit, 2012]. Die Zusammenhänge des angeborenen Immunsystems werden in Abbildung 3.1 zusammengefasst.

Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen (professionelle Antigen präsentierende Zellen, APZ) können durch PRRs erkannte Pathogene durch Phagozytose (siehe Abschnitt 3.2) in sich aufnehmen, und Fragmente der Krankheitserreger auf ihrer Oberfläche präsentieren [Rosin und Okusa, 2011; Greenberg

¹Die enge Verzahnung angeborener und adaptiver Immunität und die Entdeckung adaptiver Elemente in wirbellosen Tieren stellen die strikte Zweiteilung der Immunologie jedoch mehr und mehr in Frage [Flajnik und Du Pasquier, 2004].

²Ein sehr prominentes Beispiel für ein PAMP ist LPS, welches auch Endotoxin genannt wird und allen Gram-negativen Bakterien gemeinsam ist [Rietschel et al., 1994].

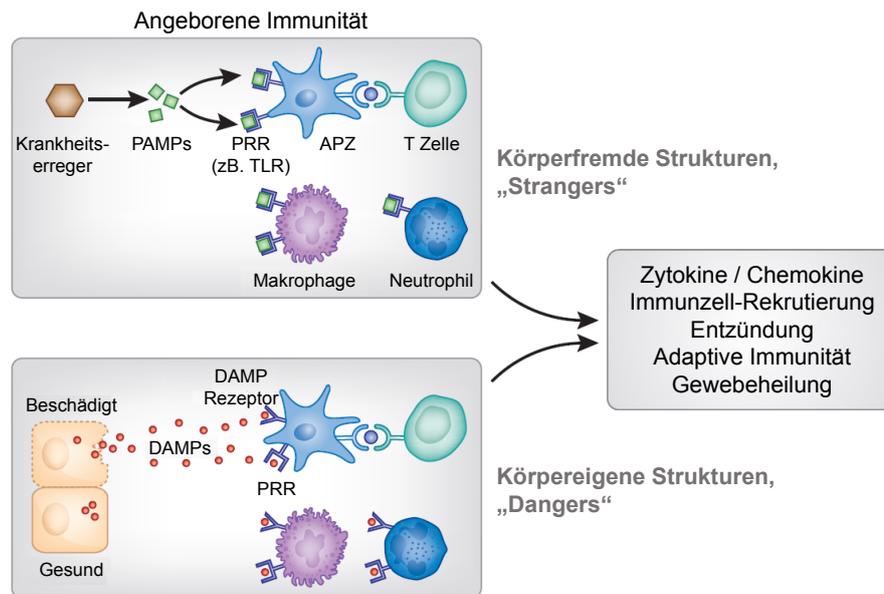


Abbildung 3.1

Zusammenhänge des angeborenen Immunsystems nach dem *Danger*- und *Stranger*-Modell. In den Organismus eingedrungene Krankheitserreger können PAMPs freisetzen, die wiederum von PRRs erkannt werden (oben). Analog können durch Gewebe- beziehungsweise Zellschädigung DAMPs freigesetzt werden, welche sich ansonsten nur innerhalb der Zellen befinden und die von PRRs oder spezifischen DAMP Rezeptoren erkannt werden (unten). Verschiedene Zelltypen wie APZ, Makrophagen, T-Zellen und Neutrophile sind am Erkennungsprozess und an der Einleitung der Immunantwort beteiligt. Diese kann in der Freisetzung von Zytokinen oder Chemokinen bestehen, der Immunzellrekrutierung, Entzündungsprozessen, der Gewebeheilung oder der Aktivierung der adaptiven Immunität. Modifiziert nach Rosin und Okusa [2011].

und Grinstein, 2002]. Für die Antigenpräsentation sind Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle (MHC-Moleküle) der Klassen I und II verantwortlich [Jutras und Desjardins, 2005; Iwasaki und Medzhitov, 2010]. Die Antigenpräsentation stellt eine Verbindung zur adaptiven Immunität dar [Aderem, 2003]. Neutrophile sind ebenfalls an der Phagozytose beteiligt, gehören aber nicht zu den APZ. Sie zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, netzartige neutrophile extrazelluläre Fallen (NETs) zu bilden, deren Hauptbestandteil DNA ist und die durch lokal konzentrierte antimikrobielle Substanzen Krankheitserreger im extrazellulären Raum wirksam bekämpfen können [Brinkmann et al., 2004].

Neben der zellulären Komponente verfügt das angeborene Immunsystem über humorale Bestandteile in Form von freien Molekülen im extrazellulären Raum. Dazu gehören neben Cytokinen und Chemokinen die antimikrobiellen Peptide (AMPs) und insbesondere die Proteine des Komplementsystems, einem Satz proteolytischer Enzyme zur aktiven Immunabwehr [Beutler, 2004]. AMPs werden sowohl von Epithelzellen, den physischen Barrieren des Immunsystems, als auch von Immunzellen wie Neutrophilen (polymorphonukleäre Granulozyten) gebildet. Sie sind häufig hochspezifisch für Pathogene und können diese über verschiedene Mechanismen abtöten [Zasloff, 1992; Brogden, 2005].

Die Unspezifität und Universalität des angeborenen Immunsystems steht dem adaptiven Immunsystem gegenüber. Durch einen ausgeklügelten Anpassungsprozess der erkennenden

Strukturen ist es diesem System möglich, eine enorme Anzahl hochspezifischer molekularer Strukturen einzelner Krankheitserregerspezies zu detektieren und diese über einen längeren Zeitraum im Repertoire zu behalten [Janeway Jr und Medzhitov, 2002]. Die adaptive Immunantwort tritt gegenüber der angeborenen mit zeitlicher Verzögerung ein. Das Vorliegen einerseits extrazellulärer und andererseits intrazellulärer Pathogene hat nach Janeway [1989] zur Entwicklung von zwei separaten Systemen innerhalb der adaptiven Immunität geführt. B-Lymphozyten (B-Zellen) produzieren Antikörper [Edelman, 1973], die an Zielstrukturen (Antigene) auf extrazellulären Mikroorganismen binden und diese für eine Entsorgung durch das Komplementsystem oder durch Phagozyten markieren können. T-Lymphozyten (T-Zellen) exprimieren in ihrer Membran T-Zell-Rezeptoren, die auf der Außenseite körpereigener Zellen präsentierte Peptidfragmente von intrazellulären Pathogenen erkennen können [Bromley et al., 2001]. Durch diese Erkennung wird die T-Zelle aktiviert und kann die befallene Zelle entweder direkt als zytotoxische T-Zelle oder indirekt als T-Helfer-Zelle abtöten [Janeway, 1989]. Die Wechselwirkung zwischen T-Zell-Rezeptor und der präsentierten Struktur findet innerhalb des Nanometerzwischenraums zwischen beiden Zellen statt, der von Bromley et al. [2001] als immunologische Synapse bezeichnet wird. Innerhalb der „Synapse“ spielen Membrandomänen eine wichtige Rolle zur Kompartimentierung [Bromley et al., 2001].

3.2 Die Entstehung des Phagosoms durch Phagozytose

Die von der Plasmamembran ausgehende Erzeugung neuer intrazellulärer Membranen wird als Endozytose verstanden. In dessen Verlauf werden Lipide und Proteine der Plasmamembran zusammen mit extrazellulären Bestandteilen in die Zelle aufgenommen [Doherty und McMahon, 2009]. Häufige Endozytosemechanismen sind Clathrin-vermittelte und Caveolae-abhängige Endozytose, Makropinozytose³ und Phagozytose [Doherty und McMahon, 2009].

Der Begriff Phagozytose wird für die Aufnahme eines größeren extrazellulären Partikels in das Innere einer Zelle verwendet⁴. Das Partikel wird von einem neu gebildeten Zellkompartiment, dem Phagosom, umschlossen. Während sie einzelligen Lebewesen zur Nahrungsaufnahme dient, übernimmt die Phagozytose in Mehrzellern die Entsorgung von apoptotischen Zellen und ist zudem ein wichtiger Teil des Immunsystems [Desjardins, 2003]. Als professionelle Phagozyten, zu deren Hauptaufgabe die Phagozytose gehört, werden Neutrophile, Makrophagen und Monozyten, deren Vorläufer, und dendritische Zellen bezeichnet [Rabinovitch, 1995; Flannagan et al., 2012]. In ihnen sind neben der Phagozytose weitere wesentliche Funktionen des angeborenen Immunsystems - die Erkennung und der Verdau von Pathogenen - mit der Aktivierung des adaptiven Immunsystems vereint [Jutras und Desjardins, 2005]. Darüber hinaus üben sie regulatorische Funktionen bei Entzündungsreaktionen aus [Aderem, 2003].

³Das Protein Clathrin unterstützt den Vesikelbildungsprozess durch Bildung eines Überzugs auf der Membran, welcher nach der Endozytose aktiv entfernt wird. Caveolae sind tubuläre Domänen der Zellmembran, die durch das Protein Caveolin stabilisiert werden und durch ihre Struktur Endozytose ermöglichen können. Bei der Makropinozytose stülpen sich unebene Erweiterungen um einen extrazellulären Bereich, der anschließend internalisiert wird.

⁴In der Literatur werden als Grenzwert zwischen anderen Endozytoseprozessen und Phagozytose Partikeldurchmesser zwischen 0,4 μm und 1 μm angegeben [Haas, 2007; Tjelle et al., 2000; Greenberg und Grinstein, 2002].

3.2 Die Entstehung des Phagosoms durch Phagozytose

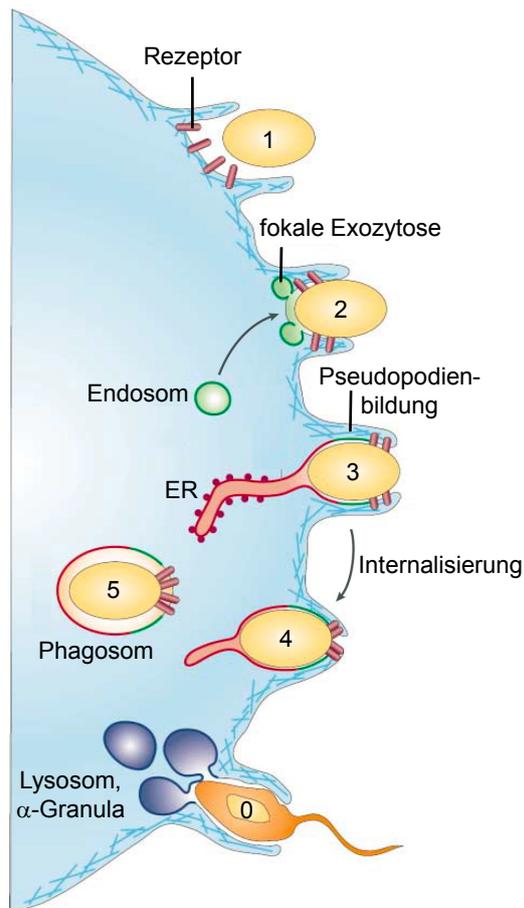


Abbildung 3.2

Modell für den Phagozytoseprozess und beteiligte intrazelluläre Membranen. Durch Zellmembran-Rezeptoren werden markierte extrazelluläre Partikel wie Pathogene erkannt (1) und durch Reorganisation des Zytoskeletts sowie Ausstülpung von Pseudopodien (1-3) in die Zelle aufgenommen (4-5). Die Phagosomenmembran wird potentiell aus Plasmamembran (1), Endosomen (2, grün), ER (3, rot) sowie Lysosomen oder α -Granula (0, blau) rekrutiert. Die abgebildete finale Zusammensetzung der Phagosomenmembran (5) ist als exemplarisch anzusehen, wobei insbesondere die Beteiligung des ER noch umstritten ist. Modifiziert nach Desjardins [2003].

Der von Metschnikoff [1884] entdeckte Prozess der Phagozytose lässt sich, wie in Abbildung 3.2 dargestellt, unterteilen in Erkennung und Bindung des Pathogens oder Partikels, Modifizierung des Zytoskeletts und Ausstülpung von Pseudopodien, Fusion der Membran hinter dem Pathogen sowie Abtrennung des Phagosoms von der Plasmamembran [Aderem, 2003]. Die an der Phagosomenbildung beteiligten Fusionsprozesse vesikulärer intrazellulärer Strukturen werden als fokale Exozytose bezeichnet.

Bevor Phagozytose stattfinden kann, müssen Phagozyt und Zielobjekt miteinander in Kontakt kommen. In wenigen Fällen passiert das chemotaktisch. Für Makrophagen ist bekannt, dass sie ihre Umgebung durch aktive Membranausstülpungen (Pseudopodien) untersuchen [Botelho und Grinstein, 2011]. Die Erkennung des Pathogens durch membranständige Rezeptoren des professionellen Phagozyten erfolgt entweder direkt oder das Pathogen wird zuvor durch Antikörper oder Fragmente von Komplementproteinen opsoniert [Joiner et al., 1984; Bohdanowicz und Grinstein, 2013], also bedeckt. Bakterien können die Opsonierung und damit die Erkennung durch Phagozyten durch Ausbildung einer Polysaccharidkapsel unterwandern [Kozel und Gotschlich, 1982]. Häufige Opsonine sind der Antikörper Immunglobulin G (IgG) und Fragmente des Komplementmoleküls C3 [Joiner et al., 1984; Tosi, 2005]. Der direkte Erkennungs- und Bindungsprozess verläuft dagegen nach dem Schema der PRR-Rezeptoren - beispielsweise wird LPS von Makrophagen durch den Scavenger Rezeptor A erkannt [Peiser et al., 2000].

Durch das Zusammenspiel von Rezeptor und Ligand werden Signale generiert, die

der Einleitung des Internalisierungsprozesses dienen. Die Bindung zwischen Partikel und Rezeptoren des Phagozyten ist relativ schwach, sodass eine Bindung des Pathogens nur durch viele einzelne Rezeptor-Ligand-Bindungen und durch Rezeptoraggregation zustande kommt [Flannagan et al., 2012]. Dies wird durch die eingeleitete Reorganisation und Polymerisierung des Aktin-Zytoskeletts erleichtert, welches die laterale Mobilität der Rezeptoren einschränkt [Jaumouillé und Grinstein, 2011]. Für die Aktinpolymerisierung spielen unter anderem bestimmte PI-Spezies, deren Akkumulation durch die aktivierten Rezeptoren vermittelt wird, eine wichtige Rolle [Bohdanowicz und Grinstein, 2013].

Ausgehend von der durch Lipidregulation⁵ gebildeten phagozytischen Tasse stülpt sich die Plasmamembran in Form von Pseudopodien um das phagozytierte Partikel [Botelho und Grinstein, 2011], woran eine Reihe von Proteinen beteiligt sind. Dieser Prozess wird durch eine kritische Menge von Rezeptor-Ligand-Paaren ausgelöst, welche als Trigger fungieren - bei kleineren Partikeln wird das komplette Partikel ähnlich der Makropinozytose umschlossen. Für größere Partikel werden die Pseudopodien, von schwachen Rezeptor-Ligand-Bindungen unterstützt, reissverschlussähnlich um das Partikel gezogen [Swanson und Baer, 1995; Tjelle et al., 2000; Botelho und Grinstein, 2011]. Ein kompletter Einschluss kommt dabei nur dann zustande, wenn die Anzahl von Rezeptor-Ligand-Paaren ausreichend hoch ist.

Dass die Membranfläche des Phagozyten während der Phagozytose konstant bleibt oder zunimmt, ist ein Hinweis darauf, dass zusätzliche extrazelluläre oder intrazelluläre Membranen in den Prozess der Phagosomenbildung einbezogen werden [Greenberg und Grinstein, 2002; Werb und Cohn, 1972]. Tatsächlich werden schon während des Einschlussprozesses, also vor Abschnürung des Phagosoms durch Membranfusion, Membranen von Lysosomen, Endosomen und dem ER generiert, die sowohl in der Plasmamembran als auch im neu gebildeten Phagosom aufgehen [Desjardins, 2003; Jutras und Desjardins, 2005; Huynh et al., 2007; Haas, 2007]. Die fokale Exozytose von Endosomen am Ort der Phagozytose wurde von Bajno et al. [2000] gezeigt. Das Ausmaß der Rekrutierung zusätzlicher Membranen für die Pseudopodien- beziehungsweise Phagosomenbildung hängt vermutlich von der Größe und Anzahl der phagozytierten Partikel ab [Haas, 2007]. Die Beteiligung des ER an der Phagozytose konnte in einigen Fällen nicht bestätigt werden, zudem ist das Ausmaß der Beteiligung sehr umstritten, da einige Komponenten der ER-Membran der Ansäuerung des Phagosoms entgegenwirken würden [Huynh et al., 2007]. Abbildung 3.2 gibt eine Übersicht über die verschiedenen möglichen Ursprünge der Phagosomenmembran. Dabei ist anzumerken, dass in den meisten Fällen vermutlich die Plasmamembran den wesentlichen Anteil der Phagosomenmembran bildet.

Die Phagozytose wird durch Fusion der Pseudopodien und Abtrennung des neu gebildeten Phagosoms abgeschlossen. Hierfür muss insbesondere die Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts rückgängig gemacht werden, was im Wesentlichen wieder durch PI-Spezies mediiert wird [Bohdanowicz und Grinstein, 2013]. Der Inhalt des neu gebildeten Phagosoms wird maßgeblich vom extrazellulären Medium gebildet, allerdings ist ein Einfluss der fokalen Exozytose nicht auszuschließen.

⁵Schroit und Gallily [1979] konnten beispielsweise zeigen, dass sich die Phagozytoserate im Mausmodell durch Erhöhung der Ungesättigtheit der Lipide erhöhen lässt.

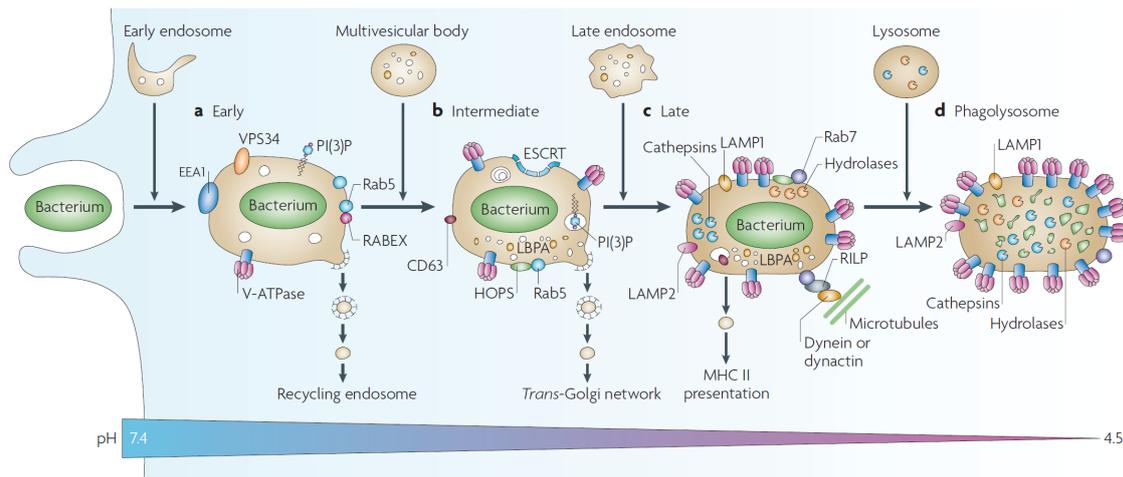


Abbildung 3.3

Die Reifung eines Phagosoms zum Phagolysosom im Überblick. Die sich an den Phagozytoseprozess anschließende Phagosomenreifung dient dem Abbau des eingeschlossenen Pathogens (oder der apoptotischen Zelle). Durch fusionsartige Prozesse mit frühen Endosomen, späten Endosomen und schließlich Lysosomen werden Membrankomponenten sowie Lumen des Phagosoms modifiziert. Für das Stadium des frühen Phagosoms (a) und für Fusionsprozesse mit frühen Endosomen ist Rab5 essentiell, welches während des Übergangs über das intermediäre (b) zum späten Phagosom (c) durch Rab7 und die Fähigkeit zur Fusion mit späten Endosomen beziehungsweise Lysosomen ersetzt wird. Während der Reifung zum Phagolysosom (d) wird das Phagosom vom pH-Wert 7,4 auf pH 4,5 angesäuert. Dafür ist hauptsächlich die in der Phagosomenmembran angereicherte Protonenpumpe v-ATPase verantwortlich. Dies führt zusammen mit Proteinen wie Hydrolasen, oxidativen Radikalen und antimikrobiellen Peptiden zur Zerstörung des Pathogens im Phagolysosom. Am späten Phagosom ist die Bereitstellung von Antigenen zur MHC-II-Präsentation auf der Plasmamembran durch das Phagosom gezeigt. Dargestellt sind außerdem weitere für die verschiedenen Reifungsstadien charakteristische Moleküle. Aus Flannagan et al. [2009].

3.3 Phagosomenreifung

Die Phagozytose eines Krankheitserregers durch einen professionellen Phagozyten initiiert einen Prozess, welcher als Phagosomenreifung bezeichnet wird. Durch diese werden mittels fusionsartiger Austauschprozesse zwischen dem Phagosom und Vesikeln des endozytischen Systems (frühe und späte Endosomen sowie Lysosomen) [Desjardins et al., 1994b] sowohl die Zusammensetzung der Phagosomenmembran als auch der Inhalt des Phagosoms sukzessiv modifiziert [Haas, 2007]⁶. Am Ende der Phagosomenreifung steht die Zerstörung des Krankheitserregers sowie die Entsorgung von dessen Bestandteilen - das Phagosom ist zu einem Phagolysosom geworden. Abbildung 3.3 gibt einen Überblick über den Ablauf der Phagosomenreifung. Zur Verdauung des Pathogens tragen im phagosomalen Lumen insbesondere die Ansäuerung und oxidative Radikale bei, funktionelle Bedeutung hat zudem die Ausschleusung von Antigenen zur Präsentation auf der Plasmamembran [Haas, 2002].

Für die Modifizierung von Phagosomenmembran und phagosomalem Lumen im Laufe der

⁶Materialaustausch während der Phagosomenreifung findet zudem mit Vesikeln des trans-Golgi-Netzwerks und mit der Plasmamembran statt [Tjelle et al., 2000; Vieira et al., 2002].

Phagosomenreifung schlug Desjardins [1995] einen *Kiss-and-run*-Mechanismus vor⁷. Dabei kommt es zu einer transienten Fusion der Membranen von Phagosom und funktionellem Vesikel, wodurch der Austausch von Membran- und Lumenkomponenten ermöglicht wird, gefolgt von einer Ablösung der Membranen voneinander. Der intermediäre Zustand lässt sich als kurzzeitige Fusionspore interpretieren [McBride et al., 1999] (vergleiche Abschnitt 2.8), worauf auch der größenabhängige Austausch von Partikeln zwischen Phagosom und Fusionsvesikeln hindeutet [Desjardins et al., 1997].

Aufgrund der zeitlich begrenzten Präsenz von Markerproteinen im Phagosom lassen sich verschiedene Reifungsstufen des Kompartiments unterscheiden, welche im Normalfall einem festen Ablaufplan folgen [Haas, 2007]. Wesentlich dafür ist, dass die Neigung des Phagosoms zur Fusion mit Vesikeln des endozytischen Systems durch die Aufnahme spezieller Rab-Proteine (siehe Abschnitt 2.8) während der Phagosomenreifung verändert wird. Das frühe, aus der Phagozytose hervorgehende Phagosom ist zur Fusion mit frühen Endosomen befähigt. Das späte Phagosom legt diese Eigenschaft ab und fusioniert dafür mit späten Endosomen und schließlich mit Lysosomen [Desjardins et al., 1997]. Dass die Fusionsprozesse zwischen Phagosomen und Endosomen von Rab- und SNARE-Proteinen abhängig ist [Becken et al., 2010], konnte von Jahraus et al. [1998] gezeigt werden⁸. Für frühe Endosomen und Phagosomen ist Rab5 charakteristisch, in den Membranen später Endosomen und Phagosomen findet sich Rab7, nicht aber Rab5, während das Phagolysosom keines der beiden Rab-Proteine enthält [Desjardins et al., 1994b; Vieira et al., 2002; Kinchen und Ravichandran, 2008]. Es ist nicht geklärt, ob die Aufnahme endozytischer Markerproteine Voraussetzung oder Konsequenz des Reifungsprozesses ist [Scott et al., 2003].

Dass sich die Größe des Phagosoms während der Phagosomenreifung nicht nennenswert ändert [Desjardins et al., 1994b], untermauert einerseits die *Kiss-and-run*-Hypothese, ist andererseits aber eine Folge von zur Plasmamembran gerichteten Recyclingprozessen [Flannagan et al., 2012]. Unter anderem Rab4 und Rab11 sind für die Regulierung von nach außen gerichteten Abschnürungsprozessen von der Phagosomenmembran zuständig [Damiani et al., 2004]. Diese sind möglicherweise in Membranmikrodomänen lokalisiert [Damiani et al., 2004], welche als Ausgangsstruktur für eine Abschnürung fungieren könnten.

Ein wichtiges Instrument bei der Bildung eines Phagolysosoms und zur Zerstörung von Krankheitserregern im Phagosom ist die Ansäuerung des phagosomalen Lumens [Kinchen und Ravichandran, 2008]. Im frühen Phagosom beträgt der pH-Wert noch etwa 6,0 bis 6,5, im späten Phagosom bereits 5,0 bis 6,0 und im Phagolysosom 4,0 bis 5,5 [Haas, 2007]. Die hauptsächlich an der Ansäuerung beteiligte v-ATPase tritt im frühen Phagosom nur vereinzelt auf, weshalb die initiale, leichte Ansäuerung des Phagosoms andere Ursachen haben muss. Eine Rolle könnte dabei nach Hackam et al. [1997] die Entfernung der Natrium-Kalium-ATPase spielen, welche ein der Ansäuerung entgegenwirkendes Membranpotential aufbauen würde, verbunden mit einem Natrium-Protonen-Austauschtransport (Antiport). Die v-ATPase erzeugt als aktive Protonenpumpe unter Hydrolyse von ATP einen Protonengradienten an Membranen [Beyenbach und Wiczorek, 2006]. Sie wird durch Fusionen mit Golgi-Vesikeln auf das späte Phagosom übertragen [Fratti et al., 2003].

⁷Das Vorliegen von *Kiss-and-run*-Prozessen während der Phagosomenreifung ist nicht endgültig bestätigt [Flannagan et al., 2012].

⁸Darüber hinaus sind die unterschiedlichen Proteine der Rab-Familie wesentlich an der Organisation von intrazellulären Fusions- und Transportprozessen beteiligt [Stenmark, 2009].

Die Rate des Protonentransports ist neben der Dichte von v-ATPasen in der Membran abhängig vom Verhältnis zwischen der Hydrolyseenergie des ATPs und einerseits dem Protonengradienten sowie andererseits dem elektrischem Transmembranpotential [Grabe und Oster, 2001; Huynh et al., 2007]. Der sich einstellende pH-Wert entspricht einem Gleichgewichtszustand von unterschiedlich gerichteten Protonenflüssen - nach außen gerichtete Protonenflüsse entstehen durch weitere Transportproteine sowie durch die im Laufe der Phagosomenreifung steigende Durchlässigkeit der Membran für Protonen [Huynh et al., 2007].

Die späte Erniedrigung des intraphagosomalen pH-Werts stellt nicht nur einen direkten Mechanismus zur Zersetzung des eingeschlossenen Krankheitserregers dar, darüber hinaus ist die Aktivität von Proteasen, beispielsweise Cathepsinen, welche das Pathogen abbauen können, pH-abhängig [Lennon-Duménil et al., 2002b,a]. Zudem wird durch Denaturierung der Proteinefragmente das Beladen von Rezeptoren zur Antigenpräsentation ermöglicht, und es wird angenommen, dass sowohl der saure pH-Wert als auch die v-ATPase eine Rolle bei Fusionsprozessen zwischen späten Phagosomen und Lysosomen spielen [Peri und Nüsslein-Volhard, 2008; Kinchen und Ravichandran, 2008; Huynh und Grinstein, 2007]. Protonen im phagosomalen Lumen werden auch zur Produktion reaktiver oxidativer Spezies (siehe unten) benötigt [Murphy und DeCoursey, 2006]. Die Ansäuerung des Phagosoms ist also ein notwendiges Kernelement der Phagosomenreifung [Huynh und Grinstein, 2007].

Hydrolasen, insbesondere Proteasen, die die Spaltung von Molekülbindungen katalysieren, werden schon früh in das neu gebildete Phagosom übertragen, möglicherweise durch Fusionsprozesse mit Golgi-Vesikeln [Sturgill-Koszycki et al., 1996; Yates et al., 2005; Haas, 2007]. Ihre Aktivität entfalten Hydrolasen in Abhängigkeit vom pH-Wert des Phagosoms [Claus et al., 1998]. Die Hydrolasen werden in einem späteren Abschnitt der Phagosomenreifung durch Austausch mit Lysosomen im Phagosom aufkonzentriert [Claus et al., 1998].

Zur Phagosomenreifung gehört außerdem die massive Erzeugung einer Reihe reaktiver oxidativer Spezies, die die Verdauung des eingeschlossenen Krankheitserregers unterstützen [Iyer et al., 1961; Murphy und DeCoursey, 2006]. Deren Vorstufe sind O_2^- -Hyperoxide sowie Stickstoffmonoxidradikale (NO) [Nathan und Shiloh, 2000]. Hierbei wirkt das membranständige Protein NADPH mit, indem es im Phagosom unter Elektronentransport O_2^- produziert [Hampton et al., 1998].

Neben Hydrolasen und oxidativen Radikalen wird im Verlauf der Phagosomenreifung das Phagosom mit antimikrobiellen Proteinen und Peptiden angereichert, die entweder direkt mit den Pathogenen interagieren oder indirekt deren Wachstum hemmen können [Flannagan et al., 2009]. Beispielsweise kann das Protein Lactoferrin Eisen aus dem Phagosom binden, welches essentiell für das Überleben von Mikroorganismen ist, und wirkt damit hemmend auf deren Wachstum [Skaar, 2010; Molloy und Winterbourn, 1990]. Zu den im Phagolysosom konzentrierten AMPs gehören Defensine und Cathelicidine. Sie werden in den Granula von Phagozyten gespeichert und durch Fusionsprozesse in deren Phagosomen entlassen, wo sie durch Störung von deren Membranintegrität eingeschlossene Krankheitserreger schädigen [Lehrer et al., 1993; Zanetti, 2005]. Defensine sind aktiv gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Mykobakterien, Pilze und umhüllte Viren und verfügen zudem über eine unspezifische Zytotoxizität [Lehrer et al., 1993]. Auch Cathelicidine besitzen ein breites Wirkungsspektrum gegen Bakterien, Protozoen, Pilze, Viren und Tumorzellen [Zanetti et al., 1995; Gutschmann et al., 2001a]. Ihre Vorläufer liegen

in den Granula als Präpropeptide vor und werden bei Bedarf in einen Proteinrest und ein C-terminales, antimikrobielles Peptid gespalten [Zanetti et al., 1995]. Im Menschen tritt das Cathelicidin hCAP18 auf, dessen C-terminales, α -helikales Peptid LL-37 neben der antimikrobiellen Aktivität LPS binden und neutralisieren kann [Larrick et al., 1995; Wiese et al., 2003] und darüber hinaus eine Reihe von Immunantworten mediiert [Zanetti, 2005].

Wie auch in Kompartimenten des endozytischen Systems entstehen im Phagosom durch Degradierung von pathogenen Proteinen Peptide passender Länge, die als Antigene auf MHC-Klasse-II-Komplexe geladen werden können [Jutras und Desjardins, 2005]. Die beladenen MHC-Klasse-II-Komplexe fügen sich in die Phagosomenmembran ein und gelangen, von abgeschnürten Vesikeln transportiert, zur Plasmamembran [Blander und Medzhitov, 2006]. Hier können die Antigene von Rezeptoren erkannt werden und so eine adaptive Immunantwort auslösen.

Die genaue Lipidzusammensetzung des Phagosoms ist bis heute unklar. Mason et al. [1972] fanden für Alveolarmakrophagen im Hasen einen Anteil von 14% SM, 33% PC, jeweils 6% PS und PI und 23% PE am Gesamtlipid und einen Cholesterolanteil von 26% am Gesamtlipid. Die Phagosomen enthielten 22% SM, 18% PC, 7% PS, 4% PI und 19% PE bei 36% Cholesterolanteil. Für humane frühe Phagosomen wurden von Desjardins et al. [1994a] 20% SM, 44% PC, 9% PS, 4% PI und 15% PE, für späte Phagosomen dagegen 35% SM, 24% PC, 10% PS, 5% PI und 19% PE gefunden⁹. Insbesondere das Verhältnis zwischen SM und PC wird also im Lauf der Phagosomenreifung stark modifiziert. Die Werte für das frühe Phagosom korrelieren mit den von van Meer et al. [2008] angegebenen Werten für die Säugetier-Plasmamembran (siehe Abbildung 2.12). Jeschke et al. [2015] konnten zeigen, dass Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI(3)P) eine funktionelle Bedeutung für Fusionsprozesse zwischen Phagosomen und frühen Endosomen hat (siehe auch [Ellson et al., 2001]), während spätere Fusionsprozesse mit Lysosomen zusätzlich von Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI(4)P) reguliert werden.

3.4 Die Unterwanderung der Phagosomenreifung durch intrazelluläre Pathogene

Das Immunsystem stellt einen umfangreichen und effektiven Schutz gegen die Vielzahl von Krankheitserregern dar, derer der Organismus sich erwehren muss. Der Organismus erkrankt, wenn das Immunsystem einem Pathogen nicht gewachsen ist. Das ist der Fall, wenn entweder der Krankheitserreger besonders potent ist oder wenn das Immunsystem zeitweise oder permanent geschwächt ist. Für eine Reihe von Krankheitserregern ist eine erfolgreiche Strategie, Mechanismen des Immunsystems zu unterwandern oder sogar für ihre Zwecke zu missbrauchen. Als prominentes Beispiel befällt der HI-Virus gezielt Zellen des Immunsystems und führt durch schnelle Mutationen, Abbau von MHC-Komplexen, Zerstörung von essentiellen Immunzellen und weitere Mechanismen zu dem kritischen erworbenen Immundefektsyndrom (AIDS) [Mosier, 2000; Gougeon, 2003].

Auch Phagosomenbildung und -reifung stellen für einige spezialisierte Pathogene mit dem Immunsystem assoziierte Angriffspunkte dar. Während Bakterien, welche den Phagozytoseprozess verhindern, zu den extrazellulären Pathogenen zählen, werden Bakterien, die innerhalb eines Phagosoms die Zerstörung durch Phagosomenreifung umgehen und in der

⁹Für diese Studie wurden die Phagosomen mit Latexkugeln gefüllt [Desjardins et al., 1994a].

3.4 Die Unterwanderung der Phagosomenreifung durch intrazelluläre Pathogene

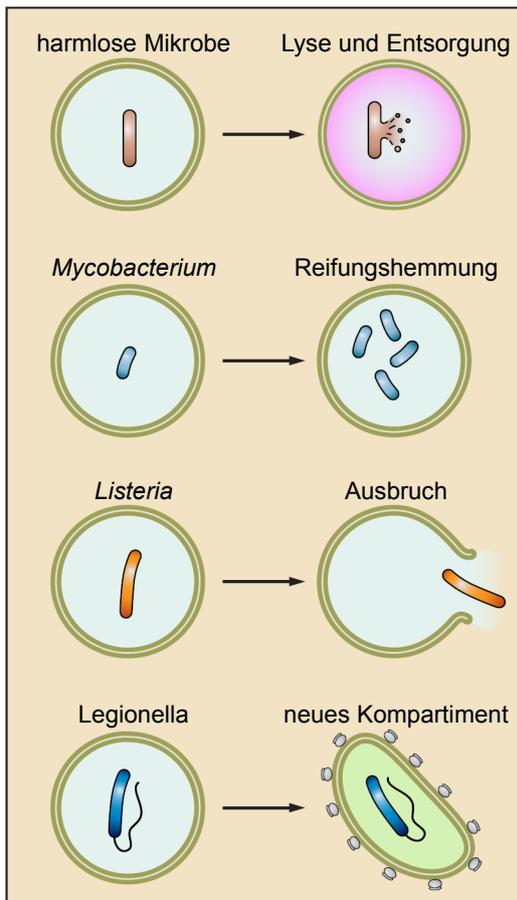


Abbildung 3.4

Häufige Strategien zum Überleben intrazellulärer Pathogene im Phagosom am Beispiel von *Mycobacterium*, *Listeria* und *Legionella*. Während das Phagosom einer harmlosen Mikrobe im Anschluss an die Phagozytose die Phagosomenreifung durchläuft und damit den Mikroorganismus abtötet, vermögen eine Reihe von Pathogenen mittels spezieller Strategien die Verdauung im Phagosom zu umgehen. Dies führt im Fall von *Mycobacterium tuberculosis* und anderen Pathogenen zur Hemmung der Phagosomenreifung, sodass die Bakterien im Phagosom überleben und sich vermehren können. Die Gruppe von *Listeria monocytogenes* gelangt durch Zerstörung des Phagosoms in das umgebende Cytoplasma und breitet sich von dort weiter im Körper aus. Zu den Bakterien, welche das Phagosom in ein grundlegend verschiedenes Kompartiment umbauen, das ihnen optimale Voraussetzungen für Ernährung und Replikation bietet, gehört *Legionella pneumophila*. Modifiziert nach Bohdanowicz und Grinstein [2013].

Lage sind, sich innerhalb der Zelle zu vermehren, als intrazelluläre Pathogene bezeichnet. Obwohl der eingesetzte Mechanismus zur Beeinflussung des Phagosoms für jede Spezies intrazellulärer Bakterien individuell ist [Haas, 2002], können drei häufige Strategien unterschieden werden: Ausbruch aus dem Phagosom, Hemmung der Phagosomenreifung sowie Umbau des Phagosoms [Haas, 2007; Tjelle et al., 2000; Scott et al., 2003; Flannagan et al., 2012]. Diese sind in Abbildung 3.4 schematisch dargestellt. Da die Definition des Phagosoms auch den ordnungsgemäßen Verlauf der Phagosomenreifung einschließen sollte, wird das durch Pathogene modifizierte und seiner Funktion entfremdete Kompartiment häufig als Vakuole bezeichnet. Im Folgenden werden einige prominente Beispiele für die verschiedenen Strategien genannt.

Listeria monocytogenes [Smith et al., 1995] und *Shigella flexneri* [High et al., 1992] zerstören die Membran des Phagosoms und gelangen so ins Zytoplasma, in welchem sie wichtige Nährstoffe nutzen und sich reproduzieren. Darüber hinaus können sie sich durch spezielle Mechanismen wie die Induzierung von Ausstülpungen der Plasmamembran auch auf benachbarte Zellen ausbreiten [Smith et al., 1995; Kadurugamuwa et al., 1991].

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*) [Via et al., 1997], *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) [Cuellar-Mata et al., 2002] und *R. equi* [Fernandez-Mora et al., 2005] nehmen hemmenden Einfluss auf den Verlauf der Phagosomenreifung, sodass der Zustand eines Phagolysosoms nicht erreicht wird und somit die intrazellulären Bakterien im Phagosom überleben können. Während die *M. tuberculosis* enthaltende

Vakuole in einem frühen Zustand der Phagosomenreifung gehalten wird, gleicht die Vakuole von *Salmonella* T. einem modifizierten späten Phagosom [Cuellar-Mata et al., 2002; Scott et al., 2003]. In einigen Fällen nutzen die Bakterien die Fusionsprozesse mit endozytischen Vesikeln als Nahrungsversorgung [Haas, 2007] und können, wie van der Wel et al. [2007] für *M. tuberculosis* gezeigt haben, aus dem Phagosom ins Zytosol gelangen. Die Hemmung der Phagosomenreifung durch *R. equi* wird im folgenden Abschnitt 3.5 gesondert behandelt.

Legionella pneumophila [Kagan und Roy, 2002] und *Chlamydia trachomatis* [Hackstadt et al., 1996] wandeln das Phagosom in ein ihren Bedürfnissen angepasstes Kompartiment um. Während *Legionella* sein Phagosom zu einem dem ER ähnlichen Kompartiment umbaut, in welchem es sich vermehren kann [Kagan und Roy, 2002], erreicht die Vakuole von *Chlamydia* innerhalb der Zelle durch Fusion mit Golgi-Vesikeln und insbesondere Aufnahme von zellulärem SM eine beachtliche Größe [Haas, 2007; Scott et al., 2003; Hackstadt et al., 1996].

Eine weitere Gruppe von Bakterien, zu der *Coxiella burnetii* [Hackstadt und Williams, 1981] und *Leishmania mexicana* [McConville et al., 2007] gehören, wirkt verlangsamerend auf die Phagosomenreifung [Haas, 2007] und nutzt die Bedingungen im Phagolysosom für Wachstum und Vermehrung. Sie gehören zu den obligat intrazellulären Pathogenen - im Gegensatz zu fakultativ intrazellulären Pathogenen, welche sich sowohl innerhalb als auch außerhalb von Wirtszellen fortpflanzen können.

Die zahlreichen Mechanismen, mit deren Gesamtheit es ein Krankheitserreger bewerkstelligt, im Phagosom zu überleben, beginnen bei der Einflussnahme auf den Prozess der Aufnahme in die Zelle und umfassen die Freisetzung von bakteriellen Pathogenitätsfaktoren¹⁰ beziehungsweise den Transfer von Proteinen in das Phagosom [Haas, 2007; Fratti et al., 2003; Cuellar-Mata et al., 2002]. Als Resultat werden essentielle Funktionen des Phagosoms außer Kraft gesetzt oder modifiziert. Von besonderer Bedeutung sind dabei die Störung der Signaltransduktion [Malik et al., 2001; Haas, 2007], die Hemmung oder Neuausrichtung von Fusionsprozessen [Tjelle et al., 2000; Cuellar-Mata et al., 2002; Malik et al., 2001; Stenmark, 2009], die Einflussnahme auf die Ansäuerung des Kompartiments [Huynh et al., 2007] und die Verhinderung der Antigenpräsentation [Clemens und Horwitz, 1995; Ramachandra et al., 2001].

3.5 *Rhodococcus equi* als intrazelluläres Pathogen

Die Gattung *Rhodococcus* gehört wie die Mykobakterien zur Ordnung der Actinomycetales. Die stäbchen- bis kugelförmigen Gram-positiven Bakterien sind aerob und treten auf Ackerböden, Weiden und in Frisch- und Grundwasser auf [Goodfellow und Alderson, 1977]. Ihre Zellhülle ähnelt der der Mykobakterien (vergleiche Abbildung 2.11) und enthält in der äußeren Membran Mykolsäuren sowie mykolsäurehaltige Lipide wie Trehalose Dimykolat (TDM) [Sutcliffe, 1998]. Die Mykolsäuren der Rhodokokken messen zwischen 30 und 54 Kohlenstoffatome und sind damit kürzer als die der Mykobakterien [Sutcliffe, 1998].

R. equi ist ein fakultativ intrazellulärer Vertreter der Rhodokokken, der verschiedene Land- und Wassertiere wie Schweine und Rinder, vor allem aber junge Pferde befällt

¹⁰Zu den Pathogenitätsfaktoren gehört das aus der Hülle von *M. tuberculosis* und anderen Mykobakterien im Phagosom freigesetzte TDM, welches im Fall von *M. tuberculosis* ausreicht, die Phagosomenreifung zu hemmen [Axelrod et al., 2008].

und in Einzelfällen auch auf den Menschen übertragen werden kann [Prescott, 1991; Hondalus, 1997; von Bargen und Haas, 2009]. Bis 1983 wurden weltweit nur 13 Fälle von *R. equi*-Infektionen beim Menschen gezählt, mit dem Aufkommen von AIDS ist die Anzahl auf über 100 gemeldete Infektionen angestiegen [Weinstock und Brown, 2002]. Tatsächlich betreffen die meisten Erkrankungen beim Menschen immundefiziente Patienten, über zwei Drittel der *R. equi*-Infektionen treten zusammen mit einer AIDS-Erkrankung auf¹¹ [Weinstock und Brown, 2002; Prescott, 1991]. Mit etwa 10 % der *R. equi*-Infektionen stellen auch Transplantationspatienten eine Risikogruppe dar [Weinstock und Brown, 2002]. *R. equi* gelangt durch das Einatmen von Ackerstaub in die Lunge des Wirtes und befällt dort als primäre Targetzellen Alveolarmakrophagen, möglicherweise auch alveolare Epithelzellen [Hondalus und Mosser, 1994; von Bargen und Haas, 2009]. Eine Infektion mit *R. equi* betrifft sowohl bei Fohlen als auch beim Menschen Atemwege und Lunge und führt häufig zu Lungenentzündungen in Verbindung mit Abzessbildung, beim Menschen mit tuberkuloseähnlichen Symptomen [Prescott, 1991; Giles et al., 2014].

Virulente, von Pferden isolierte *R. equi*-Stämme unterscheiden sich durch die Anwesenheit eines 80 - 90 kb Plasmids von avirulenten Stämmen [Takai et al., 1991b; Giguère et al., 1999], dieses wird als Virulenzplasmid bezeichnet. Es enthält die Gene für 15 - 17 kDa große Oberflächen-Antigene, welche Takai et al. [1991b] in virulenten Bakterien identifizierten. Kurze Zeit später entwickelten Takai et al. [1993] einen Antikörper gegen diese Proteine, durch welchen sich virulente *R. equi*-Bakterien nachweisen lassen. In Abschnitt 3.6 wird eines der im Virulenzplasmid verschlüsselten Antigene, das virulenz-assoziierte Protein A, gesondert behandelt.

Als intrazelluläres Pathogen hemmt das durch Phagozytose in Makrophagen aufgenommene virulente *R. equi* die Phagosomenreifung in einem Stadium zwischen frühem und spätem Phagosom - und zwar wesentlich effektiver als avirulentes *R. equi* [Fernandez-Mora et al., 2005]. Während das Phagosom, im Folgenden als *R. equi* enthaltende Vakuole¹² (REV) bezeichnet, einige für späte Phagosomen spezifische Markerproteine erwirbt, werden andere wie Cathepsin D und die v-ATPase nicht aufgenommen und darüber hinaus eine Ansäuerung und Fusionen mit Lysosomen verhindert [Fernandez-Mora et al., 2005; Toyooka et al., 2005; von Bargen und Haas, 2009]. Zudem ist *R. equi* sehr resistent gegenüber einer Ansäuerung des pH-Werts [Benoit et al., 2000]. Hierdurch ist *R. equi* in der Lage, im Inneren von REVs zu überleben und sich zu vermehren - dies gilt allerdings nicht für avirulente Stämme, denen das Virulenzplasmid fehlt [Hondalus und Mosser, 1994]. Schließlich kann *R. equi*, maßgeblich vermittelt durch das Virulenzplasmid, zur Nekrose der Wirtszellen führen [Lührmann et al., 2004]. Ein von K. von Bargen und Haas [2009] entwickeltes Modell für den Verlauf der Phagosomenreifung virulenter und avirulenter *R. equi*-Bakterien ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

Neben den im Virulenzplasmid kodierten Proteinen wurden als mögliche Virulenzfaktoren beispielsweise das Kapselpolysaccharid, Mykolsäuren der Zellhülle und das Enzym Cholesteroxidase gefunden [Hondalus, 1997].

Für die Immunabwehr gegen *R. equi* ist die Anwesenheit von Interferon- γ notwendig, durch welches Makrophagen aktiviert werden und beginnen, oxidative Spezies zu bilden

¹¹Kedlaya et al. [2001] berichten von 19 Fällen von *R. equi* bei immunkompetenten Patienten, die mit etwa 11 % eine wesentlich niedrigere Mortalität aufweisen als AIDS-Patienten mit über 50 %.

¹²Wie Fernandez-Mora et al. [2005] berichten, enthalten REVs in fortgeschrittenem Stadium amorphes und vesikuläres Membranmaterial und weisen eine weniger eng am Bakterium anliegende Vakuolenmembran auf als im frühen Stadium.

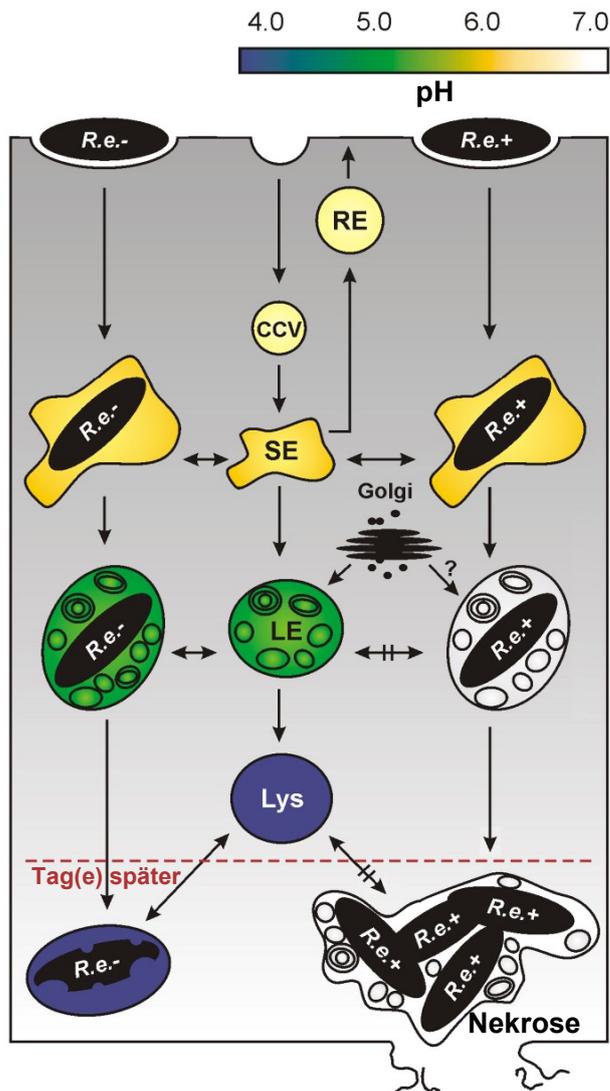


Abbildung 3.5
Verlauf der Phagosomenreifung für virulente (*R.e.*+) und avirulente (*R.e.*-) *R. equi*-Bakterien. In der mittleren Spalte ist der Verlauf der Endosomenreifung skizziert. Avirulentes *R. equi* verlangsamt lediglich den zeitlichen Verlauf der Phagosomenreifung, die Vakuolen fusionieren mit frühen (SE) und späten (LE) Endosomen und Lysosomen (Lys) und sind schließlich in der Lage, das Bakterium abzutöten. Virulentes *R. equi* dagegen hemmt die Phagosomenreifung in einem präphagolysosomalen Stadium. Die Fusion mit späten Vesikeln des endozytischen Systems wird unterbunden und die Ansäuerung der Vakuole verhindert. Dadurch ist es *R. equi* möglich, sich in dem modifizierten Kompartiment zu vermehren, was schließlich zum nekrotischen Zelltod des Phagozyten führt. Weitere Abkürzungen: Klathrin-bedecktes Vesikel (CCV), Recycling-Endosom (RE). Modifiziert nach K. von Bargen und Haas [2009].

[Darrah et al., 2000; Vazquez-Boland et al., 2013]. Hierdurch wird den Bakterien zudem zum Wachstum notwendiges Eisen entzogen [von Bargen et al., 2011].

3.6 Das virulenz-assoziierte Protein A von *Rhodococcus equi*

Das Virulenzplasmid der von Fohlen isolierten virulenten *R. equi*-Bakterien kodiert das Protein VapA und die weiteren Vap-Proteine VapC bis -G [Takai et al., 2000b]. Insbesondere am C-terminalen Ende weisen diese eine hohe Sequenzkonservierung auf [Takai et al., 2000b]. Die Virulenz von Mutanten, denen verschiedene Vap-Proteine fehlen, kann durch VapA wiederhergestellt werden - die übrigen Vap-Proteine spielen offensichtlich eine untergeordnete Rolle für die Virulenz der Bakterien [Jain et al., 2003]. VapA wird bei höheren Temperaturen (zwischen 34 °C und 41 °C) in der Bakterienmembran exprimiert [Takai et al., 1992; Tan et al., 1995; Ren und Prescott, 2003], die Expression ist zudem abhängig von der Anwesenheit geringer Konzentrationen zweiwertiger Ionen wie Eisen,

Calcium und Magnesium [Ren und Prescott, 2003], vom pH-Wert (maximal bei pH 5) [Benoit et al., 2001; Ren und Prescott, 2003] und von der Anwesenheit oxidativer Spezies, wie Benoit et al. [2002] für H_2O_2 zeigen konnten. Die Voraussetzungen für eine erhöhte VapA-Expression entsprechen den Umgebungsbedingungen im Phagosom - dies deutet darauf hin, dass die Expression von Virulenzproteinen durch *R. equi* durch den Einfluss des reifenden Phagosoms ausgelöst werden könnte.

Die Lokalisierung von VapA in der Bakterienmembran wird durch eine nach der Proteinsynthese stattfindende, kovalente Lipidmodifikation, wahrscheinlich nahe des N-Terminus, erreicht. Dadurch erhöht sich das Molekulargewicht des Proteins von ungefähr 16 kDa auf 18 bis 22 kDa [Tan et al., 1995]. K. von Bargen [2010, S. 92 f.] fand heraus, dass VapA im Verlauf der Phagosomenreifung von virulenten *R. equi* in das Phagosom freigesetzt wird und innerhalb der Makrophagen in vesikulären Kompartimenten des endozytischen Systems und insbesondere in Lysosomen angereichert wird. In einer weiterführenden Arbeit von Wittlich [2011, S. 62 ff.] wurde gezeigt, dass VapA im Phagosom durch Proteasen zu einem proteasestabilen, 12 kDa großen Fragment (VapA p12) gespalten wird, welches einen deutlichen Einfluss auf die Bildung der REV ausübt. Da es sich bei VapA p12 um die konservierte C-terminale Region des vollständigen Proteins handelt [Geerds et al., 2014], ist anzunehmen, dass die Lipidmodifikation ebenfalls abgespalten wird.

Von Schweinen isolierte *R. equi*-Bakterien enthalten ein ähnliches Virulenzplasmid, welches anstelle von VapA zur Expressierung des Proteins VapB führt. Dieses weist unter den Vap-Proteinen die höchste Sequenz-Homologie mit VapA auf¹³ [Takai et al., 2000b]. Es wird davon ausgegangen, dass VapA und VapB in Kombination mit einem weiteren, vom Virulenzplasmid kodierten Protein, für eine Wirtsspezifität verantwortlich sind [Ocampo-Sosa et al., 2007]. Takai et al. [2000a] konnten zeigen, dass ein VapB exprimierender *R. equi*-Stamm in Fohlen nur moderat virulent ist. Im Menschen sind diese, das VapB kodierende Virulenzplasmid enthaltende Bakterien sogar häufiger als die virulenteren VapA kodierenden Stämme. Unter den von AIDS-Patienten isolierten *R. equi*-Bakterien fanden Takai et al. [1995] in 24% der Patienten VapA exprimierende Varianten, 48% VapB exprimierende Varianten und zu 28% avirulente Stämme.

Da es bisher nicht gelungen ist, VapA zu kristallisieren, wird aktuell die von Geerds et al. [2014] aufgeklärte Proteinstruktur von VapB p12 als repräsentativ für die Vap-Proteine und insbesondere für VapA angenommen. Abbildung 3.6 zeigt die Bändermodell-Darstellung der Struktur. VapB p12 weist eine „ungewöhnliche oder sogar einzigartige Topologie“ [Geerds et al., 2014, S. 871] auf: zwei Mäander-Motive (englisch: greek key motifs) bilden ein acht-strängiges antiparalleles β -Fass mit einer einzelnen α -Helix, was VapB von ähnlichen Strukturen abgrenzt¹⁴ [Geerds et al., 2014]. Die α -Helix verschließt das β -Fass von unten (siehe Abbildung 3.6), wo sich hauptsächlich polare Seitenketten befinden. Die Struktur weist weder eine durchgängige Pore noch eine zentrale Bindekavität auf. Geerds et al. [2014] spekulieren, dass die flexibleren Schleifen an der Oberseite eine hydrophobe Bindestelle freigeben könnten, was ein Hinweis auf eine mögliche Bindung noch ungeklärter Zielstrukturen durch das Protein ist.

Wie schon erläutert, können avirulente *R. equi* nicht im Phagosom überleben. Sie

¹³Die Aminosäuresequenzen von VapA und VapB weisen 76% Identität beziehungsweise 79% Ähnlichkeit auf, am C-Terminus sogar 94% Ähnlichkeit [Byrne et al., 2001]. Die 12 kDa großen C-terminalen Fragmente VapA p12 und VapB p12 sind zu 88% identisch [Geerds et al., 2014].

¹⁴Ähnliche Strukturen sind bakterielle Proteine der äußeren Membran, Proteine der Avidin-Streptavidin-Superfamilie sowie zytoplasmatische, fettsäurebindende Proteine [Geerds et al., 2014].

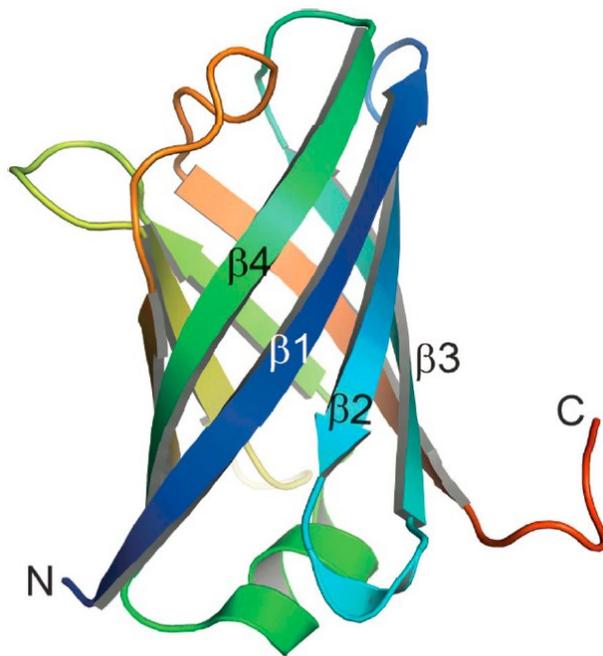


Abbildung 3.6

Die von Geerds et al. [2014] aufgeklärte Proteinstruktur des Proteinase-stabilen Fragments des virulenz-assoziierten Proteins B (VapB) im Bändermodell. Die Farbgebung ist blau bis rot von N-Terminus zu C-Terminus. VapB besteht aus einem acht-strängigen β -Fass, welches aus zwei Mäander-Motiven zusammengesetzt ist, und einer α -Helix. Letztere verschließt die Struktur auf der Unterseite, wohingegen die Schleifen auf der Oberseite funktionelle Flexibilität aufweisen. Die Reihenfolge der β -Stränge ist 41238567. Aus Geerds et al. [2014].

exprimieren keine Virulenzproteine, die Anwesenheit von VapA reicht allerdings allein nicht aus, um die Virulenz wiederherzustellen [Giguère et al., 1999]. Bei einer Mutante, der lediglich das VapA kodierende Gen des Virulenzplasmids fehlte, kam es dagegen zu einer Wachstumshemmung der Bakterien und zu einer schnellen Vernichtung der Bakterien im Phagosom [Jain et al., 2003]. VapA ist also für die Virulenz von *R. equi* notwendig, aber nicht hinreichend. Haas et al. fanden Hinweise, dass VapA maßgeblich an der Bildung der REV beteiligt ist (unpublizierte Daten) und sowohl in der frühen als auch in der späten Infektion von Makrophagen eine essentielle Rolle spielt [von Bargen und Haas, 2009, siehe auch [von Bargen, 2010; Wittlich, 2011]]. Außerdem konnten K. von Bargen et al. [2009] zeigen, dass VapA für die Verhinderung der Ansäuerung des Phagosoms notwendig ist.

Durch welche Wechselwirkungen und Prozesse es *R. equi* vollbringt, das Phagosom in eine REV umzuwandeln und in dieser zu überleben, ist bisher nur in Teilen bekannt. Der Wirkmechanismus von VapA an der Phagosomenmembran könnte hierbei eine Schlüsselrolle spielen und ist daher der Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Kapitel 4

Material und Methoden

Das Wissen um die in Kapitel 2 behandelten vielfältigen Eigenschaften von Membranen ist in großen Teilen der jahrelangen Forschung an Modellmembranen zu verdanken. In diesem Kapitel sollen die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanzen und Methoden vorgestellt werden. Für jede Methode werden zunächst ein einleitender Überblick und eine kurze Behandlung der theoretischen Grundlagen gegeben, bevor die praktische Durchführung der Messungen erläutert wird.

Begonnen wird in Abschnitt 4.1 mit der Beschreibung der für die unterschiedlichen Methoden zum Einsatz gekommenen Puffersysteme, gefolgt von einer Zusammenstellung der verwendeten Membranlipide und Lipidmischungen in Abschnitt 4.2. Abschnitt 4.3 enthält sowohl einige wichtige Eigenschaften von VapA als auch Informationen über die Aufreinigung und die Prozessierung des Proteins. Das als Vergleichssubstanz verwendete Peptid LL-32 wird in Abschnitt 4.4 vorgestellt.

Für die Experimente kamen eine Reihe unterschiedlicher Rekonstitutionssysteme zum Einsatz, welche in Abbildung 2.13 zusammengestellt sind. Die praktische Herstellung dieser Systeme wird in Abschnitt 4.5 erklärt.

Im Anschluss werden in den Abschnitten 4.6 bis 4.10 die einzelnen Methoden nach oben genanntem Schema vertieft. Abbildung 4.1 gibt einen anschaulichen Überblick über alle hier behandelten Methoden.

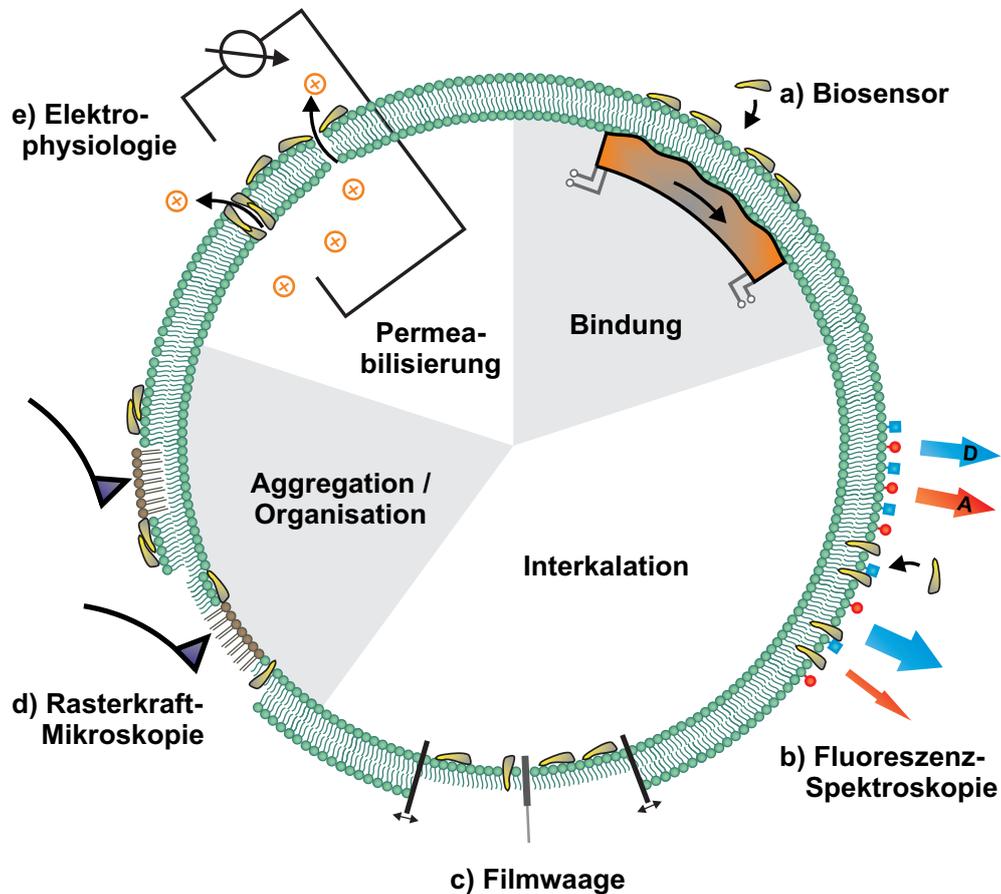


Abbildung 4.1

Schematische Übersicht der verwendeten Methoden. Der Wirkmechanismus von VapA wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer Reihe biophysikalischer Methoden an Modellmembranen untersucht. (a) Aufschluss über die Bindung von VapA an festkörperunterstützten Membranen lieferten Messungen mit einem Biosensor auf Basis von akustischen, oberflächennah geführten Volumenwellen. (b) Förster-Resonanzenergietransfer Spektroskopie an SUVs wurde für die Analyse der Interkalation von VapA sowie die Induktion von Vesikelfusionsereignissen verwendet. (c) Die Interkalation wurde außerdem mit Hilfe von Filmwaagenmessungen studiert. (d) Mittels rasterkraftmikroskopischer Experimente an festkörperunterstützten Mono- und Bilayern wurden Informationen zur Aggregation von VapA auf oder in der Membran und zur Beeinflussung von Domänenstrukturen generiert. (e) Die Permeabilisierung einzelner freistehender Membranen im Montal-Mueller-Setup wurde mit elektrophysiologischen Messungen untersucht.

4.1 Puffersysteme

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in wässrigen Pufferlösungen durchgeführt. Für die Präparation wurde Reinstwasser der Leitfähigkeit $0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$ (bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$) aus einem Wasseraufbereitungssystem (*EMD Millipore*, Billerica, MA, USA, Milli-Q Advantage A10) verwendet. Da das Rekonstitutionssystem das Innere eines reifenden Phagosoms simulieren sollte, wurde für die meisten Systeme die Zusammensetzung 150 mM NaCl (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland, Nr. 1.06404) und 5 mM HEPES (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland, Nr. 1.10110) gewählt¹. Der pH-Wert wurde mit 1 mol/l Natronlauge (*VWR International*, Radnor, PA, USA, Nr. 31627.290) beziehungsweise mit 1 mol/l Salzsäure (*VWR International*, Radnor, PA, USA, Nr. 30024.290) auf die Werte $6,5$, $5,5$ und $4,5$ eingestellt, was jeweils den pH-Werten des frühen und späten Phagosoms sowie des Phagolysosoms entspricht [Haas, 2007]. Schließlich wurden die Pufferlösungen mit einem Membranfilter der Porengröße $0,22 \mu\text{m}$ (*EMD Millipore*, Billerica, MA, USA, Nr. SCGPT02RE, Steritop-GP, Express[®]PLUS Membran) filtriert. Die Pufferlösungen wurden in Bechergläsern und Laborglasflaschen (*DURAN Group*, Wertheim/Main, Deutschland, DURAN[®] Borosilikatglas 3.3) präpariert und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Die als Kehrwert des spezifischen Widerstands gegebene spezifische elektrische Leitfähigkeit σ der drei Puffersysteme wurde mit Hilfe eines Leitfähigkeitsmessgeräts (*FLIR Commercial Systems, Inc., Extech Instruments Division*, Nashua, NH, USA, ExStik[®] EC400) bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ bestimmt. Bei pH $6,5$ ergab sich ein Wert von $15,44 \text{ mS}/\text{cm}$, bei pH $5,5$ $15,27 \text{ mS}/\text{cm}$ und bei pH $4,5$ $15,20 \text{ mS}/\text{cm}$. Die spezifische elektrische Leitfähigkeit wird für die Abschätzung der Porengröße in Abschnitt 5.6 verwendet.

Für einige Methoden musste die Präparation des Puffersystems modifiziert werden. Die Pufferlösung wurde für Biosensormessungen (Abschnitt 4.6) zusätzlich zum beschriebenen Protokoll mindestens 30 Minuten im Ultraschallbad (*Bandelin electronic*, Berlin, Deutschland, Bandelin Sonorex RK100 H, 35 kHz , Spitzenleistung 320 W) entgast. Dies war notwendig, da Temperaturgradienten im Flusssystem des Geräts zur Luftblasenbildung führen können, was durch die geringere Löslichkeit von Gasen im Medium bei steigender Temperatur und durch mikroskopische Unreinheiten auf dem Chip als Kondensationskerne bedingt ist.

Weil die Messungen an der Filmwaage (Abschnitte 4.5.4, 4.8) auf der exakten Messbarkeit von Oberflächenspannung beziehungsweise Lateraldruck eines Lipidfilms beruhen, werden hierfür extrem reine Puffermedien benötigt. Die Bechergläser und Glasflaschen wurden vor Verwendung gründlich mit Reinstwasser gespült, um unter anderem letzte Reinigungsmittelrückstände zu entfernen. Außerdem wurde auf die Filtrierung des Puffers verzichtet, um Rückstände aus dem Filter nicht in den Puffer gelangen zu lassen.

Das Protein VapA (Abschnitt 4.3) wurde nach der rekombinanten Aufreinigung (Abschnitt 4.3.1) in phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) gelöst² (*Biochrom GmbH*, Berlin, Deutschland, Nr. L1825).

Die für die rekombinante Aufreinigung von VapA verwendeten Puffersysteme und Chemikalien werden in Abschnitt 4.3.1 aufgeführt.

¹Auf zusätzliche zweiwertige Ionen im Puffersystem wurde verzichtet, da diese einen starken Einfluss auf die Interaktion von membranaktiven Substanzen und Lipidmembranen haben können und bei einigen Methoden einen Störeinfluss ausgeübt hätten.

²Die Zusammensetzung des verwendeten PBS ist: 200 mg/l KCl , $200 \text{ mg/l KH}_2\text{PO}_4$, 8000 mg/l NaCl und $1150 \text{ mg/l Na}_2\text{HPO}_4$.

4.2 Membranlipide

Da die Membranrekonstitutionssysteme zur Untersuchung der Beeinflussung von Phagosomenmembranen durch VapA dienen, wurden ausschließlich Lipide eukaryotischen Ursprungs oder synthetische Lipide verwendet (*Avanti Polar Lipids*, Alabaster, AL, USA). Für fluoreszenzspektroskopische Messungen (Abschnitt 4.7) wurden den Lipidmischungen ein geringer Anteil fluoreszenzmarkierter Lipide (*Life Technologies*, Carlsbad, CA, USA) beigemischt. Die Fluoreszenzmarkierung befindet sich jeweils an der Kopfgruppe der Lipide. Die eingesetzten Lipide sind in Tabelle 4.1 zusammengestellt.

Bezeichnung	Ursprung	Molekulargewicht	Markierung	Artikel-Nr.
DOPC	synthetisch	786,15	-	Avanti 850375
SM	Gehirn, Schwein	731,09	-	Avanti 860062
Chol	Schafwolle	386,66	-	Avanti 700000
PS	Gehirn, Schwein	812,05	-	Avanti 840032
rh-DHPE	synthetisch	1333,81	Rhodamin B	Invitrogen L1392
NBD-PE	synthetisch	956,25	NBD	Invitrogen N360

Tabelle 4.1

Zur Membranrekonstitution verwendete Lipide. Langnamen der Lipide: 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DOPC), Sphingomyelin (SM), Cholesterol (Chol), L- α -phosphatidylserin (PS), Lissamine™ Rhodamin B 1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin (rh-DHPE), N-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)-1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin (NBD-PE).

Um die Interpretation grundlegender Effekte und Wechselwirkungen zu ermöglichen, wurde als Lipidzusammensetzung ein Dreikomponentensystem, bestehend aus DOPC, SM und Chol im molaren Verhältnis 45% : 45% : 10%, gewählt. Hierbei handelt es sich um ein einfaches Modellsystem, welches sich zudem zur Untersuchung von cholesterolhaltigen Lipiddomänen eignet [Yuan et al., 2002; Wallace et al., 2006; Chen et al., 2007]. Um den Einfluss negativ geladener Lipide in der Membran zu untersuchen, wurde für einige Messungen zusätzlich 10% PS beigemischt, sodass ein molares Verhältnis von 40,5% DOPC : 40,5% SM : 9% Chol : 10% PS resultierte. Die Präparation von Modellmembranen wird im Abschnitt 4.5 erläutert. Für fluoreszenzspektroskopische Messungen wurden den Mischungen 0,5% oder 1% fluoreszenzmarkierte Lipide hinzugefügt.

Die abweichenden Lipidmischungen DOPC:PS im molaren Verhältnis 90% zu 10% sowie 100% PS wurden für Biosensormessungen (Abschnitt 5.1.2) verwendet.

Alternative Dreikomponentensysteme zur Rekonstitution von L_o -Domänen bildenden Membranen sind beispielsweise POPC:SM:Chol [De Almeida et al., 2003] oder Sphingolipid-freie Mischungen wie DOPC:DPPC:Chol [Jensen et al., 2007] und DOPC:DSPC:Chol³ [Zhao et al., 2007]⁴. Für DOPC:SM:Chol-Mischungen wurde von Kahya et al. [2003] ein einfaches Phasendiagramm veröffentlicht, welches für das hier verwendete Mischungsverhältnis bei 25 °C eine Koexistenz von L_{α} - und L_o -Phase vorhersagt.

³Die verwendeten Abkürzungen stehen für 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin (POPC), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin (DPPC) und 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin (DSPC).

⁴Die angegebenen Referenzen beziehen sich auf die Veröffentlichung eines Phasendiagramms der jeweiligen Mischung.

4.3 VapA

Das Protein VapA (Abschnitt 3.6) wurde für diese Arbeit rekombinant aus *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien aufgereinigt, welche als Vektor das Plasmid PET28A-VapA (Quelle: A. Haas) enthielten. VapA wurde im Anschluss an die Aufreinigung auf PBS dialysiert, hierfür war die Löslichkeit des Proteins bekannt. Vor den Experimenten wurde VapA mit dem jeweiligen Messpuffer auf die benötigte Konzentration verdünnt und der pH-Wert gegebenenfalls mit Salzsäure eingestellt. Dabei trat keine Ausfällung der Substanz auf. Die Aufreinigung wird im folgenden Abschnitt 4.3.1 behandelt.

Für elektrophysiologische Untersuchungen der Membranpermeabilisierung wurde VapA mit Hilfe von Eupergit-gekoppelter Proteinase K zu der kürzeren Form VapA p12 prozessiert (Abschnitt 4.3.2). Außerdem wurde von Prof. Dr. Albert Haas⁵ rekombinant aufgereinigtes VapB zur Verfügung gestellt.

In Tabelle 4.2 sind die Aminosäuresequenzen der drei Proteine vergleichend zusammengestellt. Durch die Aufreinigung befindet sich am N-Terminus von VapA und VapB zusätzlich ein aus sechs Histidinen bestehender Polyhistidin-Tag (*His-Tag*), welcher im Zuge der Prozessierung mit Proteinase K abgespalten wird.

	10	20	30	40
VapA	MKTLHKTVSK	AIAATAVAAA	AAMIPAGVAN	ATVLDGSSSS
- p12	-----	-----	-----	-----
VapB	MMKALHKTVS	RAIAAIATAA	AAVLAVAPAS	VANAAVLDSG
	50	60	70	80
VapA	AILNSGAGSG	IVGSGSYDSS	TTSLNLQKDE	PNGRASDTAG
- p12	-----	-----	-----	----- DTAG
VapB	GGsALLKMGR	QCEVGSQAYD	SSTVSSNLQK	AETNGPVGLA
	90	100	110	120
VapA	QEQQYDVHGD	VISAVVYQRF	HVFGPEGKVF	DGDAGGLTLP
- p12	QEQQYDVHGD	VISAVVYQRF	HVFGPEGKVF	DGDAGGLTLP
VapB	GTAEQEQQYD	VHGNVISAAV	YQKFHVYGP	DMVFDGDAGG
	130	140	150	160
VapA	GAGAFWGTFL	TNDLQRLYKD	TVSFQYNAVG	PYLNINFFDS
- p12	GAGAFWGTFL	TNDLQRLYKD	TVSFQYNAVG	PYLNINFFDS
VapB	LTIPGAGAFW	GTLFTSDLQR	LYKDTVSFQY	NALGTYLNIN
	170	180	190	
VapA	SGSFLGHTQS	GGVSTVVGVG	GGSGSWHNA	-----
- p12	SGSFLGHTQS	GGVSTVVGVG	GGSGSWHNA	-----
VapB	FFDSSGGFLG	HIQAGAVSAV	VGVGSGSGSW	HNWEVA

Tabelle 4.2

Aminosäuresequenzen der verwendeten Proteine VapA, VapA p12 und VapB. Daten für VapA und VapB aus Takai et al. [2000b].

Tabelle 4.3 enthält einige Eigenschaften der in Tabelle 4.2 angegebenen Proteinsequenzen sowie der Proteine VapA His6 und VapB His6, welche den N-terminalen *His-Tag*

⁵Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Institut für Zellbiologie, Molekulare Zellbiologie der Infektion

enthalten. VapA His6 und VapB His6 werden im Folgenden als VapA beziehungsweise VapB bezeichnet.

Protein	Molekulargewicht	Nettoladung [e ₀]	pI (theoretisch)	GRAVY
VapA	19184,0	-5	5,32	-0,023
VapA His6	20006,9	-5	6,08	-0,121
VapA p12	11923,9	-6	4,71	-0,142
VapB	20094,4	-6	5,16	0,147
VapB His6	20917,2	-6	5,94	0,048

Tabelle 4.3

Eigenschaften von VapA, VapA p12 und VapB im Vergleich mit den *His-Tag* tragenden Varianten VapA His6 und VapB His6. Der isoelektrische Punkt (pI) gibt den pH-Wert an, bei dem die Nettoladung des Proteins Null wird. Der „*grand average of hydropathicity*“ (GRAVY) ist ein Maß für die Hydrophobizität einer Aminosäuresequenz. Berechnet mit ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>).

4.3.1 Rekombinante Aufreinigung von VapA

Eine Übernachtskultur von transformierten *E. coli*-Bakterien (BL21 PET28a(+)-VapA His6) in 50 ml LB-Medium (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland, Nr. 71753, LB broth MILLER) wurde über Nacht mit 50 mg/ml Kanamycin (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, Nr. K1372) bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde die Kultur auf insgesamt 2 l LB-Medium mit 50 mg/ml Kanamycin gegeben und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,7 bis 0,8 bei 600 nm (OD₆₀₀) wachsen gelassen. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Bakterien noch in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Expression von VapA wurde durch Zugabe von IPTG (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, Nr. I6758) in einer Endkonzentration von 1 mM induziert und die Bakterien für drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden die *E. coli*-Bakterien 20 Minuten bei 4 °C und 8970 x g zentrifugiert (*Beckman Coulter*, Brea, CA, USA, Avanti J-26XP, Rotor JLA 8.1000) und das Bakterienpellett bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Für den nun folgenden Zellaufschluss und die Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) wurden zum einen ein Lysepuffer (LP), zum anderen ein Elutionspuffer (EP) benötigt. Die Zusammensetzungen waren 50 mM NaH₂PO₄ (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland, Nr. 1.06346), 300 mM NaCl sowie 10 mM (LP) beziehungsweise 500 mM (EP) Imidazol (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland, Nr. 1.04716). Der pH-Wert wurde mit Natronlauge (LP) beziehungsweise Salzsäure (EP) auf 7,0 eingestellt. Direkt vor der Verwendung wurden die Puffer filtriert und für 15 Minuten im Ultraschallbad entgast, außerdem erfolgte eine Zugabe von 5 mM Mercaptoethanol (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland, Nr. 805740).

Die Biomasse wurde in LP resuspendiert und durch Zugabe von zwei ebenfalls in LP gelösten *Roche Complete Protease Inhibitor*-Tabletten (*Roche Diagnostics*, Rotkreuz, Schweiz, Nr. 04693132001), Lysozym (*Roche Diagnostics*, Rotkreuz, Schweiz, Nr. 10837059001) mit Endkonzentration 200 µg/ml, DNase (*Roche Diagnostics*, Rotkreuz, Schweiz, Nr. 11284932001) und RNase (*Roche Diagnostics*, Rotkreuz, Schweiz, Nr. 10109134001), jeweils mit einer finalen Konzentration von 50 µg/ml, auf ein Gesamtvolumen von 50 ml gebracht.

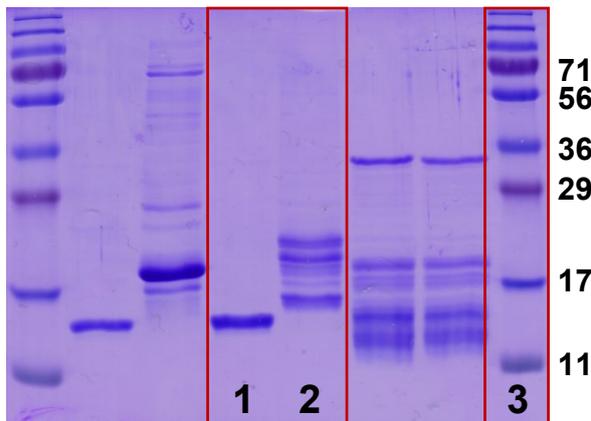


Abbildung 4.2

Coomassie-Färbung des aufgereinigten Proteins VapA (2) und der prozessierten Form VapA p12 (1). Die Proteinlösungen wurden zunächst bei konstanten 20 mA durch ein SDS-PAGE-Gel (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese-Gel) laufen gelassen (Proteinauftrag jeweils 5 µg). Die Coomassie-Färbung zeigt die in der Literatur beschriebene diffuse Bande des *His-Tag* tragenden VapA zwischen 15 und 22 kDa (2). Durch Prozessierung auf das proteasestabile, 12 kDa große C-terminale Fragment (siehe Abschnitt 3.6) wurde eine wenig diffuse Proteinbande erreicht (1). Der Größenstandard (*Thermo Fischer Scientific*, Waltham, MA, USA, Nr. 26619, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa) wurde in Bande (3) aufgetragen und mit den entsprechenden Molekulargewichten gekennzeichnet.

Der Zellaufschluss erfolgte durch dreifaches Durchlaufen einer *French Press* (*Constant Systems*, Daventry, UK, TS Series 2.2kW) bei 20 KPSI (1350 bar). Das Lysat wurde anschließend für 40 Minuten bei 4 °C und 7155 x g zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde mit Hilfe einer IMAC im Unichromat 1500 (*UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH*, Planegg, Deutschland) über die Säule HisTrap HP (*GE Healthcare*, Chalfont St Giles, UK, Nr. 17 – 5247 – 01) das Protein VapA gewonnen. Die IMAC bestand aus vier Waschschritten und anschließender Elution, wofür LP und EP zu unterschiedlichen Imidazolendkonzentrationen gemischt wurden (Waschschritte: 10 mM, 20 mM, 80 mM und 100 mM; Elution: 500 mM). VapA wurde im Elutionsschritt von der Säule gespült, die entsprechenden Fraktionen zusammengeführt und in einem Dialyseschlauch (*Spectrum Laboratories, Inc.*, Los Angeles, CA, USA, Nr. G235053, Spectra/Por® Float-A-Lyzer® G2, 3,5 - 5 kD) nach Packungsanweisung gegen PBS dialysiert. Das Protein wurde, wie Abbildung 4.2 zeigt, in einer Coomassie-Färbung nachgewiesen. VapA führt im Gel zu einer diffusen Bande zwischen 15 und 22 kDa, was durch unterschiedliche Spaltung, Acylierung oder die Lipidmodifikation⁶ des Proteins erklärt werden kann [Tan et al., 1995; von Bargen und Haas, 2009]. Die Proteinkonzentration wurde an einem Spektralphotometer (*Thermo Fischer Scientific*, Waltham, MA, USA, NanoDrop 1000) über Messung des Absorptionsgrades bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt.

4.3.2 Prozessierung von VapA

Um VapA p12, die im Phagosom durch Proteasen gespaltene, kürzere Form von VapA, zu erhalten, wurde das aufgereinigte Protein mittels Eupergit®-gekoppelter Proteinase K (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA, Nr. 82452) proteolytisch verdaut. Die an makrosko-

⁶Das aus *E. coli*-Bakterien aufgereinigte Protein enthält nach Tan et al. [1995] eine andere Lipidmodifikation als das in *R. equi* vorkommende Protein, welche allerdings die Proteineigenschaften in ähnlicher Form beeinflusst.

pische Kügelchen gekoppelte Proteinase wurde hierfür in einer finalen Konzentration von 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ der VapA Lösung beigemischt und für 30 Minuten bei 37 °C und 650 rpm inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurden die Kügelchen bei 4 °C und 16100 x g für fünf Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Ergebnis der Prozessierung wurde mit einer Coomassie-Färbung überprüft, die in Abbildung 4.2 dargestellt ist.

4.4 LL-32 als Vergleichssubstanz zu VapA

Für einige Messungen wurde als Vergleichssubstanz das 32 Aminosäuren lange Peptid LL-32 verwendet. LL-32 ist ein α -helikales kationisches Fragment des humanen Cathelizidin hCAP18 (siehe Abschnitt 3.3) der menschlichen Immunabwehr, welches über antimikrobielle Wirkung verfügt und auch bei der Phagosomenreifung eine Rolle spielt [Cowland et al., 1995; Gutschmann et al., 2001a; Brogden, 2005]. Es ist eine um fünf C-terminale Aminosäuren verkürzte Variante des Peptids LL-37, seinerseits den C-Terminus von hCAP18 bildend. Die Aminosäuresequenz von LL-32 lautet

LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLV,

es hat ein Molekulargewicht von 3922 und trägt eine Nettoladung von $7 \cdot e_0$.

LL-32 wurde am Forschungszentrum Borstel durch die Forschungsgruppe Strukturbiochemie nach der Merrifield-Synthese mit einer C-terminalen Amidgruppe synthetisiert. Für die Experimente wurde das Peptid in 0,01% Trifluoressigsäure (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA, Nr. 91719)) gelöst.

4.5 Präparation der Lipidsysteme

Für die eingesetzten biophysikalischen Methoden wurde eine Reihe verschiedener Modellmembransysteme benötigt. Den Präparationen der Systeme liegt die in Kapitel 2.1 behandelte Selbstaggregation von Lipiden in wässrigem Lösungsmittel zugrunde. Ein Überblick über den präparativen Zusammenhang der unterschiedlichen Rekonstitutionssysteme wird in Abbildung 2.13 gegeben.

4.5.1 Präparation chloroformischer Lipidlösungen

Als Grundlage für sämtliche Membranrekonstitutionssysteme wird eine Lipidlösung in organischem Lösungsmittel benötigt. In der vorliegenden Arbeit wird als Lösungsmittel ausschließlich Chloroform (CHCl_3) verwendet. Zur Herstellung von chloroformischen Lösungen wurde in einem Rollrand-Glasfläschchen mit flachem Boden (*Macherey-Nagel*, Düren, Deutschland, Nr. 70201CG) mit einer Kappe mit PTFE-Dichtung (*Macherey-Nagel*, Nr. 70265 + 70268) die Lipideinwaage in Pulverform mit der entsprechenden Menge CHCl_3 (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland, Nr. 1.02444) versetzt. Die Lipide lösen sich spontan und liegen im Lösungsmittel als Monomere vor. Für mehrkomponentige Lipidmischungen wurden die Lösungen in einem der Molarität entsprechend berechneten Volumenverhältnis gemischt. Chloroformische Lösungen wurden bei -18 °C gelagert.

4.5.2 Präparation kleiner Vesikel

Für fluoreszenzspektroskopische Experimente (Abschnitt 4.7) und zur Präparation festkörperunterstützter Lipiddoppelschichten (Abschnitt 4.5.3) wurden SUV-Lösungen präpariert. Hierzu wurde eine chloroformische Lipidlösung in einem Gewinde-Glasfläschchen mit flachem Boden (*Macherey-Nagel*, Nr. 70213) und Kappe mit Silikon/PTFE-Dichtung (*Macherey-Nagel*, Nr. 70245) unter leichtem Stickstoffstrom eingetrocknet. Dabei bilden sich Lipidmultischichten auf dem Boden des Gefäßes. Durch Zugabe eines der gewünschten Lipidkonzentration entsprechenden Puffervolumens wurde der Lipidmultilayer hydratisiert - multilamellare Lipidaggregate oder multilamellare Lipidvesikel (MLVs) beginnen, sich selbstständig abzuschneiden [Bangham et al., 1965]. Die Lösung wurde im Folgenden zwei Minuten mit einer Ultraschallsonde (*Branson Ultrasonics Corporation*, Danbury, CT, USA, Cell Disruptor B15; später *Heinemann*, Schwäbisch Gmünd, Deutschland, HTU-SONI 130) sonifiziert⁷. Mittels der dem System zugeführten Energie entsteht aus den MLVs eine Lösung von SUVs relativ homogener Größenverteilung [Saunders et al., 1962; Huang, 1969; Szoka Jr und Papahadjopoulos, 1980]. Durch die Sonifizierung wird die Lösung stark erwärmt, was für die Stabilität der SUVs notwendig ist⁸ [Szoka Jr und Papahadjopoulos, 1980]. Im Anschluss wurden die Liposomen durch einen Temperaturzyklus, abwechselnd jeweils für 30 Minuten zweimal bei 4 °C und zweimal bei 60 °C (ober- und unterhalb der Phasenübergangstemperatur), in einen Gleichgewichtszustand gebracht. Die SUV-Lösungen wurden vor den Experimenten mindestens über Nacht bei 4 °C gelagert und innerhalb einer Woche verwendet.

Bei kleinen Vesikeln ist zu beachten, dass aufgrund der starken Membrankrümmung die Lipidverteilung zwischen äußerem und innerem Lipidlayer inhomogen sein kann [Szoka Jr und Papahadjopoulos, 1980].

4.5.3 Präparation festkörperunterstützter Bilayer

Festkörperunterstützte Bilayer wurden in Biosensormessungen (Abschnitt 4.6) und für die Rasterkraftmikroskopie (AFM) (Abschnitt 4.9) verwendet. In beiden Fällen ist das grundlegende Prinzip die Fusion von Lipidvesikeln auf einem Substrat, welches im Allgemeinen hydrophile Eigenschaften haben sollte [Brian und McConnell, 1984]. Gelangen Vesikel in die unmittelbare Nähe des Substrats, so kommt es zunächst zur Adsorption der SUVs an der Oberfläche. Durch hydrophobe und vor allem elektrostatische Wechselwirkung werden die SUVs abgeflacht und durch Defektbildung entsteht schließlich der Bilayer [Richter et al., 2006; Eeman und Deleu, 2010]. Abbildung 4.3 zeigt unterschiedliche Defektbildungswege, welche bei der Bilayerbildung koexistieren können [Richter und Brisson, 2005; Richter et al., 2006]. In Abhängigkeit vom Ladungszustand von Vesikeln und Substrat sowie von der Anwesenheit zweiwertiger Ionen, insbesondere Calcium, benötigt die Bildung eines festkörperunterstützten Bilayers durch Spreiten mehrere Minuten bis Stunden [Richter und Brisson, 2005].

Die starke Kopplung an das Substrat führt zu einem recht robusten Rekonstitutionsystem, bedingt auf der anderen Seite aber auch einen wesentlichen Nachteil gegenüber

⁷Die Leistung wurde auf Stufe 1 (Cell Disruptor B15) beziehungsweise 30% (HTU-SONI 130) eingestellt.

⁸Die Temperatur der Lösung muss während der Ultraschallbehandlung oberhalb der höchsten Phasenübergangstemperatur zwischen L_{α} - und L_{β} -Phase der beteiligten Lipide liegen, da ansonsten Defekte in den Liposomen entstehen [Szoka Jr und Papahadjopoulos, 1980].

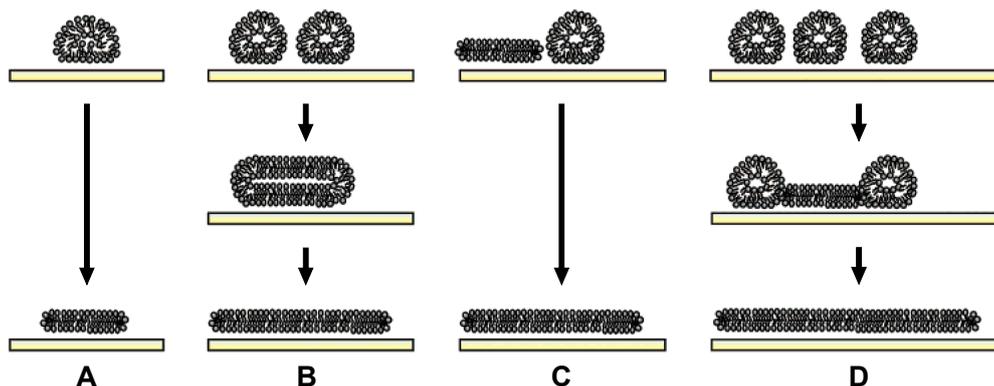


Abbildung 4.3

Schematische Darstellung der Fusion von Lipidvesikeln auf einem Substrat sowie verschiedene zur Vesikelspreitung führende Defektmechanismen. Kommen SUVs in die unmittelbare Nähe einer geeigneten hydrophoben Oberfläche, wird die Spreitung der Vesikel durch Adsorption und Abflachen der Vesikel initiiert. Um eine planare Lipiddoppelschicht zu bilden, muss es zur Bildung von Defekten an den SUVs kommen. Einerseits tritt der spontane Defekt einzelner Vesikel auf (A), andererseits wird die Defektbildung auch unter benachbarten Vesikeln vermittelt, sofern eine kritische Bedeckung der Oberfläche gegeben ist. Mechanismen sind in diesem Fall durch vorherige Fusion von Vesikeln (B), durch Wechselwirkung mit bereits gespreiteten SUVs (C) oder durch Wechselwirkung mit benachbarten gebundenen Vesikeln (D) vermittelte Defektbildung. Die verschiedenen Defektmechanismen treten in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen auf und können bei der Bildung eines Bilayers durchaus koexistieren. Modifiziert nach Richter et al. [2006].

freistehender Membranrekonstitution: Die laterale Mobilität (Vergleich Abschnitt 2.5) von Membranlipiden und insbesondere auch von eingebetteten Proteinen ist gegenüber natürlichen Membranen signifikant eingeschränkt [Eeman und Deleu, 2010]. Um den Einfluss der Oberflächenkopplung auf die Membraneigenschaften zu relativieren, kann die direkte Bindung an das Substrat durch eine indirekte ersetzt werden. Zu diesem Zweck wird das Substrat beispielsweise mit Lipopolymer-Spacern oder hydratisiertem Polymermaterial beschichtet, auf welches dann die Membran gebettet wird - Membranproteine werden auf diese Weise weniger in ihrer natürlichen Funktion eingeschränkt [Sackmann und Tanaka, 2000; Tanaka und Sackmann, 2005; Rossi und Chopineau, 2007]. Eine geeignete Unterfütterung kann sogar dienlich sein, den Einfluss des Zytoskeletts auf Biomembranen zu simulieren [Sackmann und Tanaka, 2000].

Für AFM-Messungen wurden als Substrat Muscovit-Glimmerplättchen (Muscovite-Mica-plättchen) (*Electron Microscopy Sciences*, Hatfield, PA, USA, Nr. 71855 – 01, Muscovite Mica V-1) verwendet. Dieses besteht aus ungefähr $2,5 \mu\text{m}$ dicken, ebenen Schichten, welche durch Spaltung des Schichtsilikats in reinem Zustand vorliegen. Die Glimmerplättchen wurden im Deckel einer Zellkulturschale (*Sarstedt AG & Co*, Nümbrecht, Deutschland, Nr. 83.1800.003, 35 mm Durchmesser) mit Hilfe von Zweikomponentenklebstoff (*ITW Polymers Adhesives North America*, Danvers, MA, USA, Nr. 14310, 2 Ton[®] Epoxy) fixiert. Direkt vor der Bilayerimmobilisierung wurde der Deckel mit Ethanol gespült, unter Stickstoff getrocknet und das innen liegende Glimmerplättchen durch zügiges Abziehen von Tesafilm[®] (*tesa SE*, Hamburg, Deutschland, Nr. 57329, kristall-klar) gespalten, um eine saubere Oberfläche zu erhalten. Im Anschluss wurden 3 ml einer $0,1 \mu\text{M}$ SUV-Lösung

(Abschnitt 4.5.2) im jeweiligen Messpuffer in den Deckel gegeben, dieser abgedichtet und über Nacht bei 100 rpm auf einem Schüttler (*IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland, VXR basic Vibrax®*) inkubiert, um eine möglichst gleichmäßige Bedeckung der Oberfläche durch den Bilayer zu erzielen. Vor Beginn der Messung wurde achtmal mit jeweils 1 ml Puffer gespült, um die nicht immobilisierten SUVs zu entfernen.

Im Biosensor dient ein Sensorchip mit Goldbeschichtung als Substrat. Dieser ist mit einer Dextranschicht funktionalisiert, auf welche positiv geladenes Poly-L-Lysin (PLL) aufgebracht wird. Der Sensorchip bildet die Unterseite einer Fluidzelle, in der die Immobilisierung der SUVs unter Flussbedingungen stattfindet. Die Vesikel werden mit einer festgelegten Flussrate durch die Fluidzelle geleitet, kommen dabei in Kontakt mit der Funktionalisierung des Sensorchips und bilden dort, vermittelt über die elektrostatische Wechselwirkung mit der positiv geladenen Oberfläche, einen festkörperunterstützten Bilayer. Die Dextranschicht fungiert dabei als Unterfütterung, durch welche die natürliche Fluidität der Membran möglichst erhalten bleiben soll. Da die Immobilisierung in diesem Fall im Verlauf der Messung stattfindet, wird für die Einzelheiten des Protokolls auf Abschnitt 4.6 verwiesen.

Eine alternative Methode zur Herstellung von festkörperunterstützten Lipiddoppelschichten ist der wiederholte Übertrag von zwei LB-Filmen auf ein Substrat [Tamm und McConnell, 1985]. Diese Technik wurde in der vorliegenden Arbeit lediglich zur Herstellung von Monolayern verwendet und wird im folgenden Abschnitt 4.5.4 beschrieben. Darüber hinaus ist auch das Spreiten von SUVs auf einen zuvor durch LB-Übertrag präparierten Monolayer möglich [Kalb et al., 1992].

4.5.4 Präparation von Langmuir-Blodgett-Filmen

Festkörperunterstützte Monolayer wurden für die Untersuchung der Membrantopografie am Rasterkraftmikroskop (AFM) verwendet (Abschnitt 4.9.1). Als Grundlage für den LB-Übertrag dient ein Lipidmonolayer, der an der Grenzfläche zwischen Luft und Flüssigkeit im Trog der Filmwaage gebildet wird. Die Lipide ordnen sich dabei so an, dass die Kopfgruppen zur Flüssigkeit zeigen [von Tscherner und McConnell, 1981]. Indem ein Substrat mit hydrophiler Oberfläche langsam aus dem Medium gezogen wird, lässt sich unter Aufrechterhaltung eines konstanten Lateraldrucks der Monolayer auf das Substrat übertragen [Riegler und Spratte, 1992] und stellt ein robustes und für verschiedene Methoden zugängliches Rekonstitutionssystem dar. Die Bedingungen des Übertrags und die Wechselwirkung zwischen Lipidmonoschicht und Substrat haben dabei Einfluss auf die molekulare Ordnung der Lipide [Riegler und Spratte, 1992]. Wird das Substrat wiederholt durch den Monolayer geführt, so resultieren Doppel- oder Mehrfachlipidschichten [Tamm und McConnell, 1985]. Das Prinzip des LB-Übertrags ist in Abbildung 4.10 schematisch dargestellt, die Funktion einer Filmwaage wird in Abschnitt 4.8 näher beschrieben.

Zur Präparation der LB-Filme wurde der Trog einer Filmwaage (*Biolin Scientific AB, Stockholm, Schweden, KSV Nima KN1002*) mit 60 ml Puffer (150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 6,5) befüllt. Ein auf 1,5 cm x 2,5 cm zugeschnittenes und frisch mit Klebefilm abgezogenes Micaplättchen wurde dann mit der oberen Kante in den Greifer des Tauchmechanismus der Filmwaage eingespannt und soweit unter die Flüssigkeitsoberfläche gefahren, dass der Greifer nicht die Flüssigkeitsoberfläche berührte. Nun wurden 7 μ l chloroformisch gelöster Lipide (Abschnitt 4.5.1) mit exakt bekannter Konzentration mit Hilfe einer Hamiltonspritze tropfenweise auf der Pufferoberfläche abgesetzt. Dem Lösungsmittel wurde Zeit

zum Abdampfen gegeben. Mit einer Geschwindigkeit von 10 mm/min der beiden Barrieren der Filmwaage wurde der Film bis zum gewünschten Lateraldruck des Lipidmonolayers von 10 mN/m oder 20 mN/m komprimiert. Gegebenenfalls wurde zu diesem Zeitpunkt VapA mit einer finalen Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ oder 0,2 $\mu\text{g/ml}$ unter den Monolayer in den Puffer injiziert und dem System eine, zwei oder drei Stunden Zeit zur Wechselwirkung gegeben. Im Anschluss wurde das Micaplättchen mit einer Geschwindigkeit von 0,6 mm/min senkrecht aus der Flüssigkeit gezogen und dabei der Lateraldruck durch Regulierung der Barrieren konstant gehalten. Dadurch wird eine homogene Bedeckung des Substrats mit Lipidmolekülen erreicht. Die Kopfgruppen der Lipide richten sich zur hydrophilen Micaoberfläche aus. Die Micaplättchen wurden mit wenig Silikonfett (*GE Bayer Silicones GmbH & Co. KG*, Erkrath, Deutschland, Baysilone-Paste mittelviskos) auf Objektträgern fixiert und bei Raumtemperatur trocken gelagert. Die LB-Filme sind über Monate hinweg haltbar.

4.6 Biosensor auf Basis von oberflächennah geführten Volumenwellen

Der Biosensor wurde für die Untersuchung von Bindung und Wechselwirkung von VapA an festkörperunterstützten Membranrekonstitutionssystemen verwendet. Als hochsensitive Methode für die Massendetektion an Oberflächen wurden auf akustischen Wellen basierende Biosensoren zunächst für die Gassensorik eingesetzt [Lange et al., 2008]. Am weitesten verbreitet ist die sogenannte Quarzkristallmikrowaage (QCM), bei der Änderungen der Resonanzfrequenz von transversalen, elastischen Volumenwellen in einem Quarzkristall zur Mikrowägung in Gasen und Flüssigkeiten dienen [Janshoff et al., 2000].

Mit der Entwicklung von Interdigitaltransducern (IDT) [White und Voltmer, 1965] gelang es, an piezoelektrischen Materialien akustische Oberflächenwellen (SAW) zu generieren und deren hohe Sensitivität gegenüber Veränderungen von Masse, Viskosität und elektrischer Leitfähigkeit in oberflächennahen Schichten [Lange et al., 2008] für die Sensorik zu nutzen. Eine Weiterentwicklung dieses Konzepts sind oberflächennah geführte Volumenwellen, welche insbesondere in Flüssigkeiten, bedingt durch die Minimierung von Dämpfungsverlusten, eine gegenüber reinen Oberflächenwellen verbesserte Oberflächensensitivität aufweisen [Lange et al., 2008; Rocha-Gaso et al., 2009]. Diese auch als Love-Wellen (LW) bezeichneten geführten Oberflächenscherswellen [McHale et al., 2002] werden durch eine auf das piezoelektrische Substrat aufgebrachte Führungsschicht geleitet, in welcher die Ausbreitungsgeschwindigkeit geringer ist als in den umgebenden Materialien⁹ [Rocha-Gaso et al., 2009]. LW sind transversale Wellen, ihre Auslenkungsrichtung steht somit senkrecht zur Propagationsrichtung.

Die möglichen Anwendungen von auf akustischen Kristallwellen basierenden Biosensoren reichen von der spezifischen Detektion von Proteinen, Zellen und Krankheitserregern durch immobilisierte Rezeptoren bis zu der in dieser Arbeit angewandten Untersuchung von Protein-Lipid-Wechselwirkungen an festkörperunterstützten Membranen [Andrä et al., 2008; Gronewold, 2007; Janshoff et al., 2000; Moll et al., 2007].

Der Quarzchip des verwendeten Biosensors befindet sich in einem Flusssystem - durch eine aufgesetzte Fluidzelle fließt Puffer mit konstanter Geschwindigkeit. Er besteht aus

⁹Für eine ausführlichere Abhandlung zu unterschiedlichen akustischen Kristallwellen sei an dieser Stelle auf Nehls [2011] verwiesen.

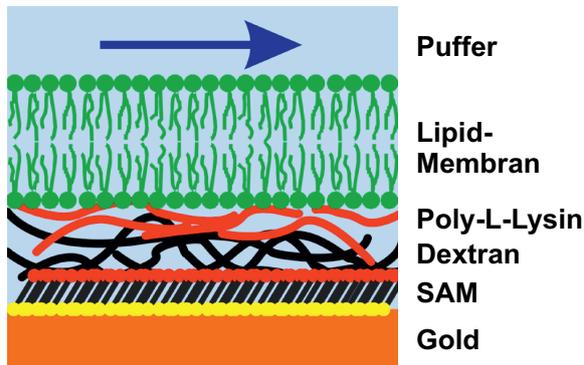


Abbildung 4.4

Funktionalisierung des für Biosensormessungen verwendeten Sensorchips. Auf die als Führungsschicht fungierende Goldbeschichtung des Quarzchips wurde ein selbstanordnender Monolayer (SAM) aus 11-Mercapto-1-Undecanol aufgebracht. Dieser wurde mit einer polsternden Schicht aus langen Dextranmolekülen bedeckt. Unmittelbar vor der Messung wurde PLL durch Injektion in das Flusssystem des Biosensors auf das Dextran gebracht. Dieses bringt positive Ladungen auf die Oberfläche, wodurch sich bevorzugt negativ geladene Liposomen über elektrostatische Wechselwirkung auf der Oberfläche immobilisieren lassen. Das Protokoll der Funktionalisierung wurde von Andrä et al. [2008] und ausführlich von Nehls [2011] beschrieben. Modifiziert nach Andrä et al. [2008].

fünf nebeneinander angeordneten Messkanälen, die vom Puffer in Reihe durchlaufen werden. Wird in den Pufferfluss eine Vesikel- oder Proteinlösung injiziert, so passiert diese nacheinander die Messkanäle und kommt in direkten Kontakt mit der Chipoberfläche. Diese ist so funktionalisiert, dass Vesikel, die negativ geladene Lipide enthalten, bevorzugt auf der Oberfläche spreiten und einen festkörperunterstützten Bilayer bilden (siehe Abschnitt 4.5.3). Die Funktionalisierung der Sensorchips ist Abbildung 4.4 zu entnehmen. Jeder Kanal des Sensorchips besteht aus einem als Sender und einem als Empfänger fungierenden IDT und einer dazwischen befindlichen sensitiven Fläche, welche mit dem Puffer in Berührung kommt (Abbildung 4.5). Die IDTs werden jeweils aus zwei ineinander verschränkten, fingerförmigen Elektroden gebildet. Wird eine Wechselspannung an den Sender-IDT angelegt, so werden in Abhängigkeit von Sensorgeometrie und Materialeigenschaften über den inversen Piezoeffekt Oberflächen- und Volumenwellen in unterschiedlichen Anteilen generiert [Arnau, 2008, Kap. 2]. Im vorliegenden Fall ist der Hauptanteil eine akustische Volumenwelle, welche durch die Goldoberfläche des Chips entlang der sensitiven Fläche propagiert und am Empfänger-IDT über den direkten Piezoeffekt wieder in ein elektrisches Signal umgewandelt wird¹⁰. Da die akustische Welle in das an die Führungsschicht angrenzende Medium einkoppelt, werden die Welleneigenschaften durch angrenzende Schichten modifiziert. Durch den Vergleich der Messvariablen Phase und Amplitude von Eingangs- und Ausgangssignal können, wie wir später sehen werden, Rückschlüsse über die Massenbelegung auf der Chipoberfläche und die Viskosität der oberflächennahen Schichten gezogen werden [Rocha-Gaso et al., 2009]. Die Geometrie von Sensorkanal und Flusssystem ist in Abbildung 4.5 schematisch verdeutlicht.

Für eine laufende SAW und auch speziell für eine LW, die mit der Phasengeschwindigkeit $v_p = \sqrt{\kappa/\rho}$ durch ein Material der Dichte ρ mit Elastizitätsmodul κ propagiert, lautet

¹⁰Wegen der zeitlichen Verzögerung, die das Signal durch die geringe Ausbreitungsgeschwindigkeit in der Führungsschicht erfährt, wird bei dieser Anordnung von einer Verzögerungsleitung gesprochen.

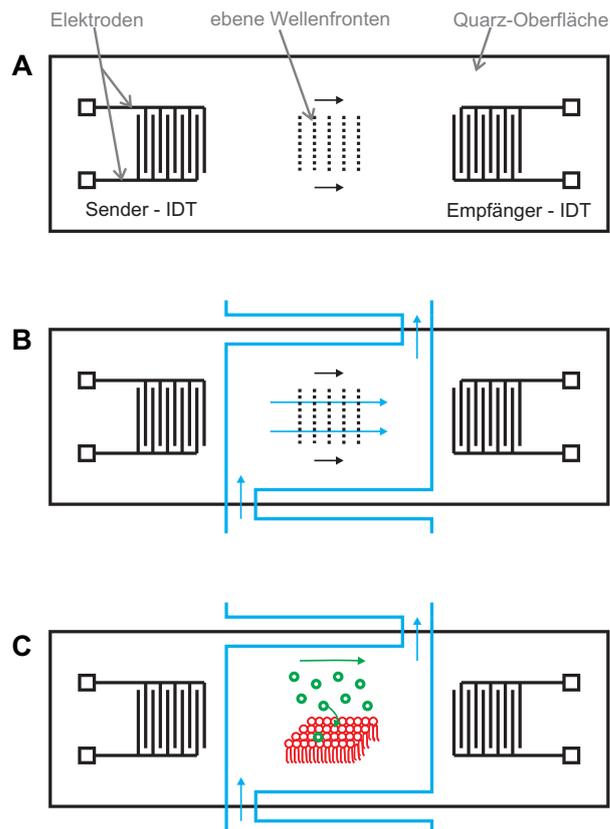


Abbildung 4.5

Geometrie eines Sensorkanals des Biosensorchips und der Fluidzelle. (A) Die beiden IDTs des Sensorkanals sind in Verzögerungsleitung-Konfiguration angeordnet. Durch eine angelegte Wechselspannung generiert der Sender-IDT entlang der sensitiven Fläche propagierende Wellenfronten, die vom Empfänger-IDT wieder in ein elektrisches Signal transformiert werden. (B) Der durch die aufgesetzte Fluidzelle strömende Puffer passiert nacheinander die sensitiven Bereiche der fünf Messkanäle. Die Eigenschaften der Welle werden durch oberflächennahe Schichten modifiziert und geben Aufschluss über die Größen Massenbelegung und Viskosität. (C) Wird in diesen Pufferstrom eine SUV-Lösung injiziert, so spreiten die SUVs auf der Funktionalisierung des Chips und bilden einen Bilayer (rot; hier schematisch als Monolayer dargestellt). Somit kann die Wechselwirkung anschließend injizierter membranaktiver Substanzen (grün) mit der Membran untersucht werden.

nach Uttenthaler [2002] die Wellengleichung:

$$\frac{\partial \Sigma_{ij}}{\partial j} = \left(\rho - \frac{\kappa}{v_p^2} \right) \cdot \frac{\partial^2 u_i}{\partial j^2}. \quad (4.1)$$

Sie beschreibt die zeitliche Veränderung der Auslenkung $u_i(j, t)$ der Atome, die senkrecht zur Propagationsrichtung j der Welle orientiert ist, als Wirkung eines Gradienten des Spannungstensors Σ_{ij} in Ausbreitungsrichtung j . Die Wellengleichung unterscheidet sich von stehenden Kristallwellen durch den Subtrahenden κ/v_p^2 , um den die Dichte des Festkörpers reduziert wird. Für den Fall einer QCM, bei der eine stehende Welle vorliegt, lässt sich damit die Abhängigkeit der Resonanzfrequenz $f_0 = v_p/2l_R$ von der Dicke des Quarzes beziehungsweise vom Abstand l_R der reflektierenden Kristallflächen zeigen.

Unter der Voraussetzung einer idealen Scherschwingung in einem Substrat der Fläche A , auf welchem sich eine dünne, nicht viskose Fremdschicht der Masse m_f befindet, entspricht der Einfluss der Fremdschicht auf die Resonanzfrequenz genau der Wirkung einer Schicht des Substrates mit der gleichen Masse [Sauerbrey, 1959]. Diese Substratschicht der Dichte ρ muss dann eine Dicke d_S aufweisen. Mit dieser Überlegung lässt sich zeigen, dass die Änderung Δf der Resonanzfrequenz eine Funktion der Massenbelegung $\gamma = m_f/A$ ist [Sauerbrey, 1959; Arnau, 2008]:

$$\Delta f = -\frac{f_0}{d_S \cdot \rho} \cdot \gamma. \quad (4.2)$$

Die Schichtwäageempfindlichkeit $C_f = f_0 / (d_S \cdot \rho)$ dieser Sauerbrey-Gleichung enthält dabei alle Materialeigenschaften des Substrats.

Für laufende SAW und LW ergibt sich analog

$$\Delta v \approx -C_v \cdot \gamma \quad (4.3)$$

mit der angepassten Wäageempfindlichkeit C_v [Uttenthaler, 2002]. Allerdings liegen im Fall von LW keine reinen Scherwellen vor, die Sauerbrey [1959] als Voraussetzung formuliert hatte. Liegt darüber hinaus eine nicht dünne, aber viskose Fremdschicht vor, ist der lineare Zusammenhang zwischen Phasengeschwindigkeit und Massenbelegung keine gute Näherung mehr.

Neben der Massenbelegung erlaubt die Modifizierung der Welleneigenschaften auch Rückschlüsse über die Viskosität der angrenzenden Schichten. Für stehende Wellen fanden Kanazawa und Gordon [1985a,b] für viskose, Newton'sche Flüssigkeiten die Beziehung

$$\Delta f = -f_0^{3/2} \cdot \sqrt{\frac{\rho_l \eta_l}{\pi \rho c}} \quad (4.4)$$

zwischen den Flüssigkeitseigenschaften Dichte ρ_l und Viskosität η_l und der verursachten Verschiebung Δf der Resonanzfrequenz. Bei laufenden Wellen werden bei Änderungen von Viskosität oder Dichte in unmittelbarer Nähe der Chipoberfläche sowohl die Phasengeschwindigkeit v_p als auch die Dämpfung α der Welle modifiziert [Uttenthaler, 2002]:

$$\Delta v = -C_{lv} \cdot \sqrt{\rho_l \eta_l} \quad (4.5)$$

$$\Delta \alpha = C_{l\alpha} \cdot \sqrt{\rho_l \eta_l}. \quad (4.6)$$

Die Material- und weitere Flüssigkeitseigenschaften sind dabei in den frequenzabhängigen Flüssigkeitskonstanten C_{lv} und $C_{l\alpha}$ zusammengefasst.

Die Phasengeschwindigkeit wird also von zwei Messgrößen - der Massenbelegung und der Viskosität - beeinflusst, während die Dämpfung ausschließlich von der Viskosität abhängig ist. Die Messvariablen sind Phasenverschiebung $\Delta\varphi(\gamma, \eta)$ und Amplitudenänderung $\Delta A(\eta)$. Streng genommen haben neben der Viskosität auch weitere Flüssigkeitseigenschaften wie Elastizität und Dichte Wirkung auf die Welleneigenschaften. Diese Einflüsse können in Ermangelung eines geeigneten Modells für das vorliegende System nicht voneinander getrennt werden, weshalb im Folgenden stellvertretend die Viskosität genannt wird. Gleiches gilt für die Trennung der Wirkungen von Massenbelegung und Viskosität auf die Phasengeschwindigkeit - auch hier existiert für das komplexe Mehrschichtsystem aus Funktionalisierung und Membran kein geeigneter Formalismus, sodass lediglich qualitative Aussagen über die Messgrößen möglich sind.

4.6.1 Versuchsaufbau und Durchführung der Biosensormessungen

Das Biosensorgerät besteht aus einem Autosampler mit einer Pumpe zur Probenentnahme und einer Sensoreinheit. Letztere enthält die Elektronik zur Signalerzeugung und -Detektion sowie die Flusszelle, unter die der funktionalisierte Sensorchip gesetzt wird. Die IDTs der fünf Messkanäle werden simultan angeregt. Dies geschieht abwechselnd bei zwei gegeneinander um 180° verschobenen Frequenzen zwischen 130 und 170 MHz, wodurch Übertragungsunregelmäßigkeiten automatisch ausgeglichen werden [Gronewold, 2007]. Vorbereitete Probengläschen werden in den Autosampler eingeordnet. Eine zusätzliche

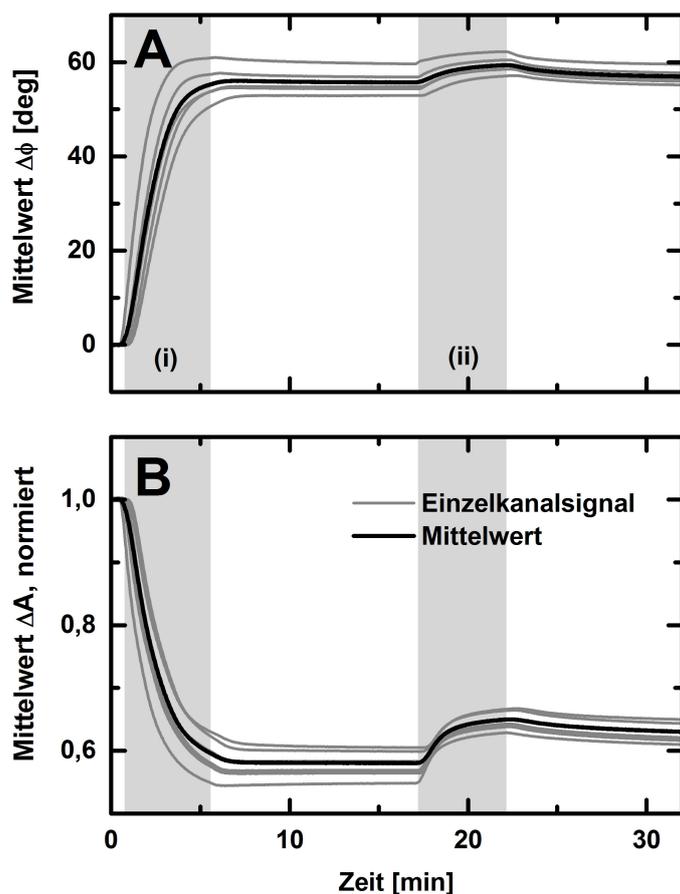


Abbildung 4.6
Immobilisierung von $100 \mu\text{l}$ DOPC:SM:Chol Vesikeln ($300 \mu\text{g/ml}$) auf der Funktionalisierung (i) und Bindung von $100 \mu\text{l}$ VapA ($100 \mu\text{g/ml}$) an der Membran (ii). Weiße Flächen zeigen die Dissoziationsperioden an. Gezeigt sind Phasen- (A) und Amplitudensignal (B) der fünf in Serie durchlaufenen Sensorkanäle (grau) sowie die entsprechenden Mittelwertkurven (schwarz). Die Signale wurden zum Beginn der Liposomeninjektion auf 0 beziehungsweise 1 normiert. Ein Anstieg des Phasensignals entspricht einer zusätzlichen Massenbelegung, Änderungen der Amplitude können als Fluidisierung (Abfall) beziehungsweise Rigidisierung (Anstieg) interpretiert werden.

Pumpeneinheit regelt den stetigen Pufferfluss von üblicherweise $20 \mu\text{l}/\text{min}$ aus einer Laborglasflasche durch die Flusszelle über den Sensorchip - ein einzelner Kanal hat dabei ein Volumen von $3,9 \mu\text{l}$. Ein Peltierheizelement reguliert die Temperatur in der Umgebung des Sensorchips auf konstante $22 \text{ }^\circ\text{C}$. In den Pufferfluss werden nach programmierbaren Protokollen definierte Volumina der Proben aus dem Autosampler injiziert. Die Programmierung der Messprotokolle wird mit der Software SequenceMaster (*SAW Instruments GmbH*¹¹, Bonn, Deutschland) vorgenommen. Die Durchführung der Messungen erfolgte mit der Software SensMaster (*SAW Instruments GmbH*, Bonn, Deutschland). Die Rohdaten für Phasenänderung und Amplitudenänderung liegen im Dateiformat '*.saw' vor und lassen sich als '*.txt' Datei exportieren.

Vor jeder Messung wurde der Sensorchip mit Ethanol gespült und unter Stickstoff trockengeblasen. Die optimalen Messfrequenzen wurden mit Hilfe der Messsoftware bestimmt. Während der Messung erfolgten die Probeninjektionen nach dem folgenden Schema: Zunächst wurde der Chip mit aufeinanderfolgenden Injektionen von $100 \mu\text{l}$ einer $0,1 \text{ M}$ Natronlauge (*VWR International*, Radnor, PA, USA, Nr. 31720.294) und $100 \mu\text{l}$ einer Reinigungslösung aus 100 mM Glycin (*SERVA Electrophoresis GmbH*, Heidelberg, Deutschland, Nr. 23390.04) und $0,1 \%$ Triton X-100 (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland, Nr.

¹¹SAW Instruments GmbH wurde 2014 von der NanoTemper Technologies GmbH (München, Deutschland) übernommen.

8603) mit pH-Wert 12 gereinigt. Anschließend wurden 100 μl einer Kalibrierungslösung aus 5 % Glycerin (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland, Nr. 4094) injiziert, mit welcher nach Herstellerangaben eine Trennung der Einflüsse von Massenbelegung und Viskosität auf die Phase möglich ist¹². Die dritte Schicht der Funktionalisierung wurde durch eine Injektion von 100 μl PLL (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA, Nr. 81338, MW 30.000-70.000) auf die sensitive Fläche des Sensorchips gebracht. Es folgten die Injektionen von 100 μl SUV-Lösung (Abschnitt 4.5.2) und 100 μl VapA (Abschnitt 4.3) in den jeweiligen Konzentrationen. Nach diesen Injektionen wurde jeweils eine Wartezeit von zehn Minuten eingehalten. Es folgten wiederum die beiden oben beschriebenen Reinigungsinjektionen mit Natronlauge und Reinigungslösung.

Während die Substanzen im Medium über dem Sensorchip vorhanden waren, konnte eine Assoziation auf dem Chip beobachtet werden. Nachdem die Substanzen den Messkanal passiert hatten, kam es zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Dissoziation - im nachfolgenden Pufferfluss wurde ungebundenes Material wieder abgespült.

Die Verarbeitung der Daten erfolgte mit der Software Origin[®] 9.0G (*OriginLab Corporation*, Northampton, MA, USA). Die Kurven wurden zum Zeitpunkt der jeweiligen Injektion normiert und aus den Daten der fünf Messkanäle eine Mittelwertkurve gebildet. Eine beispielhafte Grafik von Liposomen- und VapA-Injektion der fünf Kanäle inklusive Mittelwert ist in Abbildung 4.6 dargestellt.

4.7 Fluoreszenzspektroskopische Analysen

Mit Hilfe von fluoreszenzspektroskopischen Messungen wurde die Interkalation von VapA in farbstoffmarkierte SUVs sowie die Induzierung von Vesikelfusionsereignissen untersucht. Das Versuchsdesign basierte auf dem von Förster [1948] beobachteten Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Durch Markierung mit einem FRET-Fluoreszenzfarbstoffpaar können in biologischen Proben individuelle oder mittlere Abstände in der Größenordnung von wenigen Nanometern zwischen den beiden Fluorophoren bestimmt werden. Mit diesem Ansatz ist es möglich, auf Einzelmolekülbasis molekulare Vorgänge wie Konformationsänderungen zu verfolgen [Roy et al., 2008]. Für einige Anwendungen ist bereits eine zeitliche Auflösung im Picosekundenbereich möglich [Poland et al., 2015]. Darüber hinaus können FRET-Experimente in lebenden Zellen durchgeführt werden [Sekar und Periasamy, 2003], was eine nützliche Möglichkeit zum Vergleich verschiedener Versuchssysteme bietet.

Wenn eine Substanz elektromagnetische Strahlung einer bestimmten Wellenlänge absorbiert und mit einem kurzen Zeitversatz in der Größenordnung von 10^{-8} s bis 10^{-9} s Strahlung von höherer Wellenlänge beziehungsweise niedrigerer Energie emittiert, spricht man von Fluoreszenz [Behlke et al., 2005]. Die dabei relevanten elektronischen Zustände innerhalb eines als Fluorophor bezeichneten Moleküls sind auf der linken Seite von Abbildung 4.7 anhand eines Jablonski-Diagramms veranschaulicht. Durch die Absorption eines Photons der Energie $h \cdot \nu_A$ wird das Molekül von seinem elektronischen Grundzustand S_0 auf einen angeregten Energiezustand S_1 gehoben, deren Energiedifferenz der Anregungsenergie entsprechen muss. Das angeregte Molekül kann die Anregungsenergie über verschiedene Kanäle abgeben, um in den Grundzustand zurückzukehren. Strahlungsfreie

¹²Diese Trennung ist jedoch, wie oben begründet, ohne einen geeigneten Formalismus für das vorliegende Messsystem nicht möglich.

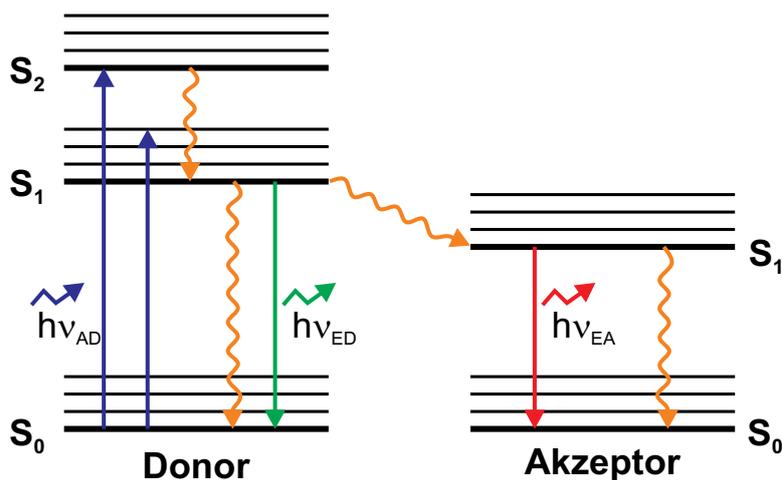


Abbildung 4.7

Jablonski-Diagramm für FRET-*Quenching* zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor. Wird der Donor mit der Energie $h \cdot \nu_{AD}$ (blau) aus dem Grundzustand S_0 auf einen höheren Energiezustand S_1 angeregt, so stehen ihm verschiedene Übergänge zur Verfügung, um wieder in S_0 zu gelangen. Strahlungsfreie Übergänge (orange) wie innere Umwandlung und *Quenching*-Prozesse wandeln die Anregungsenergie häufig in Wärme um. Bei Fluorophoren ist zudem ein Fluoreszenzübergang (grün) möglich, also die Emission von Strahlung der Energie $h \cdot \nu_{ED}$. Ein geeigneter Akzeptor stellt dem Donor einen weiteren strahlungsfreien Übergang zur Verfügung. Unter bestimmten Voraussetzungen kann der Donor durch Energieübertrag (FRET) auf den Akzeptor in den Grundzustand gelangen, wodurch der Akzeptor seinerseits auf S_1 angeregt wird und mit der Energie $h \cdot \nu_{EA}$ fluoreszieren kann (rot). Dicke horizontale Linien: Vibrationsgrundzustände; dünne horizontale Linien: angeregte Vibrationszustände.

Kanäle sind die innere Umwandlung sowie der Intersystem-Übergang¹³ [Kasha, 1950]. Fluorophore verfügen zudem über einen Strahlungskanal, um über die Emission eines Photons der Energie $h \cdot \nu_E$ in den S_0 -Zustand zurückzukehren. Während der sogenannten Fluoreszenzlebensdauer relaxiert das Molekül innerhalb des S_1 Zustands in den vibronischen Grundzustand [Kasha, 1950], was einer der Gründe für die von Stokes [1852] beschriebene Gesetzmäßigkeit ist, dass emittierte Strahlung höchstens dieselbe Energie haben könne wie die anregende Strahlung. Die Maxima der typischen Absorptions- und Emissionsspektren von Fluorophoren, deren häufiges Merkmal aromatische Ringsysteme sind, sind gegeneinander um die Stokes-Verschiebung versetzt [Behlke et al., 2005].

Als *Quenching*-Prozesse werden strahlungsfreie Kanäle oder Übergänge bezeichnet, welche mit dem Fluoreszenzübergang in Konkurrenz stehen, also die Fluoreszenzintensität einer Probe verringern [Ho et al., 1986]. Die diese Übergänge vermittelnden Moleküle werden *Quencher* genannt. Allgemein wird zwischen statischem oder Komplexbildungs-*Quenching* und dynamischem oder Stoß-*Quenching* unterschieden [Eftink und Ghiron, 1981; Ho et al., 1986]. Zur letzteren Kategorie wird auch FRET gezählt. Durch die Anwesenheit eines als *Quencher* fungierendem Akzeptorfluorophors wird dabei die Fluoreszenz eines Donorfluorophors reduziert. Eine geeignete Kombination von Donor und Akzeptor wird

¹³Beim Intersystem-Übergang ändert sich der Spin-Zustand beziehungsweise die Multiplizität, bei der inneren Umwandlung verbleibt das System in einem Singulett-Zustand [Kasha, 1950]. In Abbildung 4.7 sind lediglich Übergänge zwischen Singulett- (S-) Zuständen dargestellt.

als FRET-Paar bezeichnet. Die Energiezustände und Übergänge dieses Prozesses finden sich in Abbildung 4.7. Der angeregte Donor hat unter bestimmten Voraussetzungen die Möglichkeit, durch strahlungsfreien Energietransfer auf den Akzeptor in den Grundzustand zurückzukehren - der Akzeptor emittiert dann seinerseits Strahlung seines charakteristischen Emissionsspektrums. Die erwähnten Voraussetzungen sind einerseits ein Überlapp des Donor-Emissionsspektrums mit dem Akzeptor-Absorptionsspektrum, andererseits die räumliche Nähe der beiden Fluorophore [Behlke et al., 2005]. Da der Energieübertrag durch eine Dipol-Dipol-Wechselwirkung der beiden Fluorophore vermittelt wird [Förster, 1948], wird die Wahrscheinlichkeit eines Übertrags beziehungsweise die Übertragungseffizienz im Ensemble - im Folgenden als FRET-Effizienz E_F bezeichnet - außerdem durch die Orientierung der Dipolmomente von Donor und Akzeptor zueinander beeinflusst. Der maximale Wert liegt dabei bei paralleler Ausrichtung vor [Michalet et al., 2003].

Für die FRET-Effizienz zwischen zwei geeigneten Fluorophoren im Abstand R lässt sich der Zusammenhang

$$E_F = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6} \quad (4.7)$$

formulieren, wobei im Ensemble eine Mittelung über alle Orientierungen der Fluorophore zueinander und über alle Abstände vorgenommen werden muss [Förster, 1948; Clegg, 1995]. Der Abstand R_0 der Fluorophore, bei welchem die Energietransferrate bei 50% liegt, wird als Förster-Radius bezeichnet. E_F entspricht dem Verhältnis des Donor-Signalverlusts (unter Anwesenheit des Akzeptors) zum ungequenchten Donorsignal (ohne Anwesenheit des Akzeptors) [Gordon et al., 1998]. Die starke Abhängigkeit der FRET-Effizienz vom Inversen der sechsten Potenz des Abstands der Fluoreszenzfarbstoffe macht FRET zu einer sehr sensitiven Methode, um Abstände in der Umgebung von R_0 zu bestimmen, der typischerweise zwischen 3 und 6 nm liegt [Sekar und Periasamy, 2003]. Die zugrundeliegende Dipol-Dipol-Wechselwirkung ist auf einen Abstand von höchstens 10 nm beschränkt und bildet damit eine obere Schranke für das Auftreten des Energietransfers. Diese lässt sich jedoch durch geeignete Versuchsdesigns, beispielsweise über Verwendung mehrerer Fluorophore, erweitern [Roy et al., 2008].

4.7.1 Messaufbau und Durchführung der spektroskopischen Messungen

Die Experimente wurden an einem Dreiarml-Fluoreszenzspektrometer (*HORIBA Jobin Yvon*, Edison, NJ, USA, Fluorolog 3) durchgeführt. Als Strahlungsquelle dient eine Xenon-Kurzbogenlampe, deren Strahlung einen Monochromator passiert. Die monochromatische Strahlung trifft auf die temperierte Probe und regt bei geeigneter Wahl der Anregungswellenlänge den Donor an. Bei Anwesenheit eines Akzeptors müssen die Fluoreszenzintensitäten der beiden Fluorophore separat detektiert werden. Für diesen Zweck verfügt das Spektrometer über zwei identische Strahlarme, bestehend aus einem Monochromator und einem Detektor, die jeweils in einem Winkel von 90° zur einfallenden Strahlung positioniert sind und mit dem Anregungsarm eine T-förmige Konfiguration bilden. Jeder Detektorarm sowie der Strahlengang der einfallenden Strahlung ist zudem mit einem Bandpassfilter ausgestattet, über welchen sich die Intensitäten individuell regulieren lassen.

Bei der Markierung biologischer Systeme mit Fluorophoren muss grundsätzlich bedacht werden, dass der Fluorophor selbst Einfluss auf den Gegenstand der Beobachtungen

haben kann, was für die Markierung von Membransystemen beispielsweise von Baumgart et al. [2007] berichtet wird. In dieser Arbeit wurden Vesikellösungen mit dem FRET-Paar Rhodamin und NBD markiert, um mittels Fluoreszenzspektroskopie Informationen über die Änderung des mittleren Abstands der Fluorophore innerhalb einer großen Vesikelpopulation zu gewinnen. Dabei wurden zwei verschiedene Versuchsdesigns verwendet, deren Prinzip in Abbildung 4.8 ersichtlich ist und die im Folgenden beschrieben werden. Das Prinzip der Spektroskopie an Vesikelpopulationen und der Einsatz des FRET-Paars NBD und Rhodamin wurde von Struck et al. [1981] beschrieben.

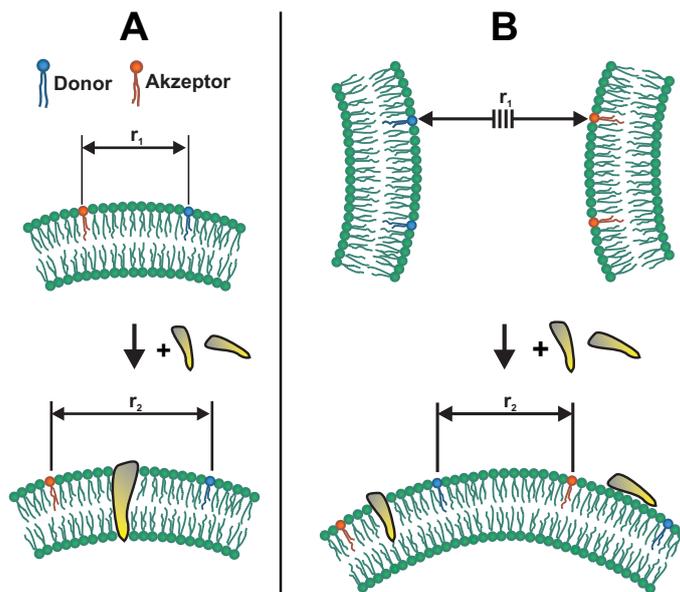


Abbildung 4.8

Versuchsdesigns für fluoreszenzspektroskopische Messungen zur Interkalation von Proteinen in Lipidliposomen und zur Induzierung von Fusionsereignissen. (A) Die SUVs sind mit Donor und Akzeptor eines FRET-Paars markiert. Interkalieren membranaktive Substanzen (gelb) zwischen die Lipide der SUVs, so steigt der mittlere Abstand der Fluorophore - dies kann als Reduzierung der FRET-Effizienz detektiert werden. (B) Zwei SUV-Populationen, eine mit dem Donor und eine mit dem Akzeptor eines FRET-Paars markiert, werden miteinander gemischt. Da die Fluorophore auf unterschiedlichen SUVs separiert sind, findet kein Energietransfer statt. Werden durch die Anwesenheit membranaktiver Substanzen Fusionsereignisse zwischen den SUVs induziert, so ist ein Anstieg der FRET-Effizienz zu verzeichnen, da die Separation der Fluorophore aufgelöst wird.

Das erste Protokoll diente der Untersuchung der Interkalation von VapA in Lipidliposomen. Findet ein Einbau von Proteinen in mit beiden Fluorophoren eines FRET-Paars markierten Liposomen statt, so vergrößert sich der mittlere Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfarbstoffen. Da hierdurch die FRET-Effizienz abnimmt, kann qualitativ ein Anstieg der Donorfluoreszenz bei niedrigerer Akzeptorfluoreszenz registriert werden [Gutsmann et al., 2000].

1960 μl einer mit jeweils 0,5% rh-DHPE und NBD-PE markierten SUV-Lösung (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden in eine Quarzglaszuvette (*Hellma GmbH & Co. KG*, Müllheim, Deutschland, 101-QS, 3,5 ml) gegeben und in der Probenkammer des Spektrometers positioniert. Die Kammer wurde durchgehend auf 37 °C erwärmt und die Lösung mit einem Magnetrührer kontinuierlich gerührt, um eine gleichmäßige Verteilung der Vesikel zu gewährleisten. Über die Bandpassfilter wurden die Intensitäten von Donor- und Akzeptorfluoreszenz auf ein Verhältnis von etwa 1 eingestellt. Nach dem Starten der Messwertaufnahme wurde zunächst die Grundlinie aufgenommen. Nach 50 s wurde die Messung möglichst kurz

für eine Injektion von 40 μl VapA (0,5 mg/ml) unterbrochen, sodass ein Gewichtsverhältnis von 1:1 (Lipid zu Protein) gegeben war. Der Donor NBD wurde während der Messung mit einer Wellenlänge von 470 nm angeregt und die Fluoreszenzintensitäten bei 531 nm (NBD) und 593 nm (Rhodamin) detektiert. Die Steuerung von Fluoreszenzspektrometer und Messverlauf geschah mit der in Origin 8.1 implementierten Software FluorEssence V3.5 (HORIBA Jobin Yvon, Edison, NJ, USA).

Das zweite Protokoll wurde für die Detektion von Fusionsereignissen zwischen SUVs verwendet. Sind die beiden Fluorophore zu Beginn der Messung auf unterschiedlichen Liposomen separiert, so kann eine durch membranaktive Moleküle vermittelte Fusion der Vesikel detektiert werden. Aufgrund der Durchmischung der Membranlipide der fusionierenden SUVs verringert sich der Abstand der Fluoreszenzfarbstoffe des FRET-Paars. Bei geeigneter Wahl der Fluorophorkonzentrationen kommt es zum Energieübertrag und damit zum Anstieg der Akzeptorfluoreszenz bei Reduzierung der Donorfluoreszenz. Ein alternatives Versuchsdesign zur Detektion von Vesikelfusionen wurde von Struck et al. [1981] erläutert.

Für dieses Protokoll wurden 980 μl einer mit 0,5% rh-DHPE markierten SUV-Lösung mit 980 μl einer mit 0,5% NBD-PE markierten SUV-Lösung (jeweils 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit ansonsten identischer Lipidzusammensetzung in einer Quarzglasküvette vermischt. Im Weiteren entsprach der Versuchsablauf dem Protokoll zur Interkalationsdetektion.

Die Verarbeitung und grafische Darstellung der Messdaten erfolgte mit der Software Origin[®] 9.0G. Dargestellt wurde der Quotient aus Donor- und Akzeptorintensität.

4.8 Messungen an der Filmwaage

Eine weitere Methode zur Untersuchung des Einbaus von VapA in Lipidsysteme ist die Filmwaage, auch Langmuir-Trog genannt. Das zugrunde liegende Prinzip dieser Methode geht auf Langmuir [1917] zurück, der entdeckte, dass Fettsäuren an der Grenzfläche zwischen wässrigem Medium und Luft eine einmolekulare Schicht bilden. Dabei richten sich die hydrophoben Fettsäuren zur Luft aus (Vergleich Abschnitt 2.1). Dieses Phänomen kann unter anderem für die Bestimmung der pro Molekül benötigten Fläche genutzt werden [Jones, 1950; Meader und Criddle, 1953]. Mit Hilfe einer Filmwaage, bestehend aus Flüssigkeitstrog, automatisch beweglicher Barriere zur Kompression der Oberfläche und Kraftabnehmer, lassen sich so beispielsweise Kraft-Flächen-Kurven (Isothermen) generieren [Brady, 1949; Meader und Criddle, 1953], welche Informationen über das Phasenverhalten von Lipiden geben [Blume, 1979]. Auch eignen sich die Oberflächenfilme zum Übertrag auf ein Substrat - dieser Aspekt wurde in Abschnitt 4.5.4 erläutert. Schließlich ist das System geeignet, die Wechselwirkung von membranaktiven Substanzen mit dem zweidimensionalen Lipidfilm und insbesondere deren Interkalation zu analysieren. Der Informationsgewinn kann durch Kombination mit Fluoreszenz- oder Brewsterwinkelmikroskopie in einem Setup noch erhöht werden [Lipp et al., 1997].

Wasser verfügt aufgrund der fehlenden Bindungsenergie zu benachbarten Wassermolekülen an der Oberfläche über eine Oberflächenspannung Γ von etwa 73 mN/m [Pasandideh-Fard et al., 1996]. Die Oberflächenspannung kann als für eine Vergrößerung der Oberfläche benötigte Energie verstanden werden. Werden Lipidmoleküle auf eine Flüssigkeitsoberfläche aufgebracht, so bildet sich dort wegen des amphiphilen Charakters der Moleküle ein Lipidmonolayer. Die Abstoßung zwischen den Lipidmolekülen verbunden mit der

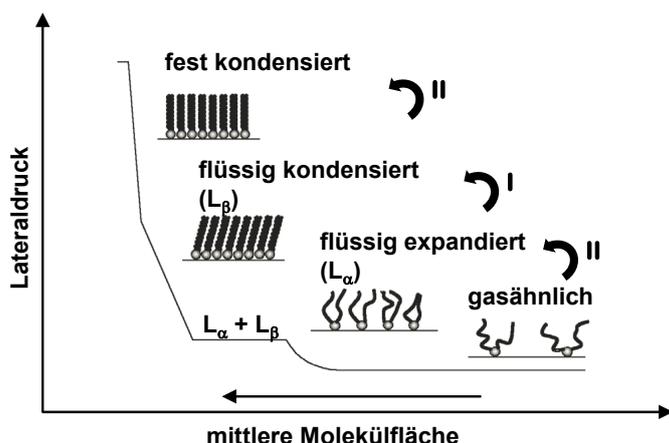


Abbildung 4.9

Allgemeiner Verlauf einer Druck-Flächen-Isotherme für die Kompression eines Lipidmonolayers. Vom gasähnlichen Zustand erfolgt bei steigendem Lateraldruck ein Phasenübergang zweiter Ordnung zum flüssig expandierten Zustand, der der L_α -Phase entspricht. Es folgt der Hauptübergang zum flüssig kondensierten Zustand (L_β -Phase) und schließlich ein weiterer Übergang zweiter Ordnung zum fest kondensierten Zustand. Der Hauptübergang ist durch eine Region der Koexistenz von flüssig expandiertem und kondensiertem Zustand gekennzeichnet. Modifiziert nach Eeman und Deleu [2010].

Hydratisierung der Kopfgruppen erzeugt einen Lateraldruck, der der Oberflächenspannung des Mediums entgegenwirkt und diese reduziert [Marsh, 1996b]. Der Lateraldruck Π_m des Monolayers

$$\Pi_m = \Gamma_f - \Gamma_{f+l} \quad (4.8)$$

ist also als Differenz der Oberflächenspannung der Flüssigkeit ohne Lipidmoleküle Γ_f und der Oberflächenspannung mit Lipidmolekülen an der Grenzfläche Γ_{f+l} gegeben und eine Funktion der Molekülfläche. Anders als bei Lipiddoppelschichten, deren Gesamtlateraldruck als Integral über das Lateraldruckprofil (siehe Abschnitt 2.4) gleich Null ist [Evans und Waugh, 1977], muss die Integrität einer Monoschicht durch einen externen Druck aufrechterhalten werden. Der bilayeräquivalente Lateraldruck von Monolayern wird zwischen 20 und 35 mN/m angegeben [Marčelja, 1974; Demel et al., 1975; Marsh, 2007] und liegt bei einer mit dem Bilayer vergleichbaren Molekülfläche vor [Marsh, 1996b].

Nach der Wilhelmy-Methode ist der Lateraldruck durch Eintauchen eines Wilhelmy-Plättchens orthogonal zur Grenzfläche zugänglich. Die am Plättchen gemessene Kraft

$$F_W = -2\Gamma \cdot \cos \theta \quad (4.9)$$

wird durch die Oberflächenspannung Γ und den Kontaktwinkel θ der Flüssigkeit am Plättchen bestimmt [Rame, 1997].

An einer Filmwaage kann der Lateraldruck eines Lipidfilms als Funktion der mittleren Molekülfläche a bestimmt werden. Da diese Messungen üblicherweise bei konstanter Temperatur durchgeführt werden, spricht man von einer Druck-Flächen-Isotherme. Dabei ist das Verhalten des Monolayers durch seine Flächenkompressibilität

$$\chi = -\frac{1}{a} \frac{da}{d\Pi} \quad (4.10)$$

bestimmt [Eeman und Deleu, 2010]. Die durch die Steigung der Druck-Flächen-Isotherme gegebene Kompressibilität [Marsh, 1996b] weist in ihrem Verlauf mehrere typische Unstetig-

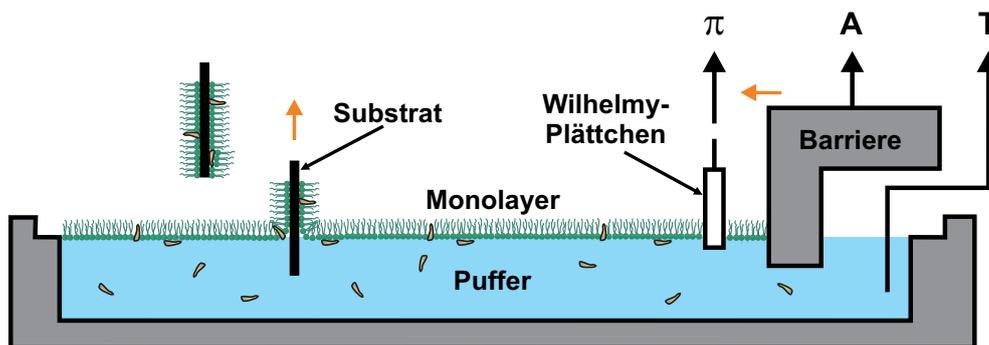


Abbildung 4.10

Schematischer Aufbau einer Filmwaage. Auf den mit Puffer gefüllten und auf die Temperatur T regulierten Trog können Lipide aufgetragen werden, die an der Grenzfläche einen Monolayer ausbilden. Der Lateraldruck Π wird mit einem Wilhelmy-Plättchen über eine Kraftmessung aufgenommen. Die Fläche A des Films und damit auch die mittlere Molekülfläche werden über eine bewegliche Barriere eingestellt. Die Wechselwirkung von membranaktiven Substanzen (gelb) mit dem Monolayer kann mit Hilfe verschiedener Versuchsdesigns untersucht werden. Dargestellt ist außerdem der in Kapitel 4.5.4 erläuterte LB-Übertrag des Monolayers auf ein Substrat.

keiten auf, welche einen Übergang zwischen unterschiedlichen Zuständen¹⁴ des Monolayers anzeigen. Dies ist an dem schematisch in Abbildung 4.9 dargestellten, typischen Verlauf einer Isotherme abzulesen. Der Hauptübergang findet, einen konstanten Lateraldruck vorausgesetzt, bei einer kritischen Temperatur zwischen flüssig expandiertem und flüssig kondensiertem Zustand statt [Albrecht et al., 1978], die ihre Entsprechung in den Lipidphasen L_α beziehungsweise L_β haben (siehe Abschnitt 2.7).

4.8.1 Messaufbau und Durchführung der Filmwaagenmessungen

Der prinzipielle Aufbau der verwendeten Filmwaage (KSV Nima KN1002) geht aus Abbildung 4.10 hervor. Wesentliche Komponenten sind ein Trog aus Polytetrafluorethylen mit einer quaderförmigen Vertiefung zum LB-Übertrag, ein zu diesem Zweck vorhandener Tauchmechanismus, zwei bewegliche Barrieren, über welche der Oberflächenfilm automatisch komprimiert oder expandiert werden kann und ein Druckabnehmer mit wechselbarem Wilhelmy-Plättchen. Der Trog hat eine Breite von 50 mm und eine Gesamtfläche von 7750 mm². Mit der Software KSV NIMA LB 2.1.1 (*Biolin Scientific AB*, Stockholm, Schweden) werden die Geräte über eine Schnittstelleneinheit (KSV NIMA LayerBuilder™) angesteuert.

Für die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen diente ein rechteckiges Filterpapier mit einem Umfang von 20,6 mm als Wilhelmy-Plättchen. Über eine Wasserbadtemperierung wurde das System auf konstanten 21 °C gehalten. Der mit Ethanol gründlich gereinigte Trog wurde mit 60 ml Puffer (Abschnitt 4.1) befüllt und die Sauberkeit des Systems überprüft. Zu diesem Zweck wurde die Oberfläche über die Barrieren komprimiert - befanden sich oberflächenaktive Substanzen im System, so änderte sich während der Kompression

¹⁴Zur Abgrenzung von den in Kapitel 2.7 diskutierten Lipidphasen von Doppelschichtmembranen wird in diesem Abschnitt in Anlehnung an Eeman und Deleu [2010] von Zuständen eines Monolayers gesprochen. Dies soll aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass die Phasen von Bilayern eng mit den Monolayerzuständen verknüpft sind.

der Wert der Oberflächenspannung und es musste gegebenenfalls erneut gereinigt werden. Anschließend konnte die Oberflächenspannung auf den Wert Null gesetzt werden, um im Folgenden den Lateraldruck aufzunehmen. Das vorsichtige Auftropfen von $7 \mu\text{l}$ chloroformisch gelösten Lipiden (Abschnitt 4.5.1) mit exakter Konzentration von 1 mg/ml auf die Pufferoberfläche geschah bei vollständig geöffneten Barrieren, da die Lipide sich zu Beginn der Messung im gasähnlichen Zustand befinden müssen. Ist dies gegeben, resultiert keine Änderung des Lateraldrucks. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels über mindestens fünf Minuten wurde der Monolayer mit konstanter Barrierengeschwindigkeit von 10 mm/min auf einen Lateraldruck von 10 oder 20 mN/m komprimiert. Anschließend wurde der Lateraldruck über eine Nachregulierung der Barrieren konstant gehalten. Nach einer Equilibrierungszeit von 20 Minuten wurde VapA mit einer finalen Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ unter den Monolayer in den Puffer injiziert und die Änderung der Filmfläche bei konstantem Lateraldruck für drei Stunden aufgezeichnet.

Die Messdaten lagen in den Dateiformaten '*.qrp' und '*.abs' vor und konnten als '*.txt' Datei exportiert werden. Die Verarbeitung und grafische Darstellung erfolgte mit der Software Origin[®] 9.0G. Aufgetragen wurde die mittlere Molekülfläche über die Zeit.

4.9 Rasterkraftmikroskopie

Mit dem AFM wurden im Rahmen dieser Arbeit Aufnahmen der Oberflächentopologie festkörperunterstützter Membranen generiert. Es wurden sowohl Lipiddoppelschichten in Flüssigkeit, deren Präparation in Abschnitt 4.5.3 beschrieben ist, als auch festkörperunterstützte Monolayer an Luft, welche in Abschnitt 4.5.4 eingeführt wurden, untersucht. Die beiden Systeme bieten unterschiedlichen Zugang zu der Wechselwirkung von VapA mit den jeweiligen Lipidsystemen: Während bei den Messungen in Flüssigkeit das Protein während der Messung injiziert werden kann und damit von einer Position der Probe die Zustände vor und nach der Zugabe aufgenommen werden können, ist es bei Messungen an Luft möglich, sich durch die Abbildung vieler Positionen einen Gesamteindruck der Probe zu verschaffen. Um die Membran mit und ohne Protein vergleichen zu können, müssen jedoch zwei unabhängige LB-Filme präpariert werden.

Rastertunnelmikroskopie (STM) und AFM sind zwei physikalische Methoden, welche auf dem Prinzip der Rastersondenmikroskopie beruhen. Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie wird die Bildinformation durch Wechselwirkung einer Sonde generiert, welche die Probe systematisch abrastert. Für die Entwicklung des Rastertunnelmikroskops (STM) [Binnig et al., 1982], das die Bildinformation über einen zwischen elektrisch leitender Sonde und Probe fließenden Tunnelstrom erzeugt, wurden Gerd Binnig und Heinrich Rohrer 1986 mit dem Physiknobelpreis geehrt. Im selben Jahr stellten Binnig et al. [1986] das AFM vor, welchem die zwischen einer mikroskopischen Sondenspitze und der Probenoberfläche wirkende Kraft als Regelgröße dient. Es ist damit nicht mehr von elektrisch leitenden Proben abhängig, zudem können Messungen an Luft oder in Flüssigkeit durchgeführt werden. Daher öffnet sich für diese Methode das weite Feld der Anwendbarkeit für biologische Proben. Beide Techniken erlauben eine Auflösung von unter $0,1 \text{ nm}$ [Binnig et al., 1986].

Häufig wird AFM in Kombination mit einem optischen Fluoreszenzmikroskop verwendet oder direkt in einem Setup vereint, wodurch der Informationsgehalt der Aufnahmen ergänzt werden kann [Andre et al., 2011; Colom et al., 2013]. Besonders vielversprechend

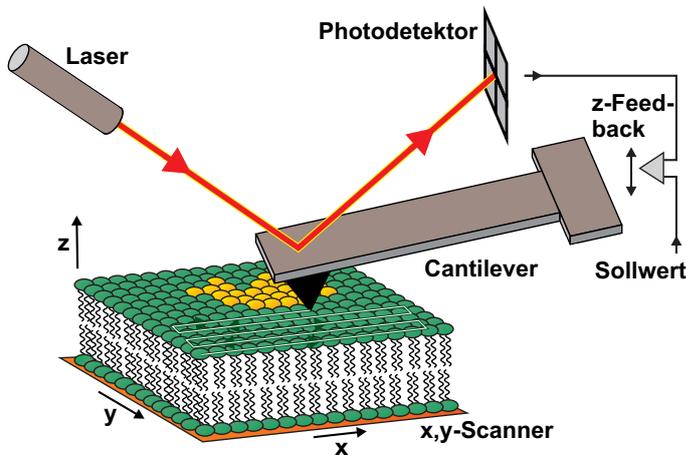


Abbildung 4.11

Prinzipielle Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops mit Laserablenkung. Die Oberfläche einer Probe wird systematisch mit einem *Cantilever* abgerastert (*x,y-Scanner*), an dessen Ende sich eine feine Spitze befindet. Kräfte zwischen Spitze und Probe führen zur Auslenkung des *Cantilevers*. Häufig kommt zur Detektion der Durchbiegung, die bei homogenen Proben der Probenhöhe entspricht, ein Laserstrahl zum Einsatz, welcher vom *Cantilever* auf einen Segment-Fotodetektor reflektiert wird. Das Signal wird zusammen mit einstellbaren Parametern (*Sollwert*) verarbeitet und sowohl als Messwert als auch in Form einer Feedbackschleife für die Regulierung der *z-Position* des *Cantilevers* verwendet.

ist zudem die Untersuchung an lebenden Zellen beziehungsweise Bakterien, welche durch eine Weiterentwicklung der Technik in den letzten Jahren ermöglicht wurde [Müller und Dufrêne, 2011; Andre et al., 2011; Taatjes et al., 2013; Colom et al., 2013]. Moderne Geräte ermöglichen dabei die Studie sowohl von Einzelproteinen [Colom et al., 2013] als auch von Lipidverteilungen [Andre et al., 2011], teilweise ebenfalls mit molekularer Auflösung [Hansma und Hoh, 1994]. Eine wichtige Weiterentwicklung ist die Hochgeschwindigkeits-AFM, die die Erforschung dynamischer Prozesse erlaubt [Ando, 2012; Colom et al., 2013].

Die Messsonde eines AFMs besteht in einer feinen Spitze aus Siliziumnitrid, Siliziumoxid oder Silizium mit typischerweise 10 bis 30 nm Krümmungsradius, welche am vorderen Ende eines Federbalkens, der auch *Cantilever* genannt wird, positioniert ist [Meyer, 1992; Taatjes et al., 2013]. Die Position der Spitze relativ zur Probenoberfläche wird über drei piezoelektrische Transducer reguliert. Die Regulierung in der Probenebene (*x,y-Ebene*) kann durch Manipulation entweder der *Cantilever-Position* oder der Probenposition realisiert werden, die Regelung in *z-Richtung* erfolgt üblicherweise am *Cantilever*. Während die Spitze einen systematischen Raster-Scan in der *x,y-Ebene* durchführt, verursachen die zwischen Spitze und Probe wirkenden Kräfte eine Auslenkung des Federbalkens [Binnig et al., 1986]. Diese kann auf verschiedene Weisen detektiert werden, wird aber in den meisten Fällen für die Regulierung der Spitze in *z-Richtung* mit einer Feedbackschleife in das System zurückgekoppelt [Meyer, 1992]. Neben der Feedbackschleife wird das Signal jeder *x,y-Position* der Probenoberfläche zur Generierung eines Datenpunktes einer zweidimensionalen „Kraft-Topologie“ genutzt, welche in einigen Fällen vereinfachend als Höhenbild verstanden werden kann. Ob die generierten Informationen tatsächlich der Probenhöhe entsprechen, hängt stark von der Interaktion zwischen Probe und Spitze ab [Roes et al., 2005]. Das grundlegende Prinzip einer AFM-Messung, angepasst an das Versuchsdesign der vorliegenden Arbeit, findet sich in Abbildung 4.11.

Zur Detektion der Federbalkenauslenkung kommen verschiedene Methoden infrage -

die Sensorik befindet sich dabei stets auf der Rückseite des *Cantilevers*. Das von Binnig et al. [1986] vorgestellte AFM nutzte als Sensorik ein STM. Dieses setzt aber spezielle Bedingungen wie den Betrieb im Vakuum und eine sehr reine und glatte Oberfläche des *Cantilevers* voraus [Meyer, 1992]. Eine weitere Technik ist die Verwendung eines Interferometers, welches die optische Interferenz eines auf der Oberseite des *Cantilevers* reflektierten Laserstrahls ermöglicht [McClelland et al., 1987]. Diese Art der Detektion ist gegenüber dem STM wesentlich einfacher zu realisieren und zudem nicht auf eine völlig glatte *Cantilever*-Oberfläche angewiesen [McClelland et al., 1987]. Die schräge Reflektion eines Laserstrahls auf eine Zwei- oder Viersegment-Photodiode erlaubt die Detektion der Federbalkenauslenkung über die Ablenkung des Laserstrahls [Meyer und Amer, 1988]. Diese Anordnung - dargestellt in Abbildung 4.11 - ist wegen der hohen Sensitivität und einfache Handhabung weit verbreitet und kommt auch in dem für die Messungen der vorliegenden Arbeit verwendeten AFM zum Einsatz. Die Auslenkung Δz des *Cantilevers* ist nach

$$\frac{I_o - I_u}{I_o + I_u} = \frac{6\Delta z}{l \cdot \delta} \quad (4.11)$$

durch das Verhältnis der Intensitäten I_o und I_u im oberen und unteren Segment der Photodiode, die Länge l des *Cantilevers* sowie die Strahldivergenz δ gegeben [Meyer, 1992]. Eine weitere, sehr kompakte Sensortechnik ist die Bestimmung der Kapazität zwischen zwei Leiterplatten, von denen eine auf der Rückseite des *Cantilevers* angebracht ist [Neubauer et al., 1990].

AFMs können in unterschiedlichen Messmodi betrieben werden. Im bisher beschriebenen statischen Modus, auch als Kontaktmodus oder DC-Modus bezeichnet, kann zum einen die Kraft durch Regulierung der *Cantilever*-Höhe konstant gehalten werden. Zum anderen kann die Auslenkung ohne Regulierung der z-Position aufgezeichnet werden, was bei sehr ebenen Proben höhere Scangeschwindigkeiten ermöglicht¹⁵ [Binnig et al., 1986; Meyer, 1992]. Die Messungen an LB-Filmen wurden im statischen Modus bei konstanter Kraft durchgeführt.

Für den dynamischen Modus (AC-Modus) wird der *Cantilever* durch einen piezoelektrischen Transducer in Schwingungen nahe seiner Resonanzfrequenz versetzt [Martin et al., 1987]. Die unmodifizierte Resonanzfrequenz $f_0 \propto \sqrt{c/m}$ des Federbalkens wird durch dessen Federkonstante c und Masse m bestimmt. Durch einen in Probennähe wirkenden Kraftgradienten wird die Resonanzfrequenz nach

$$f_{0,m} \propto \sqrt{\frac{c - \frac{\partial F}{\partial z}}{m}} \quad (4.12)$$

modifiziert [Martin et al., 1987]. Durch attraktive Kräfte wird die Resonanzfrequenz verringert, durch repulsive erhöht, was in beiden Fällen zu einer Reduzierung der Schwingungsamplitude führt, wenn der *Cantilever* bei f_0 angeregt wird¹⁶ [Martin et al., 1987; García und Pérez, 2002]. Prinzipiell stehen im dynamischen Modus Amplitude, Frequenz und Phasenverschiebung als Feedbackgrößen zur Verfügung [García und Pérez, 2002]. Dabei kann, wie im statischen Modus, entweder bei aktiver Feedbackschleife der Kraftgradient

¹⁵Im statischen Modus werden Kräfte zwischen 10^{-6} und 10^{-10} N registriert [Meyer, 1992].

¹⁶Im dynamischen Modus werden bei einem Probenabstand von 10 nm Kräfte zwischen 10^{-7} und 10^{-13} N registriert [Meyer, 1992].

konstant gehalten werden oder ohne Feedbackschleife die Variation der Feedbackgröße direkt als Messgröße aufgezeichnet werden [Martin et al., 1987; Meyer, 1992]. Dieser Messmodus ist vor allem für biologische Proben geeignet, da die Messung berührungsfrei abläuft und damit zu einer geringeren Manipulation der Probe führt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Messungen an Lipiddoppelschichten in flüssigem Medium im dynamischen Modus mit Amplitudenfeedback bei konstantem Kraftgradienten durchgeführt.

Die Wahl eines geeigneten *Cantilevers* hängt sowohl von der Art der Probe als auch vom verwendeten Messmodus ab. Die Resonanzfrequenz sollte in allen Fällen möglichst hoch sein, um den Störeinfluss von akustischen- und Gebäudeschwingungen zu reduzieren - typische Werte liegen zwischen 10 und 100 kHz [Meyer, 1992]. Für Messungen im dynamischen Modus sollte die Federkonstante zwischen 1 und 10 N/m liegen um die thermischen Schwingungen niedrig zu halten, im statischen Modus genügen Werte zwischen 0,001 und 1 N/m [Meyer, 1992].

Die zwischen Spitze und Probenoberfläche auftretenden Kräfte, auf denen AFM-Messungen beruhen, setzen sich bei den meisten biologischen Proben aus attraktiven Van-der-Waals-Kräften, Adhäsionskräften, elektrostatischen Kräften und durch die Pauli-Abstoßung verursachten kurzreichweitigen Kräften zusammen [Hansma und Hoh, 1994; García und Pérez, 2002; Meyer, 1992]. Im statischen Modus an Luft spielen zudem zwischen Spitze und auf der Probe kondensierter Flüssigkeit auftretende Kapillarkräfte eine Rolle [Hansma und Hoh, 1994; Meyer, 1992].

4.9.1 Messaufbau und Durchführung der rasterkraftmikroskopischen Messungen an Monolayern

Das für die Messungen dieser Arbeit verwendete AFM (*Asylum Research*, Santa Barbara, CA, USA, MFP-3D) setzt sich aus fünf Komponenten zusammen, deren Zusammenspiel in Abbildung 4.12 dargestellt ist. Die Probe befindet sich auf dem x,y-Scanner, der mit Hilfe von gestapelten Piezoelementen die Bewegungen ausführt. Das Kopfteil, an dessen Unterseite der *Cantilever* eingesetzt wird, enthält die Anordnung aus Laser und Photodetektor zur Detektion der Feedbackgröße sowie die piezoelektrisch gesteuerte Regulierung der z-Position des *Cantilevers*. Außerdem findet hier die Schwingungsanregung des *Cantilevers* für den dynamischen Modus statt. Die Reglereinheit realisiert über einen Proportional-Integral-Differential- (PID) Regler die Rückkopplung der Feedbackgröße und gibt entsprechende Signale an das Kopfteil weiter. Die Datenerfassung erfolgt mit der in Igor Pro 6.34A implementierten Steuerungssoftware MFP3D 120804 + 1821 (*Asylum Research*, Santa Barbara, CA, USA).

Für die Messungen an Luft wurden aus Silizium bestehende CSG11-*Cantilever* (*NT-MDT Co.*, Moskau, Russland) mit Goldbeschichtung ausgewählt. Die Messungen in Flüssigkeit wurden mit Siliziumnitrid *Cantilevern* mit Goldbeschichtung des Modells OMCL-RC800 PSA (*Olympus K.K.*, Shinjuku, Tokio, Japan) durchgeführt. Es handelt sich jeweils um Chips mit zwei beziehungsweise vier unterschiedlichen *Cantilevern*, deren Spezifikationen in Tabelle 4.4 zusammengestellt sind.

Vor den Messungen wurde der jeweilige *Cantilever*-Chip in den dafür vorgesehenen Halter eingesetzt, mit Ethanol gereinigt und am Kopfteil des AFM arretiert. Der *Cantilever* wurde so justiert, dass der an seiner Oberseite reflektierte Laserstrahl genau die Mitte der Viersegment-Photodiode traf. Die Objektträger mit den vorbereiteten Proben (Abschnitt 4.5.4) wurden auf dem x,y-Scanner mit Hilfe von Magneten fixiert, das Kopfteil

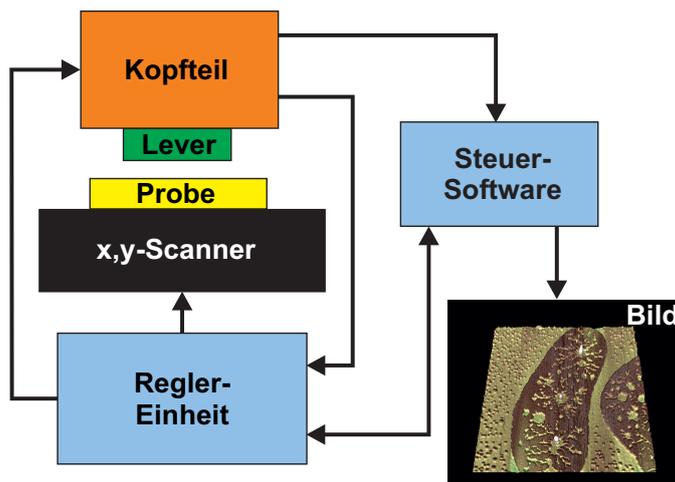


Abbildung 4.12

Komponenten des verwendeten AFM MFP-3D. Die Probe wird über einen x,y-Scanner in der lateralen Ebene relativ zum *Cantilever* bewegt. Dieser befindet sich an der Unterseite des Kopfteils, welches die Feedbackgröße detektiert und, vermittelt durch die PID-Rückkopplung der Reglereinheit, die z-Position des *Cantilevers* beziehungsweise dessen Schwingungsanregung reguliert. Die Steuer-Software erfasst die Daten und ermöglicht deren grafische Darstellung und Verarbeitung.

Bezeichnung	LxBxH [μm]	<i>Cantilever</i>		Spitze	
		Resonanz- frequenz [kHz]	Federkonstante [N/m]	Krümmungs- radius [nm]	Höhe [μm]
CSG11 A	250x35x1	20	0,1	10	10-15
CSG11 B	350x35x1	10	0,03	10	10-15
OMCL-RC800 PSA NS	100x20x0,8	69	0,39	20	3
OMCL-RC800 PSA NL	200x20x0,8	18	0,05	20	3
OMCL-RC800 PSA WS	100x40x0,8	71	0,76	20	3
OMCL-RC800 PSA WL	200x40x0,8	19	0,10	20	3

Tabelle 4.4

Eigenschaften der verschiedenen *Cantilever*. Angegeben sind ungefähre Werte aus den Quellen (<http://www.ntmdt-tips.com/products/view/csg11>) beziehungsweise (<http://www.asylumresearch.com/Probe/RC800PSA,Olympus>).

aufgesetzt und mit Hilfe der Software die Resonanzfrequenz des Federbalkens bestimmt. Anschließend wurde das Kopfteil auf die Probe gesenkt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Kopfteil möglichst parallel zum x,y-Scanner orientiert war. Die Messungen wurden im Kontaktmodus mit Auslenkungsfeedback bei Raumtemperatur durchgeführt.

Um den PID-Regelkreis mit der Software zu optimieren, sind die Parameter *Setpoint* und *Integral Gain* kritische Variablen. Der *Setpoint* bestimmt den Wert, den die Auslenkung des Federbalkens annehmen muss, damit die z-Position nachreguliert wird - je höher der Wert gewählt wird, desto größer wird die Kraft zwischen Spitze und Probe. Im dynamischen Modus bestimmt der *Setpoint* den kritischen Wert der Amplitude der Federbalkenschwingung. Daher ist hier die Kraft zwischen Spitze und Probe für niedrigere *Setpoint*-Werte höher. Über den *Integral Gain* wird der Integralteil des PID-Regelkreises festgelegt. Ist er zu niedrig, so ist die Rückkopplung langsam und das Höhenbild enthält, besonders an scharfen Kanten, einen nennenswerten Fehler. Ist der *Integral Gain* zu hoch,

ist die Rückkopplung zu empfindlich und es kommt zu Überschwingern beziehungsweise Oszillationen des Signals. Der *Setpoint* wurde für die Messungen an LB-Filmen möglichst niedrig gewählt, der *Integral Gain* möglichst hoch.

Für jeden LB-Film wurden an mindestens fünf unabhängigen Positionen $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ Übersichtsbilder mit 1024×1024 Bildpunkten und einer Scanrate von 0,5 Hz (0,5 Linien pro Minute) erstellt. Mit Hilfe der gewonnenen Informationen wurden repräsentative Bereiche ausgewählt und Detailaufnahmen von $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$, $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ und $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$ angefertigt. Häufig entstanden im Verlauf der Messung weitere Bilder niedrigerer Auflösungen.

4.9.2 Durchführung der rasterkraftmikroskopischen Messungen an Bilayern

Die Messungen an Bilayern in Flüssigkeit wurden im dynamischen Modus mit Amplitudenfeedback bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Petrischalen mit den vorbereiteten Proben (Abschnitt 4.5.3) wurden in einem passenden Metallrahmen mit Magneten auf dem x,y-Scanner fixiert und die Resonanzfrequenz des Federbalkens in Luft und in Flüssigkeit bestimmt. Im Anschluss wurde eine passende Anregungsfrequenz nahe der Resonanzfrequenz ausgewählt. Für *Setpoint* und *Integral Gain* wurden möglichst hohe Werte eingestellt.

Nach der Auswahl einer geeigneten, möglichst repräsentativen Probenposition wurden nacheinander mehrere $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ beziehungsweise $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ Bilder mit 512×512 Bildpunkten und Scanrate 0,5 Hz aufgenommen. Blieb das Bild über einen längeren Zeitraum stabil, so wurden vorsichtig $150\ \mu\text{l}$ VapA der entsprechenden Konzentration in den Puffer injiziert. Durch Aufnahme weiterer zeitlich aufeinander folgender Bilder wurde die fortschreitende Interaktion zwischen VapA und dem Bilayer dokumentiert. Die Position auf der Probe sowie die Scanparameter wurden über den gesamten Zeitraum der Messung beibehalten, gegebenenfalls mussten leichte Korrekturen an *Setpoint* und *Integral Gain* vorgenommen werden.

4.10 Elektrophysiologie an freistehenden Bilayern

Elektrophysiologische Messungen wurden in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um über den Stromfluss durch eine freistehende Membran Informationen über die Permeabilisierung von Membransystemen durch VapA zu erhalten. Mit dieser Methode wurden darüber hinaus vergleichende Messungen mit dem prozessierten VapA-Fragment VapA p12 sowie mit VapB durchgeführt. Neben der Permeabilisierung wurden außerdem ergänzende Daten zur Bindung von VapA an freistehenden Membranen durch Untersuchung der Modifizierung der Membrankapazität erzeugt. Das Messprinzip basiert auf der Strommessung zwischen zwei lediglich durch ein kleines Loch (Apertur) verbundenen und mit Salzlösung gefüllten Kompartimenten. Über der Apertur wird aus unpolar gelösten Lipiden eine freistehende Membran aufgebaut, welche, wie in Abschnitt 2.6 erläutert, sowohl über einen hohen elektrischen Widerstand als auch über eine hohe Kapazität verfügt und somit geeignet ist, die Salzlösungen der Kompartimente voneinander zu isolieren. Dass bei diesem Verfahren Einzelereignisse betrachtet werden können, stellt einen entscheidenden Vorteil dar, allerdings ist es durch den hohen zeitlichen Aufwand für statistische Untersuchungen nur bedingt geeignet.

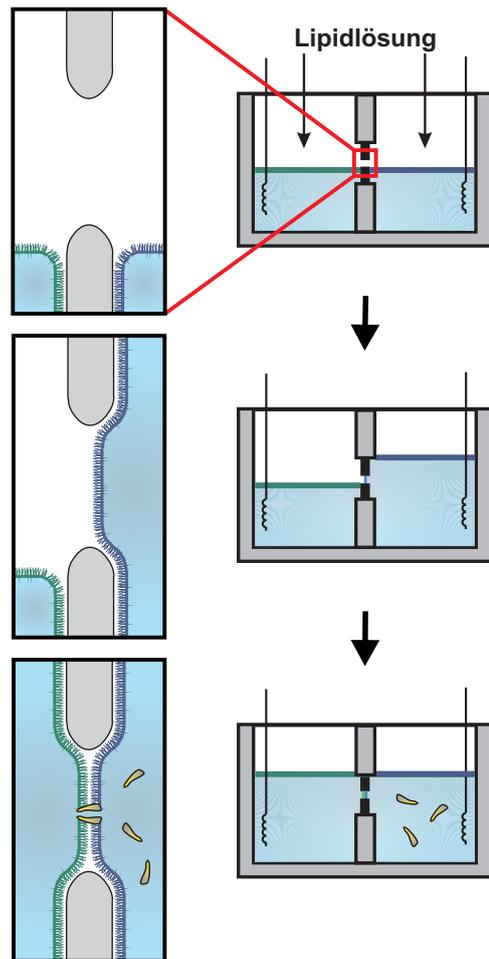


Abbildung 4.13

Schematische Darstellung der Rekonstitution freistehender, planarer Membranen nach der Montal-Mueller Methode. An der Grenzfläche zwischen zwei mit Elektrolytlösung gefüllten Kompartimenten befindet sich ein hydrophobes Septum mit einer Apertur. Letztere stellt die einzige Verbindung der beiden Salzlösungen dar. Auf den Flüssigkeitsoberflächen der Kompartimente werden zwei Monolayer gebildet. Durch Erhöhung der Flüssigkeitsspiegel über die Apertur bilden sich an der Apertur zwei freistehende Monolayer, welche sich zu einem Bilayer organisieren. Über zwei in die Salzlösungen getauchte Elektroden kann an die Membran eine elektrische Spannung angelegt werden. Werden membranaktive Substanzen hinzugefügt, so lässt sich deren Aktivität in Form eines Stromflusses über die Membran oder über die Änderung der Membrankapazität verfolgen.

Mueller et al. [1962] brachten zunächst die gelösten Lipide direkt auf die Apertur auf. Das Lösungsmittel entwich und hinterließ eine von beiden Seiten zugängliche freistehende Membran, welche aufgrund ihrer Reflektionseigenschaften schwarze Lipidmembran genannt wird. Diese Mueller-Rudin-Methode war die erste Rekonstitutionstechnik für die Untersuchung von künstlichen Doppellipidschichten *in vitro*. Eine Weiterentwicklung dieser Technik wurde von Montal und Mueller [1972] vorgestellt. Bei diesem Ansatz, der auch für die Messungen dieser Arbeit verwendet wurde, werden zwei Monolayer an der Flüssigkeitsoberfläche der beiden Kompartimente gebildet. Wird der Flüssigkeitsspiegel der Kompartimente über die Apertur gehoben, so bildet sich spontan eine freistehende Membran über der Apertur. Wesentliche Vorteile dieser Montal-Mueller Methode sind die Möglichkeit, asymmetrische Bilayer zu erzeugen und das weitestgehende Entweichen des Lösungsmittels vor der Bilayerpräparation. Die auf diese Weise hergestellten Membranen weisen allerdings eine schlechtere Stabilität als die schwarzen Lipidmembranen auf. Das Prinzip der Membranrekonstitution nach Montal und Mueller wird schematisch in Abbildung 4.13 verdeutlicht. Schindler [1980] stellte eine weitere Modifikation des Verfahrens vor, bei welchem die beiden Monolayer aus Vesikeln hergestellt werden.

Besonders geeignet sind die freistehenden planaren Membranen für Untersuchungen an integralen Membranproteinen wie Kanal- beziehungsweise Ionen-transportproteinen [Guts-

mann et al., 2015]. Neben Aussagen zur Porengröße können auch funktionelle Eigenschaften sowohl von integralen als auch von membranaktiven Proteinen ermittelt werden [Gutsmann et al., 2015]. Darüber hinaus ist es möglich, grundlegende Membraneigenschaften wie das Membranpotential [Hagge et al., 2004] oder die laterale Mobilität der Lipide [Weiß und Enderlein, 2012] unter gut kontrollierbaren Umgebungsbedingungen zu bestimmen. Selbstverständlich beschränken sich die Einsatzgebiete nicht auf elektrische Messungen. Die Kombination mit fortschrittlichen fluoreszenzmikroskopischen oder -spektroskopischen Methoden [Weiß et al., 2013] sind ebenso möglich wie die strukturelle Aufklärung von Membraneigenschaften mit Hilfe von Röntgenbeugungsexperimenten [Beerlink et al., 2008, 2009].

4.10.1 Versuchsaufbau und Durchführung der elektrophysiologischen Messungen

Vor Beginn der Messung wurde ein rundes Septum aus 25 μm dicker PTFE-Folie (*Goodfellow Cambridge Ltd.*, Huntingdon, England) hergestellt, welches durch beidseitig aufgeklebte Ringe aus Tesafilm[®] stabilisiert wurde. Durch einen dielektrischen Durchschlag zwischen den Elektroden einer Funkentrecke (*Electro-Technic Products Inc.*, Chicago, IL, USA, Hochfrequenzgenerator BD-10AV) wurde eine Apertur mit einem Durchmesser zwischen 120 und 160 μm im Zentrum der PTFE-Folie erzeugt. Gereinigt wurden die Septen mit Chloroform und unmittelbar vor der Messung mit Ethanol. Zur Erhöhung der Hydrophobizität wurde es kurzzeitig in eine Mischung aus n-Hexan (*Merck KGaA*, Darmstadt, Deutschland, Nr. 4368) und n-Hexadecan (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA, Nr. H – 0255) im Volumenverhältnis 10 : 1 getaucht und anschließend ausgeschlagen.

Der Hauptteil des verwendeten mechanischen Messaufbaus, welcher aus Abbildung 4.14 hervorgeht, besteht in einem auf einer Heizplatte positionierten Messzylinder. Dessen metallische Außenwand dient als Abschirmung gegen elektrische Störeinflüsse. Wird der obere Teil des Messzylinders abgenommen, können in die Basis die beiden aus Teflon gefertigten Kompartimente mit halbkreisförmiger Grundfläche eingesetzt werden. Zwischen die planen Wände der Kompartimente wurde dabei das Septum geklemmt. Zur Abdichtung des Septums mit den Wänden der Kompartimente wurde dünn aufgetragenes Silikonfett verwendet. Die Kompartimente wurden anschließend mit jeweils 1,9 ml Puffer befüllt und in jedes eine elektrisch abgeschirmte und mit Ethanol und Reinstwasser gereinigte Spritze zur Absenkung und Anhebung des Pufferspiegels eingeführt. Die Oberseite des Messzylinders verfügt über einen Vorverstärker, der mit zwei unterseitig angebrachten Elektrodenhalterungen verbunden ist. Die beiden Silber-Silberchlorid-Elektroden tauchen beim Aufsetzen der Messzylinderoberseite in die beiden Kompartimente ein. Für den gesamten Messverlauf wurde die Probenkammer auf konstante 37 °C aufgeheizt.

Der Vorverstärker ist mit einem Patch-Clamp-Verstärker (*List-Medical*, Darmstadt, Deutschland, L/M-PCA) verbunden. Dieser dient einerseits als interne Spannungsquelle, andererseits enthält er die Elektronik zur Signalerfassung und Steuerung. Hier wurden die Stromsignale für alle gezeigten Messungen mit einem Faktor von 5 mV/pA verstärkt. Das Ausgangssignal wird mit einem integrierten Bessel-Filter sechster Ordnung mit 10 kHz tiefpass gefiltert. Ein BNC-Anschlussblock (*National Instruments*, Austin, TX, USA, BNC-2110) verbindet den Verstärker mit der Eingangs-/Ausgangskarte (*National Instruments*, Austin, TX, USA, PCI-6036E) des Messcomputers, welche eine zusätzliche externe Spannungsquelle in das elektrische Design integriert. Interne und externe Spannungsquelle

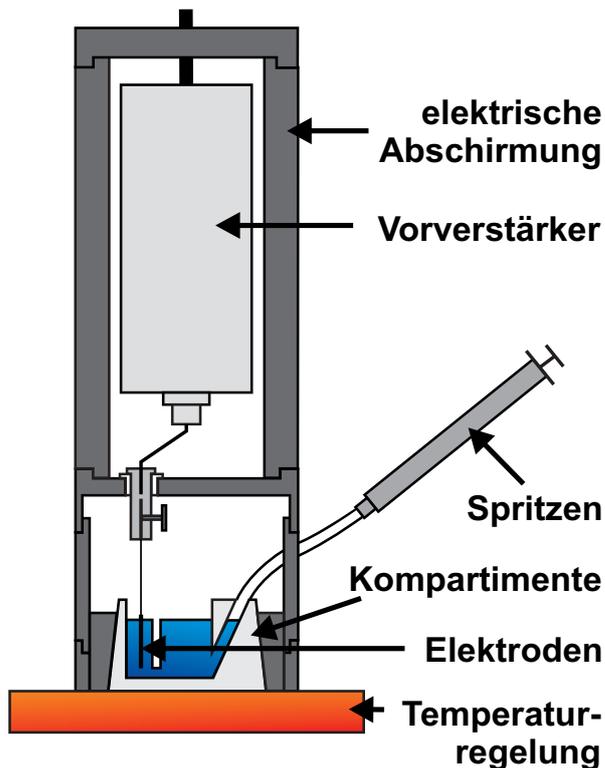


Abbildung 4.14

Versuchsaufbau für die Membranrekonstitution nach der Montal-Mueller Methode. Dargestellt ist die Schnittfläche parallel zur Kontaktfläche der beiden Kompartimente. Die mit Puffer befüllten Kompartimente befinden sich an der Unterseite eines mehrteiligen Messzylinders. Über zwei Spritzen lassen sich die Pufferspiegel der Kompartimente unabhängig regulieren. In jedes Kompartiment taucht eine Elektrode. Letztere sind mit dem im oberen Teil des Messzylinders befindlichen Vorverstärker verbunden. Dieser ist wiederum an einen Patch-Clamp-Verstärker angeschlossen. Die bis auf zwei kleine Sichtfenster und den Durchlass für die Spritzen komplett geschlossene Außenwand des Zylinders bildet eine elektrische Abschirmung. Die Temperaturregelung befindet sich in der Bodenplatte unter dem Messzylinder.

stellen jeweils einen Spannungsbereich von -100 mV bis $+100$ mV zur Verfügung, welche an den Elektroden angelegt werden können. Dabei wurde die Versuchsgeometrie so gewählt, dass eine positive angelegte Spannung der Richtung der an der Phagosomenmembran anliegenden Spannung entsprach. Die externe Spannung, die über die gruppenintern programmierte Software BBAS (LabVIEW 7.1, *National Instruments*, Austin, TX, USA) geregelt wird, wurde am Patch-Clamp-Verstärker um den Faktor 100 reduziert.

Nachdem die Elektrodenspannung am Patch-Clamp-Verstärker als Offset ausgeglichen worden war, wurden zunächst die Pufferspiegel unterhalb der Apertur eingestellt und jeweils 15 bis $25 \mu\text{l}$ chloroformisch gelöste Lipide (Abschnitt 4.5.1) der Konzentration 1 mg/ml auf die Flüssigkeitsoberflächen der beiden Kompartimente gegeben. Nach einer Wartezeit von mindestens 10 Minuten hatte sich das Chloroform verflüchtigt und die Lipide sich zu Monolayern an der Flüssigkeits-Luft-Grenzfläche organisiert. Durch aufeinander folgende Anhebungen der beiden Pufferspiegel über die Apertur wurde über der Apertur eine freistehende Lipiddoppelschicht erzeugt. Es wurden für die vorliegende Arbeit ausschließlich symmetrische Membranen präpariert. Das Prinzip der Bilayerpräparation wird in Abbildung 4.13 verdeutlicht.

Mit der Software BBAS wurde die Grundkapazität der Membran bestimmt, deren Zusammenhang mit den Abmessungen der Membran durch Formel 2.9 gegeben ist. Dafür wurde die in Abbildung 4.15 veranschaulichte und von Gutschmann et al. [1999] und Alvarez und Latorre [1978] beschriebene Spannungssprungmethode eingesetzt. Die Amplitude des Lade- beziehungsweise Entladestroms des durch die Membran gebildeten Plattenkondensators ist proportional zu dessen Kapazität. Eine aus 1000 einzelnen Spannungsstufen zusammengesetzte Dreiecksspannung der Amplitude $2,5$ mV wird über die Elektroden an

die Membran angelegt. Jede Spannungsstufe führt dabei zu einer aus Ladevorgang und anschließender Relaxation bestehenden Stromantwort. Aus dem Integral des mit 1 kHz tiefpassgefilterten Stromsignals ermittelt die Software die Membrankapazität mit einer Rate von 1 Hz.

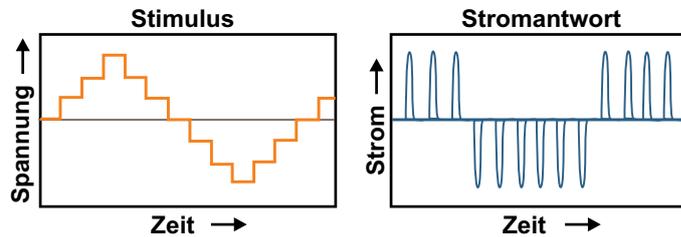


Abbildung 4.15

Prinzip der Bestimmung der Membrankapazität mit der Spannungssprungmethode. Die an die Membran angelegte treppenförmige Dreiecksspannung induziert als Stromantwort kleine, schnell relaxierende Ladeströme, deren Amplitude proportional zur Membrankapazität ist.

Die Stabilität der Membran wurde mit positiven und negativen angelegten Spannungen bis 50 mV auf die Probe gestellt. Im Anschluss wurde das Protein vorsichtig in eines der Kompartimente injiziert. Zu diesem Zeitpunkt wurde entweder eine fortlaufende Messung der Membrankapazität gewählt oder eine Strommessung mit einer Samplingrate von 40000 Hz. Aus dem Stromsignal wird außerdem ein erneut tiefpassgefilterter zweiter Datensatz mit einer Abtastrate von 300 Hz erzeugt. Dieser Datensatz wurde für die Weiterverarbeitung mit der Software Origin[®] 9.0G verwendet. Die Originaldaten lagen im Dateiformat '*.dat' vor.

Nach Benz et al. [1978] lässt sich aus der elektrischen Leitfähigkeit λ einer einzelnen Membranläsion ein Porendurchmesser d_P bestimmen. Als Kehrwert des elektrischen Widerstands kann die Leitfähigkeit als Quotient aus der Stromstärke und der angelegten Spannung ermittelt werden. Unter der Annahme zylindrischer, mit einem Puffersystem der spezifischen elektrischen Leitfähigkeit σ (siehe Abschnitt 4.1) gefüllter Poren [Wiese et al., 2003] und einer Membrandicke d_M von 6 nm liefert der Zusammenhang

$$d_P = 2 \cdot \sqrt{\frac{d_M \cdot \lambda}{\pi \cdot \sigma}} \quad (4.13)$$

eine grobe Abschätzung des Porendurchmessers¹⁷. Dieser Parameter wurde für die Bestimmung des Durchmessers einzelner Läsionen verwendet. Da die Annahmen zur Porengeometrie mit großer Wahrscheinlichkeit nicht der Realität entsprechen und insbesondere für kleine Poren, deren Durchmesser in der Größenordnung der Pufferionen liegt, die spezifische Leitfähigkeit des Porenvolumens nicht der des Puffersystems entspricht, ist der Wert des Porendurchmessers von einer großen Unsicherheit behaftet und eignet sich daher in erster Linie zur Veranschaulichung der Größenverhältnisse. Um einen von Annahmen zur Porengeometrie unabhängigen Vergleichswert zu erhalten, wurde für die Darstellung der Messverläufe zusätzlich die Leitfähigkeit λ_{ges} der gesamten erfolgten Permeabilisierung einer Membran mit der spezifischen Leitfähigkeit des Mediums gewichtet und nach Todt et al. [1992] als Größenparameter $G = \lambda_{ges}/\sigma$ eingeführt.

¹⁷Als Porendurchmesser wird die Querschnittsfläche einer Permeabilisierung an deren engster Position bezeichnet.

Kapitel 5

Ergebnisse

Bisher wurden in Kapitel 2 die grundlegenden Eigenschaften von Modellmembranen und in Kapitel 3 der biologische Hintergrund zu der eingangs, in Kapitel 1 ausformulierten Fragestellung nach der Interaktion zwischen VapA und der Phagosomenmembran abgehandelt. In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse der zu diesem Zweck durchgeführten Experimente vorgestellt werden. Dabei wird die in Kapitel 4 zur Beschreibung der einzelnen Techniken gewählte Reihenfolge beibehalten, die sich im Wesentlichen an den einzelnen Stufen des Wirkmechanismus orientiert, welcher in Kapitel 6 herausgearbeitet wird.

Abschnitt 5.1 beginnt mit den am Biosensor durchgeführten Messungen. Für die Untersuchung der Bindung von VapA an festkörperunterstützte Membranen wurde hier sowohl die Lipidzusammensetzung als auch der pH-Wert variiert. Die Ergebnisse der fluoreszenzspektroskopischen Experimente zur Proteininterkalation und Vesikelfusion finden sich in Abschnitt 5.2. Anschließend wird in Abschnitt 5.3 die Interkalation von VapA in Abhängigkeit des Lateraldrucks an Monolayern an der Filmwaage untersucht.

Als bildgebende Methode erlaubt die in Abschnitt 5.4 behandelte Rasterkraftmikroskopie an festkörperunterstützten Monolayern, Informationen zur Organisation von VapA an Modellmembranen und zur Veränderung der Domänenstruktur zu generieren. Neben der Abhängigkeit vom Lateraldruck wurden die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit untersucht und die Lipidzusammensetzung modifiziert. Zu zwei verschiedenen pH-Werten werden in Abschnitt 5.5 die Ergebnisse von rasterkraftmikroskopischen Messungen an Bilayern präsentiert.

Mit elektrophysiologischen Messungen an freistehenden Bilayern wurden Daten zum Einfluss von VapA auf die Membrankapazität sowie zur Membranpermeabilisierung erzeugt, welche in Abschnitt 5.6 vorgestellt werden. Neben der permeabilisierenden Wirkung von VapA bei verschiedenen pH-Werten wurden vergleichende Untersuchungen mit VapA p12 und VapB durchgeführt.

Das hauptsächliche Versuchssystem bildete die Lipidmischung DOPC:SM:Chol beim pH-Wert 6,5, welches mit allen Methoden untersucht wurde. Außer bei Filmwaage und AFM an LB-Filmen wurde zudem für allen Methoden der pH-Wert auf 4,5, für elektrophysiologische Messungen auch auf 5,5 reduziert. Ebenfalls mit allen Methoden wurde die Lipidmischung DOPC:SM:Chol:PS studiert, elektrophysiologische Messungen mit diesem Lipidsystem wurden außerdem bei den reduzierten pH-Werten 5,5 und 4,5 durchgeführt. Die Filmwaagen- und elektrophysiologischen Messungen mit der PS-haltigen Lipidmischung sind in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht enthalten. Wegen der schlechten Immobilisierung von ungeladenen Membranen auf dem Biosensorchip wurden zusätzlich Biosensormessungen mit den alternativen Lipidsystemen DOPC:PS und PS, jeweils bei den pH-Werten 6,5 und 4,5, umgesetzt.

5.1 Bindungsmessungen an festkörperunterstützten Membranen mit dem Biosensor

Der Biosensor wurde in dieser Arbeit verwendet, um einerseits die Bindung von VapA an Membranen verschiedener Lipidzusammensetzungen und andererseits die Beeinflussung der Viskosität der Membranen durch VapA zu untersuchen. Die Massenbelegung γ auf der sensitiven Fläche des Sensorchips hat, wie in Abschnitt 4.6 begründet wurde, einen Einfluss auf die Phasenverschiebung $\Delta\varphi$ der akustischen Welle. Dagegen beeinflusst eine Änderung der Viskosität η sowohl die Phasenverschiebung als auch die Änderung der Amplitude ΔA .

In das Flusssystem des Biosensors wurden zunächst SUV-Lösungen injiziert, die mit der Funktionalisierung des Sensorchips wechselwirkten. Durch die elektrostatische Wechselwirkung mit den positiven Ladungen des PLL spreiten Vesikel, die negativ geladene Lipide enthalten, bevorzugt auf der Oberfläche und führen zu einer Massenbelegung unter gleichzeitiger Fluidisierung des Gesamtsystems (siehe Abbildung 4.6). Ungeladene Vesikel binden in den meisten Fällen sehr schlecht an die Chipoberfläche, sodass eine Vergleichbarkeit der Daten nicht gegeben ist. Wie von Nehls [2011] diskutiert wurde, sind Messungen mit dem Biosensor nur unter der Bedingung vergleichbar, dass die Chipfläche größtenteils von einer Membran belegt ist. Dies ist bei allen in dieser Arbeit gezeigten Messungen gegeben, sofern nicht anders angegeben. Alle Messungen wurden bei 22 °C und einer Flussrate von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt.

In den Abbildungen dieses Abschnitts werden Phasen- und Amplitudenänderung der auf die Membranimmobilisierung folgenden VapA-Injektion dargestellt, außerdem als Kontrolle die direkte Injektion von VapA auf die Funktionalisierung. In entsprechendem Verhältnis mit PBS gemischter Messpuffer interagiert in keinem Fall mit der festkörperunterstützten Membran.

Da nicht garantiert werden kann, dass zwei durch die gleiche Prozedur funktionalisierte Sensorchips exakt die gleichen Oberflächeneigenschaften aufweisen, werden zudem nur Messungen, die mit dem selben Sensorchip durchgeführt wurden, vergleichend gegenübergestellt.

5.1.1 Bindung von VapA an neutrale und negativ geladene Membranen und Einfluss auf deren Viskosität

Die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten Lipidsysteme sind DOPC:SM:Chol (ungeladen) und DOPC:SM:Chol:PS (mit negativer Nettoladung) (siehe Abschnitt 4.2). Da die Bindung von ungeladenen Lipiden, wie oben begründet, auf der gegebenen Funktionalisierung problematisch ist, konnte nur ein vergleichbarer Datensatz mit diesen Lipidmischungen generiert werden. Dieser ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

Zunächst soll hier vereinfachend die Phasenverschiebung als Folge einer Massenbelegung betrachtet werden. Der Einfluss der Viskosität auf die Phasenverschiebung wird im Anschluss diskutiert. Ein Anstieg des Phasensignals entspricht einer Zunahme der Massenbelegung auf der Chipoberfläche. Während VapA im Fall der ungeladenen Membran ohne PS nur zu einer geringen zusätzlichen Massenbelegung führte, konnte eine verstärkte Bindung an die geladene Lipidmischung mit PS verzeichnet werden. Die durch VapA verursachte Massenbelegung auf der Funktionalisierung ohne Bilayer übertraf die Bindungen an den beiden Membransystemen. Es ist dabei zu beachten, dass bei den dargestellten Kurven

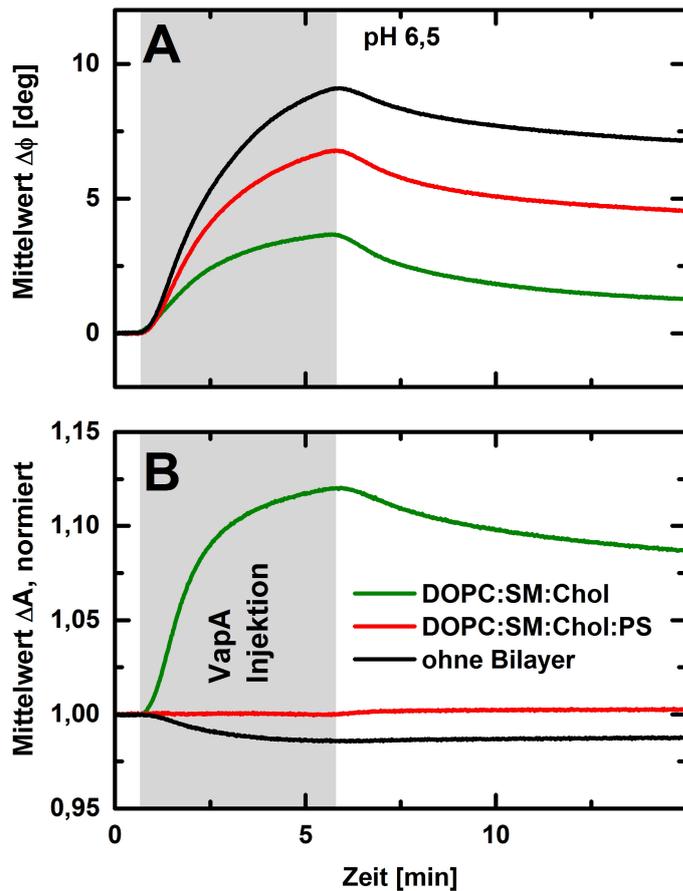


Abbildung 5.1

Abhängigkeit des Effekts von VapA auf immobilisierte Membranen vom Ladungszustand der Lipide: Phasen- (A) und Amplitudensignal (B) des Effekts einer 100 μl VapA-Injektion (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) auf zuvor immobilisierte Membranen der Lipidzusammensetzung DOPC:SM:Chol (grün) beziehungsweise DOPC:SM:Chol:PS (rot) und auf die unbelegte Funktionalisierung (PLL, schwarz). Injektionen von 100 μl SUVs (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) führten zu einem Anstieg des Phasensignals von 56° (ohne PS) beziehungsweise 47° (mit PS) und sind nicht dargestellt. Die Messungen wurden in 150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 6,5 bei 22 °C durchgeführt. Die Dauer der VapA-Injektion (grau hinterlegt) betrug 5 Minuten, weiß hinterlegte Flächen entsprechen Dissoziationsperioden.

eine annähernd vollständige Bedeckung der Chipoberfläche mit gespreiteten Liposomen gegeben war. Somit konnte nach Vesikelspreitung allenfalls ein Bruchteil der Chipfläche für eine Bindung an die PLL-Funktionalisierung zur Verfügung stehen. Während die beobachtete schwächere Massenbelegung im Fall der ungeladenen Membran also nicht mit Sicherheit auf eine Bindung an die Membran zurückgeführt werden kann, muss - unter der Annahme einer vergleichbaren Oberflächenbelegung durch die beiden Membranen - im Fall der geladenen Membran ein wesentlicher Anteil der Massenbelegung einer direkten Bindung an die Membran entsprechen. Die absolute Dissoziation des Phasensignals nach VapA-Injektion war in allen drei betrachteten Fällen vergleichbar. Dies deutet auf einen nicht spezifizierbaren Effekt des in Lösung befindlichen Proteins auf das Gesamtsystem hin, unabhängig von der Anwesenheit einer Membran. Daher sollte nur die nach der Dissoziation verbliebene Substanzmenge als tatsächlich gebunden betrachtet werden.

Die Amplitudenänderung ist unabhängig von der auftretenden Massenbelegung, wird also nur durch die Viskosität des auf der Sensorchipoberfläche befindlichen Systems bestimmt. Eine Verringerung des Amplitudensignals wird hier als Abnahme der Viskosität interpretiert, also als Fluidisierung¹. Steigt dagegen das Phasensignal an, so wird dies als Zunahme der Rigidität verstanden. Eine reine Zunahme der Massenbelegung ohne zusätzlichen Effekt geht üblicherweise mit einer Fluidisierung einher, da zusätzliche fluide

¹Die Fluidität ist der Kehrwert der Viskosität.

Masse an der Modifizierung der Welleneigenschaften beteiligt ist². Obgleich Unterschiede des Verhältnisses Fluidisierung zu Massenbelegung durchaus eine aktive Wirkung auf die Membran anzeigen können, ist eine solche mit Sicherheit gegeben, wenn es zu einer Rigidisierung kommt. Dies war im Fall des Effekts von VapA auf die ungeladene Membran mit einer ungewöhnlich hohen Rigidisierung bei schwacher Massenbelegung gegeben. Mit der negativ geladenen Membran trat keine derartige Wechselwirkung auf, die Bindung an PLL wurde von einer sehr schwachen Fluidisierung begleitet.

Ein Anstieg der Viskosität, der sich als Anstieg der Amplitude manifestiert, bewirkt eine entsprechende Verringerung des Phasensignals und umgekehrt (siehe Abschnitt 4.6). Dies ist durch das entgegengesetzte Vorzeichen der Formeln 4.5 und 4.6 begründet. Es wurde in Abschnitt 4.6 diskutiert, dass der genaue Anteil der Viskosität am Phasensignal aufgrund eines fehlenden Formalismus für das komplexe Messsystem nicht ermittelbar ist. Der Einfluss der Viskosität kann daher lediglich in qualitative Aussagen einbezogen werden. Folglich muss davon ausgegangen werden, dass der Unterschied der Massenbelegungen auf geladener und ungeladener Membran durch den Einfluss der Rigidisierung auf das Phasensignal relativiert wird, in welchem Maß dies der Fall ist bleibt indes Spekulation.

5.1.2 Bindung von VapA an Membranen und Einfluss auf deren Viskosität bei verschiedenen pH-Werten

Um den Einfluss eines erniedrigten pH-Werts auf die Wirkung von VapA zu untersuchen, wurden aufgrund der schlechten Bindung von ungeladenen Vesikeln an die Funktionalisierung abweichende Lipidzusammensetzungen gewählt. Es wurde zwischen Vesikeln aus purem PS und aus einer DOPC:PS-Mischung im molaren Verhältnis 9:1 verglichen - die Mischungen unterscheiden sich lediglich durch den Anteil negativ geladener PS-Moleküle. Die Konzentrationen von SUV-Lösungen und VapA wurden für diese Untersuchungen auf jeweils 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ angepasst. Abbildung 5.2 zeigt die Interaktion von VapA mit festkörperunterstützten Membranen dieser Zusammensetzungen für den pH-Wert 6,5, Abbildung 5.3 für den pH-Wert 4,5.

Bei pH 6,5, der auch bei den in Abbildung 5.1 dargestellten Messungen vorlag, kam es zu einer durch die höhere Proteinkonzentration bedingten, leicht verstärkten Massenbelegung auf DOPC:PS- und PS-Membranen durch die VapA-Injektion. Diese fiel wiederum geringer aus als die Massenbelegung auf der Funktionalisierung, deren Zunahme durch die erhöhte Konzentration sogar etwas stärker war. Der Verlauf des Phasensignals ist mit den Kurven für PLL und für die PS-haltige Membran in Abbildung 5.1 vergleichbar.

Bei der Viskosität fällt der Effekt auf die DOPC:PS-Mischung, ähnlich wie dies bei der DOPC:SM:Chol:PS-Mischung der Fall war, sehr gering aus. Es ist anzunehmen, dass die Fluidisierung durch eine Zunahme fluidierender Masse in Form gebundener VapA-Moleküle auf dem Chip durch einen rigidisierenden Effekt auf die Membran teilweise kompensiert wird. Der Zugewinn an Fluidität bei der ausschließlich aus geladenen Lipiden bestehenden PS-Membran durch VapA ist vergleichbar mit der durch Bindung von VapA auf die Funktionalisierung auftretenden Fluidisierung. Ein höherer Gehalt von negativ geladenen Lipiden scheint die VapA-vermittelte Rigidisierung des Systems zu verringern.

Bei pH 4,5 (Abbildung 5.3) zeigte sich wiederum eine modifizierte Signalantwort. Dabei ist anzumerken, dass die Immobilisierung der PS-Vesikel in diesem Fall um etwa die Hälfte

²Es sei zum Vergleich auf den in Abbildung 4.6 dargestellten Zusammenhang der Messvariablen bei Immobilisierung der Membran verwiesen.

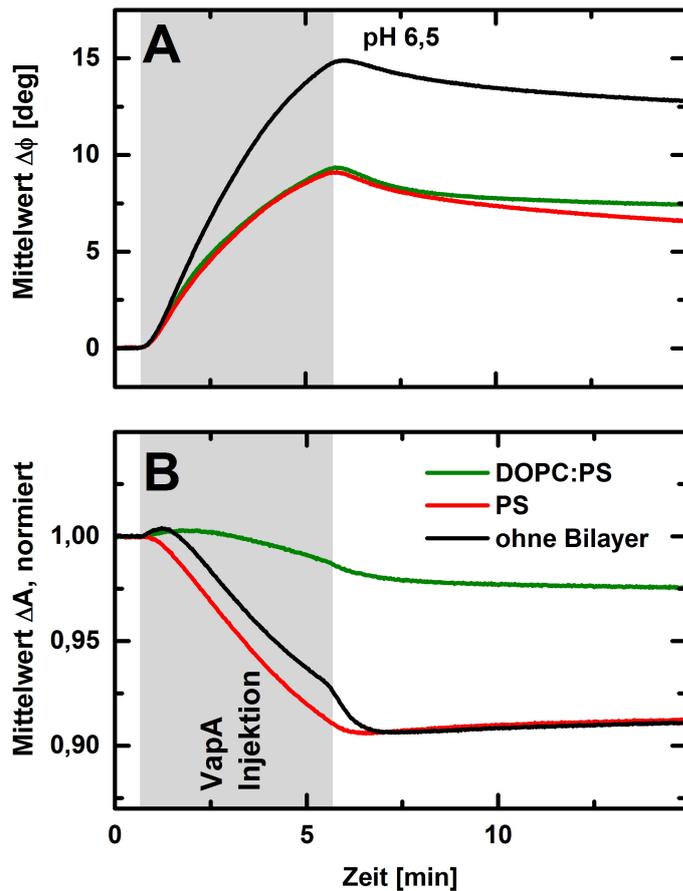


Abbildung 5.2

Abhängigkeit des Effekts von VapA auf immobilisierte Membranen vom pH-Wert (pH 6,5): Phasen- (A) und Amplitudensignal (B) des Effekts einer 100 μl VapA-Injektion (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) auf zuvor immobilisierte Membranen der Lipidzusammensetzung DOPC:PS (grün) beziehungsweise PS (rot) und auf die unbelegte Funktionalisierung (PLL, schwarz). Injektionen von 100 μl SUVs (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) führten zu einem Anstieg des Phasensignals von 45° (DOPC:PS) beziehungsweise 49° (PS) und sind nicht dargestellt. Die Messungen wurden in 150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 6,5 bei 22 °C durchgeführt. Die Dauer der VapA-Injektion (grau hinterlegt) betrug 5 Minuten, weiß hinterlegte Flächen entsprechen Dissoziationsperioden.

reduziert war, gemessen an Phasen- und Amplitudensignal. Es kann also nicht von einer vollständig mit einer Membran bedeckten Chipoberfläche ausgegangen werden.

Die Massenbelegung fiel in allen drei Systemen geringer aus als bei pH 6,5. Im Fall von DOPC:PS war die Zunahme des Phasensignals so gering, dass nach der Dissoziation keine permanente Massenbelegung verzeichnet werden konnte. Auch das Phasensignal der Kontrolle war gegenüber pH 6,5 deutlich reduziert und es kam zu keiner Dissoziation. Bei der ausschließlich aus PS bestehenden Membran übertraf der Anstieg des Phasensignals während der VapA-Injektion die Kontrolle deutlich, es kam allerdings zu einer starken Dissoziation, sodass die finale Phasenverschiebung unterhalb der Kontrolle lag.

Für den sauren pH-Wert von 4,5 führte die Bindung von VapA an die Funktionalisierung - im Gegensatz zu den bei pH 6,5 angestellten Beobachtungen - zu einer leichten Rigidisierung des Systems mit anschließender, scheinbar vollständiger Dissoziation. Dagegen kam es bei beiden Membransystemen zu einer Fluidisierung, ebenfalls mit kompletter Dissoziation.

Trotz der unvollständigen Bedeckung durch die PS-Vesikel ist hier also ein klarer Unterschied zwischen der Kontrolle und der PS-Membran auszumachen. Insgesamt ist die Wirkung von VapA auf die festkörperunterstützten Membranen bei pH 4,5 deutlich reduziert.

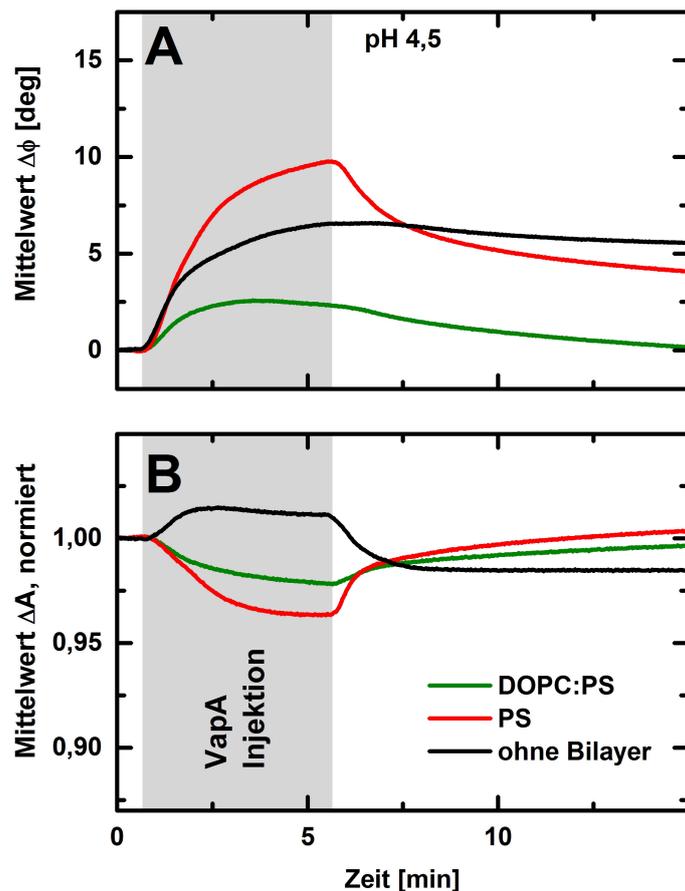


Abbildung 5.3

Abhängigkeit des Effekts von VapA auf immobilisierte Membranen vom pH-Wert (pH 4,5): Phasen- (A) und Amplitudensignal (B) des Effekts einer 100 μl VapA-Injektion (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) auf zuvor immobilisierte Membranen der Lipidzusammensetzung DOPC:PS (grün) beziehungsweise PS (rot) und auf die unbelegte Funktionalisierung (PLL, schwarz). Injektionen von 100 μl SUVs (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) führten zu einem Anstieg des Phasensignals von 45° (DOPC:PS) beziehungsweise 20° (PS) und sind nicht dargestellt. Die Messungen wurden in 150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 4,5 bei 22 °C durchgeführt. Die Dauer der VapA-Injektion (grau hinterlegt) betrug 5 Minuten, weiß hinterlegte Flächen entsprechen Dissoziationsperioden.

5.2 Fluoreszenzspektroskopische FRET-Messungen

Mit FRET-Experimenten wurde der Einfluss von VapA auf mit den Fluoreszenzfarbstoffen Rhodamin und NDP markierte SUVs untersucht. Die Sammlung der Fluoreszenzintensitäten einer großen Vesikelpopulation erlaubt qualitative Aussagen über Änderungen des mittleren Abstands zwischen den zwei Farbstoffspezies über den Verlauf der Messung.

Um den Einbau von VapA zwischen die Lipidmoleküle der SUVs detektieren zu können, wurde eine mit beiden Fluorophoren markierte SUV-Lösung hergestellt. Durch den Einbau von Proteinen kam es zu einer Vergrößerung des mittleren Abstands der Fluorophore und damit zu einem Anstieg des Quotienten aus Donor und Akzeptor, welcher als Messgröße diente.

Für die Analyse von Vesikelfusionen wurden von zwei SUV-Präparationen eine mit NBD und eine mit Rhodamin markiert - das weitere Protokoll entsprach dem der Interkalationsuntersuchungen. Wurden beide Präparationen gemischt, so blieben die Fluorophore auf unterschiedlichen SUVs separiert, sodass kein FRET stattfinden konnte. Kam es allerdings zu Fusionen unter den SUVs, so wurden die Lipide der beteiligten Vesikel und damit auch gegebenenfalls die unterschiedlichen Fluorophore durchmischt. Damit sank der mittlere Abstand der Fluorophore unter den kritischen Wert von ungefähr 10 nm und der Quotient aus Donor und Akzeptor nahm ab.

Einerseits werden in den präsentierten Ergebnissen die Membransysteme DOPC:SM:Chol

und DOPC:SM:Chol:PS vergleichend gegenübergestellt, andererseits wurden die Experimente sowohl bei pH 6,5 als auch bei pH 4,5 durchgeführt.

Um das Risiko einer Unterschätzung des Effekts durch langsame Reaktionskinetiken zu reduzieren, wurden die Signale jeweils für 2300 s aufgezeichnet. Da sich aber zeigte, dass für VapA zu späteren Zeitpunkten keine Veränderungen der Messsignale auftraten, werden im Folgenden lediglich die ersten 300 s der Messungen dargestellt. Alle Messungen wurden bei 37 °C unter ständiger Durchmischung der Probenlösung durchgeführt. Aufgrund der geringen Effekte von VapA in diesem System wurden zusätzlich Messungen mit LL-32 als Vergleichssubstanz durchgeführt. Als Kontrolle für die Messungen mit VapA diente eine PBS-Injektion, für LL-32 eine Injektion von 0,01% TFA.

5.2.1 Interkalation von VapA in kleine Vesikel

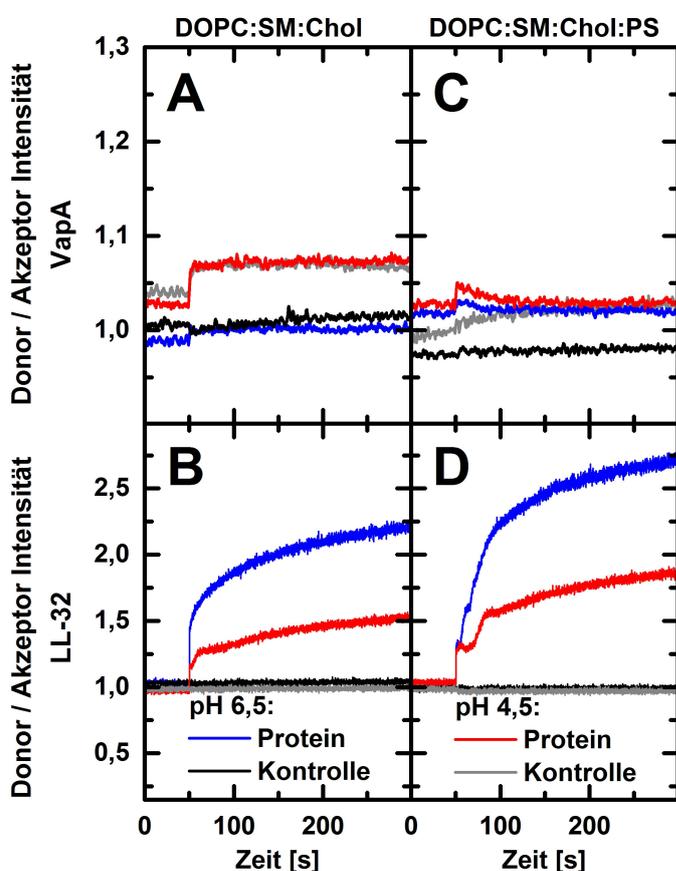


Abbildung 5.4

Vergleich der Interkalation von VapA und LL-32 in geladene und ungeladene Vesikel bei verschiedenen pH-Werten. Aufgetragen sind die Quotienten von Donor- und Akzeptorfluoreszenzintensität. Für 50 s wurde das Grundsignal von 1960 μl SUV-Lösungen (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) der Zusammensetzungen DOPC:SM:Chol (A, B) beziehungsweise DOPC:SM:Chol:PS (C, D), jeweils mit NBD-PE und rh-DHPE markiert, aufgenommen. Bei $t = 50$ s wurde die Messung für eine Injektion von 40 μl VapA (A, C) oder LL-32 (B, D) unterbrochen. Das Gewichtsverhältnis von Lipid zu Protein betrug 1:1. Als Kontrolle wurde der Probenpuffer von VapA und LL-32 injiziert. Die Messungen erfolgten bei den pH-Werten 6,5 (Protein: blau; Kontrolle: schwarz) und 4,5 (Protein: rot; Kontrolle: grau). Für VapA und LL-32 wurden in der Darstellung unterschiedliche Skalierungen gewählt. Daten für VapA wurden über ein Fenster von 20 Datenpunkten mit einem gleitenden Durchschnitt geglättet.

Abbildung 5.4 zeigt die Ergebnisse der Interkalationsexperimente mit VapA und LL-32. Da für VapA keine nennenswerten Signaländerungen zu verzeichnen sind, ist ersichtlich, dass VapA bei beiden untersuchten pH-Werten weder in die ungeladenen noch in die geladenen Vesikel interkaliert. LL-32 dagegen zeigt insgesamt eine starke Interkalation. Dieser Effekt ist in beiden Lipidsystemen beim pH-Wert 4,5 weniger stark ausgeprägt als bei pH 6,5. Durch die positive Nettoladung des Peptids erfolgt eine etwas stärkere

Interaktion mit den negativ geladenen Vesikeln. Bei dem steilen Anstieg der Signale direkt nach der Injektion handelt es sich um ein durch die Unterbrechung der Messwertaufnahme verursachtes Artefakt.

Es wurde mit zusätzlichen Messungen mit GUV-Lösungen überprüft, ob der schwache Effekt von VapA durch die unnatürlich starke Membrankrümmung der kleinen Vesikel begründet ist. Auch in diesem System war keine nennenswerte Signaländerung durch eine Interkalation nachzuweisen. Diese Daten werden hier nicht gezeigt.

5.2.2 Induktion von Vesikelfusionen durch VapA

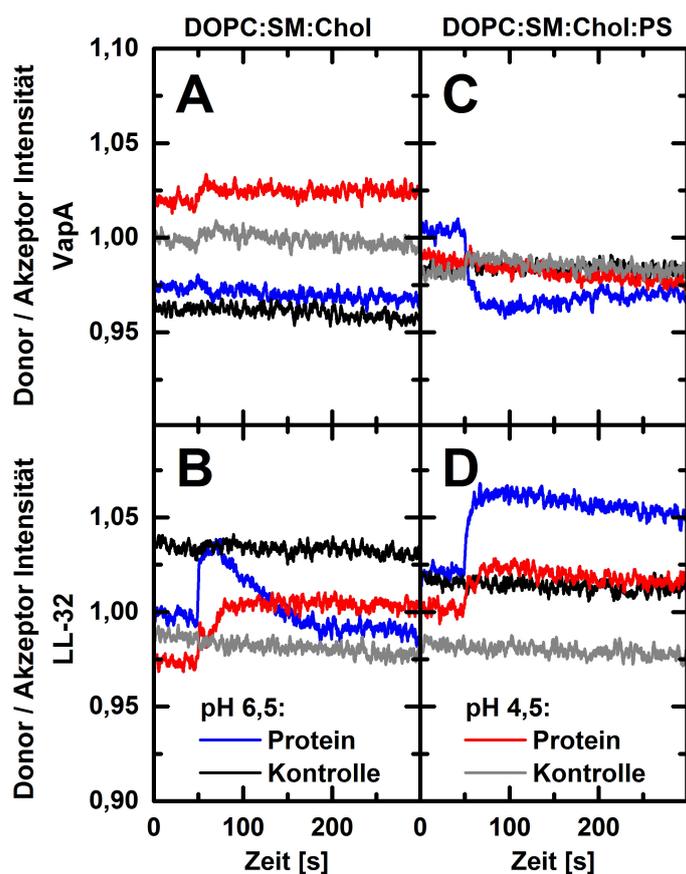


Abbildung 5.5
Vergleich der durch VapA und LL-32 vermittelten Fusion von geladenen und ungeladenen Vesikeln bei verschiedenen pH-Werten. Aufgetragen sind die Quotienten von Donor- und Akzeptorfluoreszenzintensität. Für 50 s wurde das Grundsignal von 1960 μl SUV-Lösungen (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) der Zusammensetzungen DOPC:SM:Chol (A, B) beziehungsweise DOPC:SM:Chol:PS (C, D) aufgenommen, jeweils eine Hälfte mit NBD-PE, die andere mit rh-DHPE markiert. Bei $t = 50$ s wurde die Messung für eine Injektion von 40 μl VapA (A, C) oder LL-32 (B, D) unterbrochen. Das Gewichtsverhältnis von Lipid zu Protein betrug 1:1. Als Kontrolle wurde der Probenpuffer von VapA und LL-32 injiziert. Die Messungen erfolgten bei den pH-Werten 6,5 (Protein: blau; Kontrolle: schwarz) und 4,5 (Protein: rot; Kontrolle: grau). Die Daten wurden über ein Fenster von 20 Datenpunkten mit einem gleitenden Durchschnitt geglättet.

Die Ergebnisse der vergleichenden Analyse der Fusion kleiner Vesikel durch die Wirkung von VapA und LL-32 sind in Abbildung 5.5 dargestellt. In keinem der untersuchten Systeme kam es zu ausgeprägten Signaländerungen. Die geringe Wirkung von VapA im Fall von geladenen Vesikeln bei pH 6,5 kann nicht mit Sicherheit auf Fusionen zwischen den Vesikeln zurückgeführt werden, da einige Effekte, wie das bei zu hohen Farbstoffkonzentrationen auftretende Selbst-*Quenching*, zu zusätzlichen Signaländerungen führen können. Hinzu kommt, dass die Einzelsignale von Donor und Akzeptor durch die VapA-Injektion jeweils leicht ansteigen, allerdings in unterschiedlichem Maß, was den Signalsprung des Quotienten verursacht.

Auch LL-32 führte in diesem Protokoll nicht zu signifikanten Fusionsereignissen. Die schwachen Signaländerungen, die sich von den Kontrollen abheben, werden im Fall der

ungeladenen Vesikel ausschließlich durch eine Verringerung des Akzeptorsignals verursacht, bei den geladenen Vesikeln durch einen Anstieg des Donorsignals bei gleichzeitigem, schwächerem Anstieg des Akzeptorsignals. Ursache für die kleinen Effekte können beispielsweise Änderungen von Membraneigenschaften, beispielsweise der Mobilität der markierten Lipide oder der Domänenstruktur sein.

5.3 Messungen an der Filmwaage

Der Einbau von VapA in Monolayer an der Flüssigkeits-Luft-Grenzfläche wurde an der Filmwaage untersucht. In diesem System ist der Lateraldruck als Messgröße zugänglich und kann beliebig variiert werden, sodass die Wechselwirkung in Abhängigkeit von mechanischen Membraneigenschaften analysiert werden konnte.

Durch automatische Regulierung der beweglichen Barrieren der Filmwaage wurde der Lateraldruck während der Einbaumessungen bei 10 mN/m beziehungsweise 20 mN/m konstant gehalten, sodass bei Bildung eines Mischfilms durch Einbau von VapA zwischen die Lipidmoleküle eine Erhöhung der mittleren Molekülfläche pro Lipid resultierte. Die Temperatur wurde über den gesamten Messverlauf - drei Stunden nach Injektion von VapA - auf 21 °C gehalten. Die verhältnismäßig niedrige Messtemperatur wurde gewählt, um Verdunstungseffekte gering zu halten und die Integrität der Membrandomänen während des LB-Übertrags gewährleisten zu können. Als Kontrolle wurde bei ansonsten identischem Protokoll eine Injektion von PBS vorgenommen. Als Lipidmischung wurde DOPC:SM:Chol verwendet, der pH-Wert betrug 6,5.

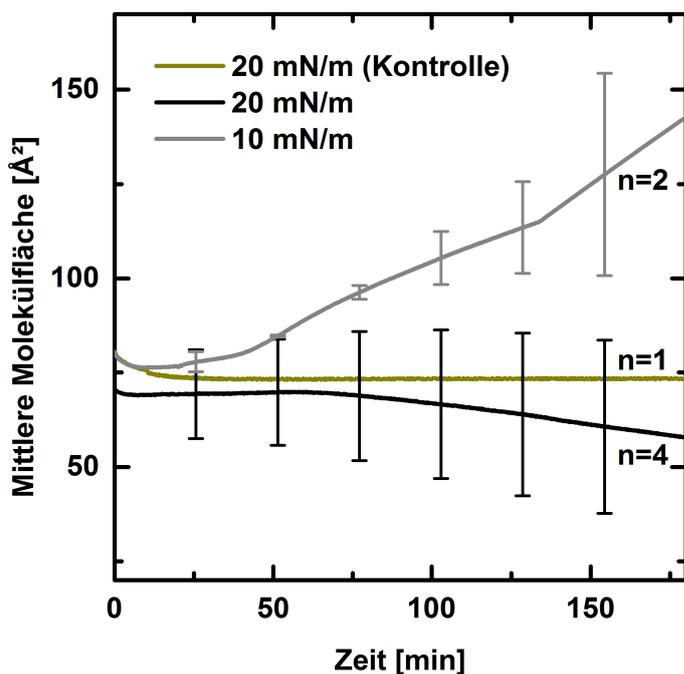


Abbildung 5.6

Einbau von VapA in DOPC:SM:Chol Monolayer in Abhängigkeit vom Lateraldruck. Aufgetragen ist die mittlere Fläche pro Lipidmolekül bei konstantem Lateraldruck von 20 mN/m (ockerfarben und schwarz) oder 10 mN/m (grau) gegen die Zeit. Injektion von VapA zu einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (schwarz, grau) oder PBS (ockerfarben) zum Zeitpunkt 0. Fehlerbalken geben zu 6 Zeitpunkten die Standardabweichungen der rechts angegebenen Anzahl unabhängiger Messkurven an. Die Messungen erfolgten in 150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 6,5 bei 21 °C.

5.3.1 Einbau von VapA in Lipidmonolayer in Abhängigkeit vom Lateraldruck

Die Ergebnisse der Messungen zum Einbau von VapA in Lipidmonolayer sind Abbildung 5.6 zu entnehmen. Die Kontrolle mit PBS zeigte über die gesamte Dauer der Messung keine signifikante Änderung der mittleren Molekülfläche. Es kann also ein Einfluss des Puffers, in dem VapA injiziert wurde, ausgeschlossen werden.

Bei einem Lateraldruck von 20 mN/m kam es entweder zu einer Reduzierung der mittleren Molekülfläche oder das Signal blieb konstant, was zu einer leichten Reduzierung des gemittelten Signals führt. Der Effekt trat zeitverzögert nach ungefähr 70 Minuten ein und verlief dann gleichmäßig bis zum Ende der Messung. Es kann somit nicht auf eine Interkalation von VapA geschlossen werden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von vier unabhängigen Messungen an. Da der Grundwert der mittleren Molekülfläche zwischen den Messungen variierte, kam es zu einem erhöhten Wert der Standardabweichung.

Zu einem anderen Resultat führten Messungen bei 10 mN/m. Es kam zu einem deutlichen Anstieg der mittleren Fläche pro Lipidmolekül, was auf eine Interkalation von VapA in Lipidsysteme bei verringertem Lateraldruck schließen lässt. Die Wirkung trat in diesem Fall sofort nach Injektion von VapA ein, die Steigung der Kurve nahm über den Verlauf der Messung zu. Nach knapp 50 Minuten kam es in beiden Messungen zu einer Verstärkung des Effekts.

Zusätzliche Messungen mit DOPC:SM:Chol:PS, welche hier nicht gezeigt werden, zeigten ein ähnliches Verhalten. Es kam bei 20 mN/m entweder zu einem sehr schwachen Anstieg der mittleren Molekülfläche oder das Signal blieb konstant. Bei 10 mN/m ließ sich ebenfalls ein deutlicher Anstieg der Molekülfläche verzeichnen.

5.4 Rasterkraftmikroskopische Messungen an Monolayern

Durch LB-Übertrag auf Micaplättchen präparierte Monolayer stellten in dieser Arbeit ein Rekonstitutionssystem zur Untersuchung des Einflusses von VapA auf unterschiedliche Membraneigenschaften dar. Einerseits können die erstellten Bilder Einblick in Bindung beziehungsweise Interkalation und Aggregation der Proteine an der Membran liefern. Da die Untersuchungen mit den domänenbildenden Lipidmischungen DOPC:SM:Chol und DOPC:SM:Chol:PS durchgeführt wurden, ermöglichten die Messungen zudem die Unterscheidung der Wechselwirkungen mit cholesterolreichen und -armen Domänen (siehe Abschnitt 2.7) sowie Zugang zur Beeinflussung der Domänenstruktur durch VapA. In Anlehnung an Yuan et al. [2002] werden die höheren Domänen als cholesterolreiche L_{σ} -Domänen, die niedrigeren Domänen als cholesterolare L_{α} -Domänen identifiziert.

Die Auflösung des verwendeten AFM betrug im Auslieferungszustand 2 nm in lateraler Richtung und 0,3 nm in z-Richtung. Da die präsentierten Bilder mit einer Auflösung von 1024 x 1024 Bildpunkten aufgenommen wurden, beträgt die theoretische laterale Auflösung etwa 10 nm für 10 μm x 10 μm Bilder, 5 nm für 5 μm x 5 μm Bilder und 2 nm für 2 μm x 2 μm Bilder. Die erreichbare Auflösung hängt allerdings vom Durchmesser der Spitze des *Cantilevers*, von den jeweiligen Messbedingungen und von der Oberflächenbeschaffenheit der Probe ab. Einflüsse wie elektrische Störsignale, Gebäudeschwingungen und akustische Störungen führen zu einer Verringerung der Auflösung. Ebenso können Moleküle, insbesondere Probenmoleküle an die *Cantilever*-Spitze binden und zu einer Modifizierung der Kräfte zwischen *Cantilever* und Probe führen. Dies verdeutlicht, dass in keinem Fall eine Beeinflussung der Probe durch den Messvorgang ausgeschlossen werden

kann.

Die Präparation der LB-Filme erfolgte bei jeweils konstantem Lateraldruck. Bedingt durch die große Fläche des Micaplättchens³ weisen die Proben eine gewisse Heterogenität betreffend der Größe und Verteilung der unterschiedlichen Domänen auf. Speziell bei LB-Filmen, welche aus einem Lipid-Proteinfilm hergestellt wurden, beträgt der Unterschied der Inkubationsdauern von VapA zwischen den beiden Probenenden wegen der langsamen Übertragungsgeschwindigkeit ungefähr 40 Minuten.

Durch den Vergleich mehrerer unabhängiger Positionen auf den Proben⁴ wurden die im Folgenden vorgestellten Ergebnisse im Rahmen der angesprochenen Einschränkungen auf eine robuste Basis gestellt. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur im Kontaktmodus an Luft durchgeführt.

Zur nachträglichen Reduzierung von eindeutigen Messartefakten beziehungsweise zur Herausarbeitung der in den Bildern enthaltenen Informationen wurden für die grafische Darstellung in dieser Arbeit mit Hilfe der Software MFP3D 120804 + 1821 folgende Bildbearbeitungen vorgenommen: Einzelne oder wenige benachbarte, defekte Linien der Bilder, welche meistens durch kurzzeitige Aufschaukelung von *Cantilever*-Schwingungen entstehen, wurden mit der Funktion *Erase* entfernt. Die Linie wird hierbei durch einen Mittelwert der angrenzenden Linien ersetzt. Globale Krümmungen der Bilder wurden gegebenenfalls mit einem *Planefit* erster oder zweiter Ordnung ausgeglichen. Dabei wird eine Polynomfläche n-ter Ordnung an das Bild angefitet und dann von diesem subtrahiert. Lokale, unregelmäßige Krümmungen des Bildes, die häufig an scharfen Kanten der Probe wie Domänengrenzen oder in der Umgebung hoher Objekte auftreten, wurden mit der Funktion *Flatten* nullter bis zweiter Ordnung ausgeglichen. Im Unterschied zum *Planefit* wird jede Linie einzeln gefittet und auf denselben Offset-Wert gebracht. Letzterer kann allerdings durch Masken auf bestimmte Regionen eingeschränkt werden. Insbesondere bei Bildern mit großen Domänen geschieht die Durchführung von *Planefit* oder *Flatten* meistens zulasten einer der Domänentypen - der Vorrang wurde hier stets den niedrigeren Domänen gegeben und eine moderate Streifenbildung auf den höheren Domänen in Kauf genommen. Deutliche Überlagerung eines Bildes durch Schwingungen (siehe als Beispiel Abbildung 5.10B) konnten in einigen Fällen durch Entfernung der entsprechenden Frequenzbereiche aus der schnellen Fouriertransformation der Bildinformationen korrigiert werden. Schließlich wurde über jedes Bild ein 3x3 Pixel Medianfilter gelegt, was häufig zur Verbesserung der optischen Zugänglichkeit beitrug. Für einige Bilder wurde die Rauheit als mittlere Abweichung R_a bestimmt.

Für die ungeladene Lipidmischung wurden bei unterschiedlich hohem Lateraldruck mit und ohne VapA-Injektion präparierte Lipidfilme verglichen. Die Inkubationszeit von VapA betrug normalerweise drei Stunden. Für die Untersuchung des Einflusses auf die Domänenstruktur wurden zudem unterschiedliche Inkubationszeiten gewählt und außerdem die Konzentration von VapA reduziert. Darüber hinaus wurde die geladene Lipidmischung vergleichend mit der ungeladenen gegenübergestellt. Sämtliche LB-Filme wurden bei einem pH-Wert von 6,5 bei 21 °C präpariert.

³Bei kompletter Bedeckung eines 1,5 cm x 2,5 cm großen Micaplättchens sind 150000 Übersichtsbilder der Größe 50 μm x 50 μm notwendig, um die gesamte Probe abzubilden.

⁴Siehe dazu Abschnitt 4.9.1.

5.4.1 Wechselwirkung von VapA mit Monolayern in Abhängigkeit vom Lateraldruck

Abbildung 5.7 zeigt beispielhaft die Höhenbilder von aus DOPC:SM:Chol (45% : 45% : 10%) bei 10 mN/m präparierten Monolayern (A-C) sowie einen entsprechenden Monolayer, welcher vor dem Übertrag drei Stunden mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ VapA inkubiert wurde (D-F). Es wurden Positionen gewählt, welche einen Eindruck sowohl der niedrigeren L_α -Domänen als auch der höheren L_o -Domänen vermitteln. Aus den 10 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ großen Bildern wurden jeweils zwei Positionen für 2 $\mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ große Detailbilder ausgewählt, die die Unterstrukturen der jeweiligen Domänen abbilden.

Wie aus Abbildung 5.7B ersichtlich ist, sind bei dem verwendeten Mischungsverhältnis der Lipide L_α -Domänen die vorherrschenden Domänen, in welchen sich inselförmig L_o -Domänen ausbilden. Die L_α -Domänen sind eben und verfügen nur über wenige Unterstrukturen. Dagegen bestehen die L_o -Domänen aus einem schwammartigen Netzwerk höherer Bereiche, in welchem sich niedrigere Bereiche unterschiedlicher Größe befinden. Diese strukturelle Eigenart wurde, wie wir sehen werden, häufig beobachtet. Bei den niedrigen Bereichen handelt es sich wahrscheinlich um L_α -Domänen. Neben der hier gezeigten Größenordnung von etwa 4 μm als Durchmesser der L_o -Domänen wies die Probe durchaus größere Domänen mit bis zu 50 μm Durchmesser auf. Die Domänen sind freistehend und die Ränder variieren von glatt bis ausgefranst. Bei den in der Abbildung ersichtlichen winzigen, höheren Bereichen, die im Folgenden als Mikrodomänen bezeichnet werden sollen, könnte es sich teilweise um Defekte oder Verunreinigungen handeln - auf der anderen Seite legt die vergleichbare Höhe nahe, dass es sich zumindest teilweise ebenfalls um L_o -Domänen handeln könnte. Die etwas größeren, runden Bereiche können aufgrund der Höhe ebenfalls als L_α -Domänen identifiziert werden. Der Höhenunterschied zwischen L_α - und L_o -Bereichen beträgt ungefähr 1,5 nm, dies gilt auch für die in den L_o -Netzwerken eingeschlossenen, niedrigen Bereiche (siehe Abbildung 5.7G).

Der ebenfalls bei 10 mN/m übertragene, drei Stunden mit VapA inkubierte Monolayer (Abbildung 5.7E) zeigt L_o -Domänen vergleichbarer Größe wie in der Kontrolle. An anderen Probenpositionen treten jedoch vereinzelt zu riesigen Netzwerken fusionierte L_o -Domänen auf (vergleiche Abbildung 5.10). Eine schwammartige Netzwerkstruktur ist ebenfalls zu erkennen. Die niedrigeren Bereiche, in der Kontrolle sehr glatt, sind nun von sehr rauher Struktur, mit runder bis wurmförmiger Granulierung. Dies kann eindeutig auf einen Effekt von VapA zurückgeführt werden, welches in diesem Fall offensichtlich bevorzugt mit den L_α -Domänen interagiert. Die Mikrodomänen können auch hier beobachtet werden, ferner finden sich sowohl in den niedrigeren Bereichen als auch in den Zwischenräumen der L_o -Netzwerke in unterschiedlich starker Ausprägung winzige, runde Strukturen, welche zum Teil höher als die L_o -Domänen sind. Die Höhendifferenz zwischen L_α - und L_o -Bereichen liegt hier ebenfalls bei 1,5 nm (siehe Abbildung 5.7H). Die kleinen und punktförmigen Strukturen erreichen unterschiedliche Höhen von teilweise über 10 nm, entsprechen insofern also nicht den in der Kontrolle beobachteten kleinen L_α -Domänen.

Für die Vergrößerungen in Abbildung 5.7 wurden die Rauheit des gesamten 2 $\mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ großen Ausschnitts bestimmt. Die Werte betragen für die Kontrolle 565 pm im L_o -Bereich (A) und 81 pm im L_α -Bereich (C), für den Mischfilm dagegen 392 pm im L_o -Bereich (D) und 572 pm im L_α -Bereich (F). Sehr deutlich ist die Erhöhung der Rauheit durch die auftretende Granulierung in den niedrigen Bereichen.

Die in Abbildung 5.8 gezeigten Monolayer unterscheiden sich von denen in Abbildung 5.7

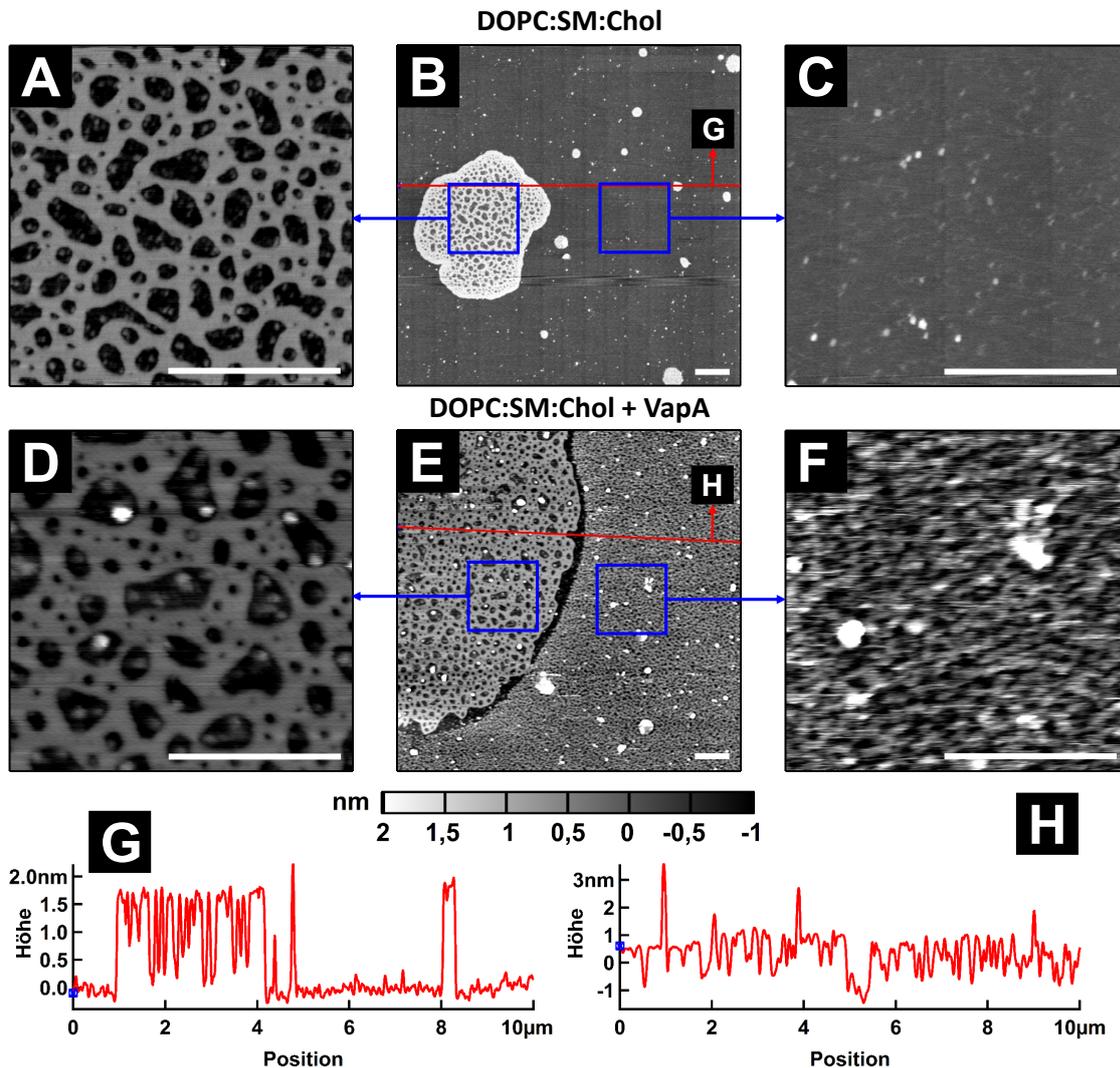


Abbildung 5.7

DOPC:SM:Chol-Monolayer (oben) und Effekt von VapA auf DOPC:SM:Chol-Monolayer (unten) bei 10 mN/m. 10 μm x 10 μm Übersichtsbilder zeigen cholesterolreiche (weiß) und -arme (grau) Domänen eines DOPC:SM:Chol-LB-Films ohne (B) beziehungsweise mit VapA (E). Die Höhenprofile G und H zeigen den Verlauf der z-Koordinate der Übersichtsbilder B und E entlang der roten Linie. 2 μm x 2 μm Bilder geben Details der cholesterolreichen L_o - (A, D) beziehungsweise cholesterolarmen L_α -Domänen (C, F). Blaue Quadrate geben die Positionen der Detailbilder rechts und links der Übersichtsbilder an. Der Skalierungsbalken ordnet den Graustufen für alle Bilder entsprechende z-Koordinaten zu. Weiße Balken entsprechen einer Länge von 1 μm. LB-Filme wurden in 150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 6,5 bei 22 °C präpariert. VapA wurde mit einer Endkonzentration von 1 μg/ml injiziert. Die Inkubation vor Beginn des LB-Übertrags betrug 180 Minuten. Die AFM-Messung erfolgte im Kontaktmodus bei Raumtemperatur.

einzig durch einen höheren Lateraldruck von 20 mN/m während des LB-Übertrags. Die Kontrolle weist eine ähnliche Größenverteilung der L_o -Domänen auf wie der Monolayer mit niedrigerem Lateraldruck. Um die verschiedenen Randstrukturen zu demonstrieren, wurde für dieses Beispiel eine Domäne mit ausgefranstem Rand ausgewählt - diese Ausprägung trat jedoch gleichermaßen für den LB-Film bei 10 mN/m auf. Die in das netzwerkartige Geflecht der L_o -Domänen eingeschlossenen, niedrigeren Bereiche (L_α -Mikrodomänen) gleichen denen des 10 mN/m-Monolayers - die L_o -Netzwerke weisen unterschiedliche Dichten auf. Ebenfalls sichtbar sind L_o -Mikrodomänen, wobei die Vergrößerung des L_α -Bereichs ein größeres Exemplar enthält. Bei den hier sichtbaren, winzigen Punkten mit intermediärer Höhe könnte es sich um Defekte oder Verunreinigungen handeln. Ansonsten sind die L_α -Bereiche wieder sehr glatt und weisen keine weitere Unterstruktur auf.

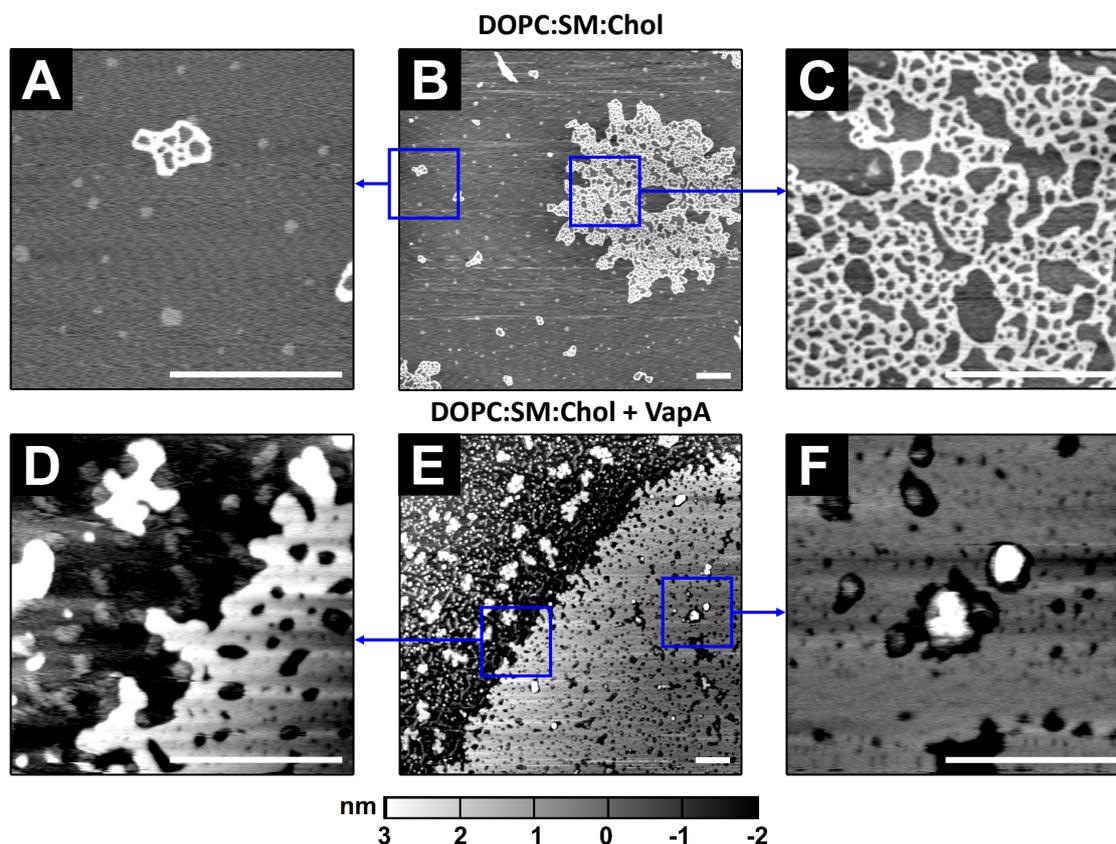


Abbildung 5.8

DOPC:SM:Chol-Monolayer (oben) und Effekt von VapA auf DOPC:SM:Chol-Monolayer (unten) bei 20 mN/m. 10 μm x 10 μm Übersichtsbilder zeigen cholesterolreiche (weiß) und -arme (grau) Domänen eines DOPC:SM:Chol-LB-Films ohne (B) beziehungsweise mit VapA (E). 2 μm x 2 μm Bilder geben Details der cholesterolreichen (C, F) beziehungsweise -armen (A, D) Domänen. Blaue Quadrate geben die Position der Detailbilder rechts und links der Übersichtsbilder an. Der Skalierungsbalken ordnet den Graustufen für alle Bilder entsprechende z-Koordinaten zu. Weiße Balken entsprechen einer Länge von 1 μm . LB-Filme wurden in 150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 6,5 bei 22 $^{\circ}\text{C}$ präpariert. VapA wurde mit einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ injiziert. Die Inkubation vor Beginn des LB-Übertrags betrug 180 Minuten. Die AFM-Messung erfolgte im Kontaktmodus bei Raumtemperatur.

Der Monolayer mit VapA (Abbildung 5.8D-F) enthält, wie schon zuvor bei niedrigerem Lateraldruck beobachtet, in die Zwischenräume des L_o -Netzwerks eingelassene Objekte von runder bis wurmartiger Struktur, die teilweise höher als die L_o -Bereiche sind und teilweise niedriger. Diese Objekte befinden sich deutlich innerhalb der niedrigen Bereiche und sind nicht etwa mit den Rändern der L_o -Domänenstruktur assoziiert. Auch bei Monolayern ohne VapA-Zugabe wurden diese Strukturen beobachtet, allerdings in weniger starker Ausprägung (vergleiche Abbildung 5.7). Die L_o -Bereiche sind häufig sehr groß und teilweise auch miteinander verschmolzen. Die Struktur der niedrigen Bereiche weist wieder die deutlichste Veränderung gegenüber der Kontrolle auf. Die Granulierung ist in diesem Fall nicht mehr so homogen wie in Abbildung 5.7E und F, sondern besteht aus mehreren, unterscheidbaren Unterstrukturen. Die kleinen L_o -Domänen mit Durchmessern bis zu $0,5 \mu\text{m}$ sind umgeben von punkt- bis wurmförmigen Strukturen intermediärer Höhe, an deren Rändern sich wiederum punktförmige, höhere Objekte befinden. Bei den Einschlüssen in die L_o -Netzwerke könnte es sich um die gleichen Strukturen handeln. Wegen ihrer geringeren Höhe ist anzunehmen, dass es sich bei den wurmartigen Strukturen nicht um L_α -Domänen handelt, sondern entweder um auf die Lipide aufgesetzte Objekte oder um eine zusätzliche Domänenform. Zu bedenken ist, dass VapA, wie in Abbildung 4.10 schematisch angedeutet wurde, mit der Kopfgruppenseite des Monolayers interagiert, welche hier dem Mica zugewandt ist.

Zusammenfassend interagiert VapA bevorzugt mit den cholesterolarmen Bereichen der Monolayer. Es kam zu der Bildung einer granulierten Unterstruktur in diesen Bereichen. In den Zwischenräumen der netzförmigen Struktur der L_o -Domänen traten unterschiedlich hohe Formen von Aggregaten auf, welche teilweise der granulierten Unterstruktur der L_α -Domänen entsprechen könnte, teilweise aber wesentlich höher aus der Membran hervortraten.

5.4.2 Zeit- und konzentrationsabhängige Wechselwirkung von VapA mit Monolayern

Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden konnten schon einige Beobachtungen zur Interaktion von VapA mit Monolayern und insbesondere auch zu deren Domänenstruktur gemacht werden. Nun sollen bei 20 mN/m auch zwei Beispiele für kürzere Inkubationszeiten betrachtet werden. In Abbildung 5.9 werden eine Kontrolle ohne VapA-Injektion, jeweils ein Bild einer Messung mit einer beziehungsweise zwei Stunden Inkubationszeit sowie zwei Bilder mit drei Stunden Inkubationszeit gegenübergestellt.

Die Kontrolle zeigt wieder eine L_o -Domäne, deren Unterstrukturen in diesem Fall sehr dicht vernetzt sind und hauptsächlich kleine, runde Zwischenräume aufweisen. Zwei zusätzliche allgemeine Beobachtungen lassen sich diesem Bild entnehmen. Erstens sparen die L_o -Mikrodomänen die Umgebung der großen L_o -Domänen aus, was häufig bei LB-Filmen ohne VapA auftritt und auf Fusionen von Mikrodomänen in die großen Domänen zurückzuführen sein könnte. Zweitens weist die L_o -Domäne eine polarisierte Randstruktur auf. Auf der linken Seite ist der Rand stark ausgefranst, auf der rechten schwach. Dies kann ein durch den Prozess des LB-Übertrags verursachtes Artefakt sein.

Bei den aus zwei unabhängigen LB-Überträgen stammenden Bildern mit drei Stunden mit VapA inkubierten Monolayern erkennt man zwei unterschiedliche Erscheinungsformen der in Abschnitt 5.4.1 beschriebenen Effekte. Die Granulierung im linken Bild (Abbildung 5.9D) ist recht feinkörnig, trotzdem sind Unterstrukturen zu erkennen. Im rechten Bild

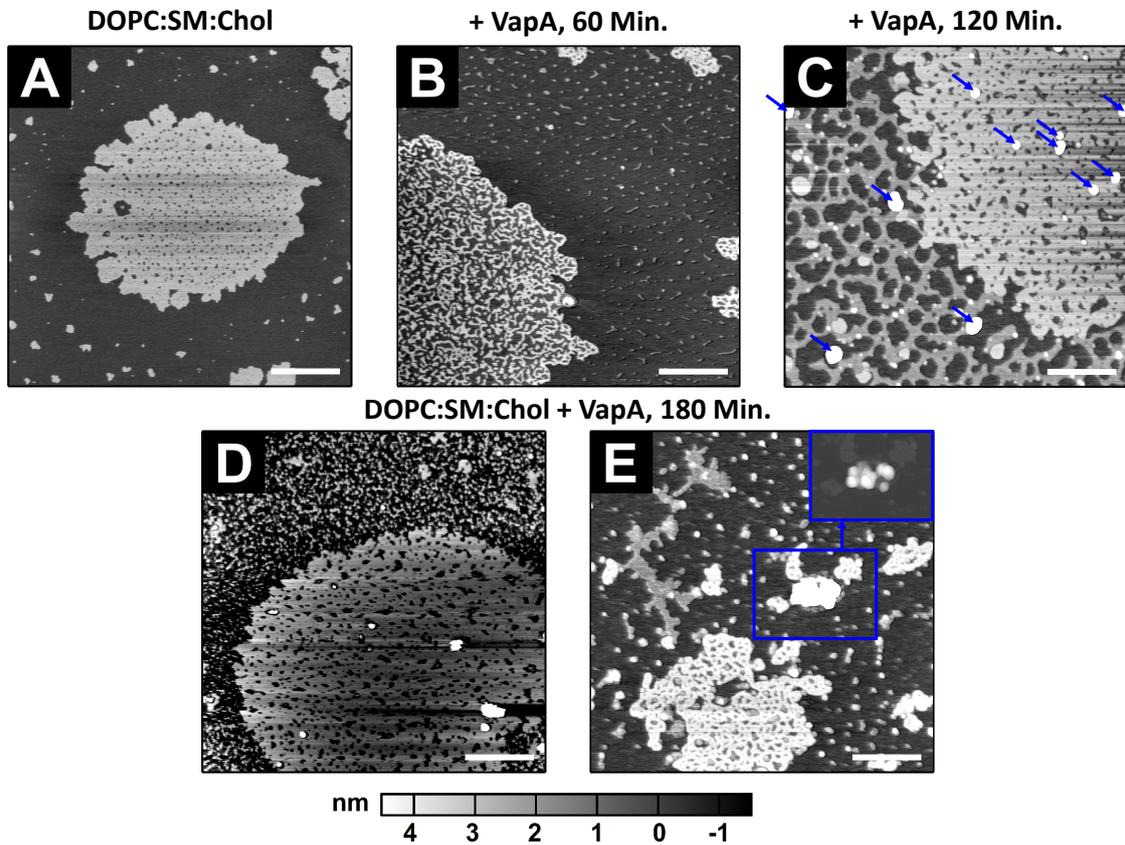


Abbildung 5.9

Effekt von VapA auf DOPC:SM:Chol-Monolayer bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ Bilder von DOPC:SM:Chol-LB-Filmen ohne (A), mit 60 Minuten (B), mit 120 Minuten (C) und mit 180 Minuten (D, E) Inkubationszeit mit jeweils $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ VapA (Endkonzentration). In Bild C kennzeichnen blaue Pfeile Strukturen höher als 10 nm. In Bild E wurde ein Ausschnitt mit einer modifizierten Höhenskala eingefügt (blaues Rechteck). Der Skalierungsbalken ordnet den Graustufen der übrigen Bilder entsprechende z-Koordinaten zu, für den gekennzeichneten Ausschnitt reicht die Skalierung von -20 nm bis 60 nm . Weiße Balken entsprechen einer Länge von $1 \mu\text{m}$. LB-Filme wurden in 150 mM NaCl , 5 mM HEPES , pH 6,5 bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ und 20 mN/m präpariert. Die AFM-Messung erfolgte im Kontaktmodus bei Raumtemperatur.

(Abbildung 5.9E) sind die Unterstrukturen größer und weniger dicht gepackt, auch scheinen in diesem Fall die wurmartigen Strukturen intermediärer Höhe nicht anwesend oder nur in Ansätzen ausgebildet zu sein. Die Ausfüllung der Zwischenräume der L_o -Netzwerke ist in diesem Bild besonders deutlich erkennbar. Ein Ausschnitt aus Bild 5.9E wurde mit einer Skalierung von -20 nm bis 60 nm dargestellt. Man erkennt hier auf den Monolayer aufgesetzte große Aggregate von etwa 60 nm Höhe und einer Breite in derselben Größenordnung. Die Objekte scheinen geordnet zu sein, es lässt sich eine sechseckige, möglicherweise sogar kristalline Struktur vermuten. Ob es sich hierbei um Verunreinigungen handelt oder diese Strukturen tatsächlich auf VapA zurückzuführen sind, lässt sich nicht endgültig klären.

Die Monolayer mit kürzerer VapA-Inkubationszeit (Abbildung 5.9B und C) gewähren Einblick in unterschiedliche Stadien der Ausbildung wurmförmiger Strukturen auf den niedrigeren L_α -Bereichen, welche in Abbildung 5.8D und E sowie Abbildung 5.9D beobachtet wurden. Nach einstündiger Inkubation sind erste Ansätze dieser Strukturen erkennbar. Diese scheinen noch aus wenigen Molekülen zu bestehen und sind teilweise mit etwas höheren Körnchenstrukturen assoziiert. Ein späteres Stadium zeigt sich nach zwei Stunden Inkubation. In diesem Fall haben sich die wurmförmigen Strukturen bereits zu einem Netzwerk zusammengeschlossen, welches an den Rändern von vielen Körnchenstrukturen besetzt ist. Es haben sich ferner größere Aggregate gebildet, welche ebenfalls mit den Rändern des Netzwerks in Kontakt stehen. Neben diesen Aggregaten sind sowohl in niedrigen als auch in hohen Bereichen Objekte einer Höhe zwischen 20 und 60 nm verteilt, welche auch im Fall von drei Stunden Inkubationszeit beobachtet wurden. Bei den wurmartigen Strukturen und später den Netzwerken könnte es sich um eine weitere Form von Domänen zu handeln, deren Bildung durch die Anwesenheit von VapA induziert wird.

Die Ausbildung dieses Netzwerks ist scheinbar bei dem zwei Stunden inkubierten Monolayer weiter vorangeschritten als in dem in Abbildung 5.8E gezeigten Beispiel mit drei Stunden Inkubationszeit. Dies mag darin begründet sein, dass einige nicht ausreichend kontrollierbare Bedingungen der unabhängig durchgeführten Experimente zu einer Modifizierung der Kinetik der Interaktion führten. Wie schon früher beobachtet, hängt die Interaktion von VapA mit Membranen von den exakten Membraneigenschaften und Umgebungsbedingungen ab.

In Abbildung 5.10 werden Höhenbilder eines drei Stunden mit einer reduzierten Konzentration von $0,2 \mu\text{g/ml}$ VapA inkubierten Monolayers gezeigt. Enthalten sind ein $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ Übersichtsbild und ein $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ großes Bild, welches an der markierten Position des Übersichtsbildes aufgenommen wurde.

Bei diesem Experiment kam es zu einer massiven Verschmelzung von ehemals runden L_o -Domänen, wobei die Domänen nicht vollständig ineinander aufgingen, sondern häufig durch Regionen geringerer Netzwerkdichte miteinander verbunden waren. Diese geringere Netzwerkdichte, deren Struktur in der Vergrößerung (Abbildung 5.10B) erkennbar ist, tritt nicht ausschließlich an den Kontaktstellen, sondern auch in weiteren Bereichen der L_o -Domänen auf. Die bisher beobachteten, die L_α -Bereiche bevölkernden, wurmartigen Strukturen sind in diesem Fall etwas breiter und unregelmäßig geformt, länglich und nur teilweise miteinander verbunden. Die Ausfüllung der Zwischenräume des L_o -Netzwerks mit kleinen Strukturen ist hier weniger ausgeprägt und auf die Bereiche dichter L_o -Netzwerke konzentriert. Es tritt zusätzlich eine weitere Form von Domänen auf. Diese sind von annähernd kreisförmiger Form, etwa so hoch wie die wurmartigen Strukturen oder etwas niedriger und meist in Zwischenräumen der L_o -Domänen lokalisiert (siehe

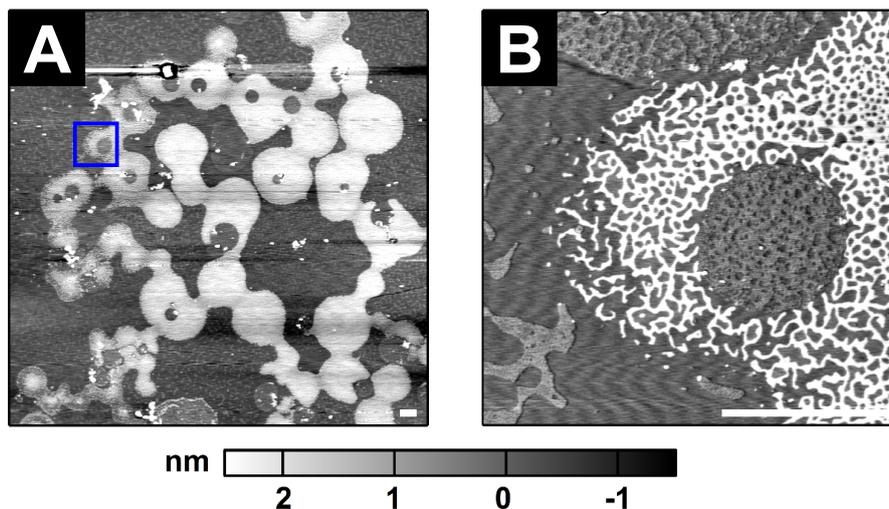


Abbildung 5.10

Effekt von $0,2 \mu\text{g/ml}$ VapA auf DOPC:SM:Chol-Monolayer. $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ Übersichtsbild (A) sowie $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ Detailbild einer Position der Probe (B). Ein blaues Quadrat auf dem Übersichtsbild gibt die Position des Detailbilds an. Der Skalierungsbalken ordnet den Graustufen für beide Bilder entsprechende z-Koordinaten zu. Weiße Balken entsprechen einer Länge von $2 \mu\text{m}$. Der LB-Film wurde in 150 mM NaCl , 5 mM HEPES , $\text{pH } 6,5$ bei $22 \text{ }^\circ\text{C}$ und 20 mN/m präpariert und über drei Stunden mit $0,2 \mu\text{g/ml}$ VapA (Endkonzentration) inkubiert. Die AFM-Messung erfolgte im Kontaktmodus bei Raumtemperatur.

Abbildung 5.10B mittig rechts). Sie haben eine löchrige Struktur und einen deutlich abgegrenzten Rand. Aufgrund der Höhe und Oberflächenstruktur besteht die Möglichkeit, dass es sich um eine modifizierte Ausprägung der von VapA verursachten, wurmartigen Strukturen handelt.

5.4.3 Wechselwirkung von VapA mit negativ geladenen Monolayern

Nach der ausführlichen Behandlung von DOPC:SM:Chol-Monolayern soll nun der Effekt von VapA auf geladene DOPC:SM:Chol:PS-Monolayer ($40,5\% : 40,5\% : 9\% : 10\%$) betrachtet werden. Die Monolayer wurden wieder bei 20 mN/m präpariert und gegebenenfalls drei Stunden mit $1 \mu\text{g/ml}$ VapA inkubiert. Für Kontrolle und Mischfilm zeigt Abbildung 5.11 jeweils ein $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ großes Höhenbild sowie zwei Detailbilder von L_o - und L_α -Bereichen.

Die PS-haltigen Monolayer weisen, ähnlich wie die ungeladenen, einzeln stehende L_o -Domänen mit netzartiger Unterstruktur auf. Die Domänen sind rund, teilweise auch unregelmäßiger geformt und haben unregelmäßig ausgefranste Ränder. Die Abbildung zeigt eine Domäne mit engmaschigerem Netzwerk, es treten jedoch in anderen Regionen der Probe durchaus Domänen mit größeren und unregelmäßigen Zwischenräumen auf. Insofern kann hier kein wesentlicher Unterschied zum ungeladenen Monolayer festgestellt werden. Gleiches gilt auch für die ebenen L_α -Bereiche. Diese sind allerdings relativ gleichmäßig mit kleineren Objekten bedeckt, wobei es sich aufgrund der vergleichbaren Höhe wieder um L_o -Mikrodomänen handeln könnte. Die kleinen Objekte messen bis zu 20 nm im Durchmesser und sind deutlich dichter und gleichmäßiger über die gesamte Probe verteilt

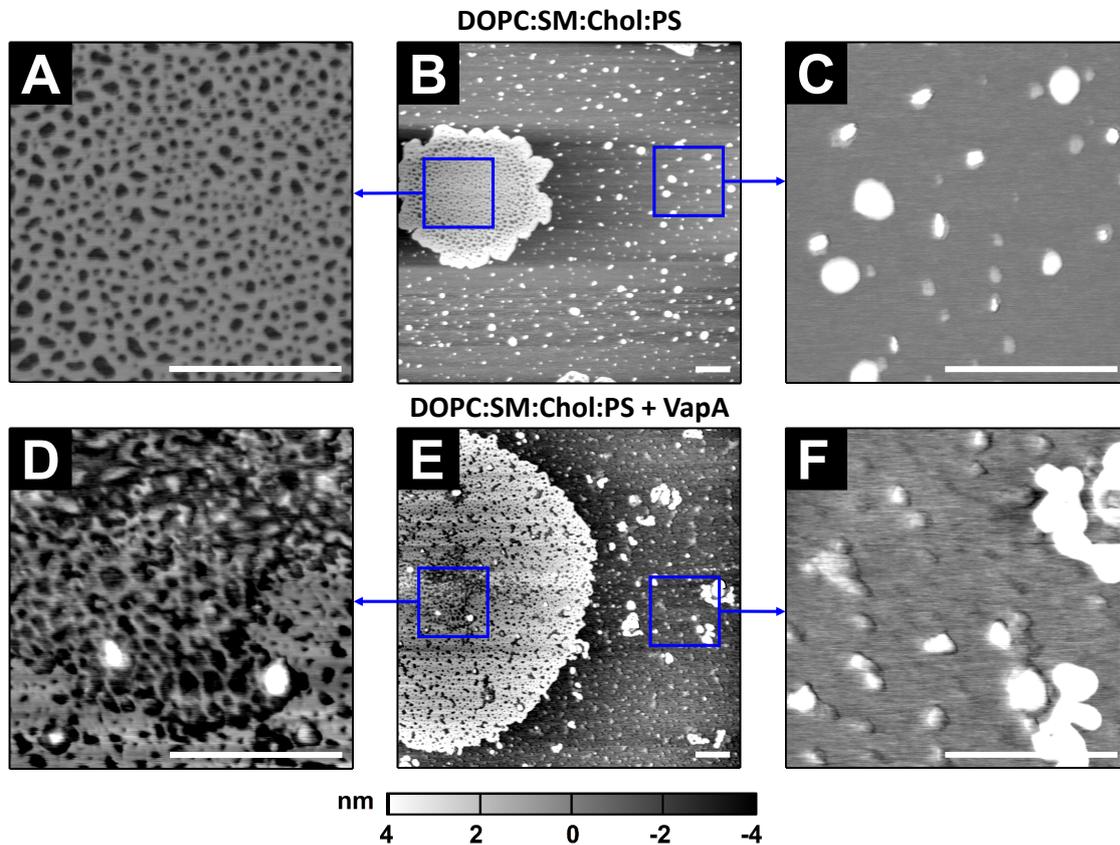


Abbildung 5.11

DOPC:SM:Chol:PS-Monolayer (oben) sowie Effekt von VapA auf DOPC:SM:Chol:PS-Monolayer (unten) bei 20 mN/m. 10 μm x 10 μm Übersichtsbilder zeigen cholesterolreiche (weiß) und -arme (grau) Domänen eines DOPC:SM:Chol:PS-LB-Films ohne (B) beziehungsweise mit VapA (E). 2 μm x 2 μm Bilder geben Details der cholesterolreichen (C, F) beziehungsweise -armen (A, D) Domänen. Blaue Quadrate geben die Position der Detailbilder rechts und links der Übersichtsbilder an. Der Skalierungsbalken ordnet den Graustufen für alle Bilder entsprechende z-Koordinaten zu. Weiße Balken entsprechen einer Länge von 1 μm . LB-Filme wurden in 150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 6,5 bei 22 °C präpariert. VapA wurde bis zu einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ injiziert. Die Inkubation vor Beginn des LB-Übertrags betrug 180 Minuten. Die AFM-Messung erfolgte im Kontaktmodus bei Raumtemperatur.

als beim DOPC:SM:Chol-Monolayer. Zudem sind weniger hohe, kleinere Objekte zu sehen, bei welchen es sich durchaus um Verunreinigungen handeln kann. Sie umgeben aber auch einige kleinere Exemplare der höheren Mikrodomänen.

Nach Inkubation mit VapA sind bei der geladenen Lipidmischung einige vergleichbare Beobachtungen anzustellen. Die Zwischenräume der L_o -Netzwerke sind in einigen Fällen mit kleineren, einzelnen Objekten gefüllt. Die L_α -Bereiche weisen wieder eine erhöhte Granulierung auf, wobei die niedrigeren, meist runden Strukturen die Ansätze der bei ungeladenen Monolayern beobachteten, wurmartigen Domänenstrukturen darstellen könnten (vergleiche Abbildung 5.8D und E). Es finden sich allerdings auch sehr unregelmäßige Gebilde in den L_α -Bereichen, welche in der Höhe größtenteils mit den L_o -Domänen übereinstimmen. Einzelne runde Objekte erreichen aber durchaus Höhen von bis zu 10 nm. Viele der netzwerkartigen L_o -Domänen verfügen relativ zentral über eine unregelmäßig begrenzte Struktur. Diese ist etwas niedriger als das L_o -Netzwerk, in einigen Fällen auch etwas höher, und scheint ganz oder teilweise aus diesem hervorgegangen sein. Strukturell handelt es sich um ein grobmaschigeres Netzwerk, dessen Stränge gegenüber der umgebenden L_o -Domäne dünner geworden sind und damit eine geringere Integrität aufweisen. Im Gegensatz zu den in Abbildung 5.10 beobachteten runden Domänen sind die Stränge allerdings mit dem L_o -Netzwerk verbunden.

5.5 Rasterkraftmikroskopische Messungen an Bilayern

Im Unterschied zu den Untersuchungen an LB-Filmen in Luft wurden die AFM-Experimente an festkörperunterstützten Bilayern in Puffer durchgeführt. Dadurch ergibt sich der Vorteil, den Effekt von VapA an einer konkreten Probenposition im Zeitverlauf betrachten zu können. Es entfällt allerdings die Möglichkeit, eine große Anzahl von Probenpositionen zu vergleichen, da das System nach Proteinzugabe sehr empfindlich ist und sich im Normalfall an einer neuen Position kein stabiles Bild mehr erzeugen lässt. Eine geeignete Probenposition stellte für diese Messungen eine Position dar, an welcher sich sowohl cholesterolreiche L_o -Domänen als auch cholesterolare L_α -Domänen befanden und das Bild über mehrere Aufnahmezyklen stabil blieb. Die Bilder wurden ohne Unterbrechung aufeinander folgend aufgenommen, wobei die Aufnahmedauer von den gewählten Messparametern abhängig war. VapA wurde sehr vorsichtig bei laufender Messung in den im Petrischalendeckel befindlichen Puffer injiziert. Für die Bilayerexperimente sind erfahrungsgemäß höhere Proteinkonzentrationen notwendig als für Monolayerexperimente. Abweichend von den übrigen Messungen dieser Arbeit wurden die in diesem Abschnitt vorgestellten Experimente mit DOPC:SM:Chol in einem molaren Mischungsverhältnis von 40% : 40% : 20% durchgeführt, weil die resultierenden cholesterolreichen Domänen dabei eine größere Fläche einnehmen und damit besser abzubilden sind.

Die zur grafischen Aufarbeitung der Höhenbilder beziehungsweise Kraftkarten verwendeten Protokolle wurden in Abschnitt 5.4 aufgeführt und erläutert.

Es werden im Folgenden Ergebnisse der Interaktion von VapA mit der ungeladenen Lipidmischung DOPC:SM:Chol präsentiert. Verglichen wird dabei zwischen Ergebnissen bei den pH-Werten 6,5 und 4,5. Die Experimente wurden jeweils mindestens zweimal unabhängig durchgeführt, darüber hinaus wurden Messungen mit der Lipidmischung DOPC:SM:Chol:PS im molaren Verhältnis 36% : 36% : 18% : 10% umgesetzt, auf deren Ergebnisse in Abschnitt 5.5.2 eingegangen wird.

5.5.1 Wechselwirkung von VapA mit ungeladenen Bilayern

Abbildung 5.12 zeigt die Ergebnisse einer Messung bei pH 6,5. Dargestellt sind $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ Höhenbilder einer Position der Probe unmittelbar vor der Injektion von VapA sowie eine und zwei Stunden nach einer Injektion von VapA bis zu einer Endkonzentration von $5 \mu\text{g/ml}$.

Auf dem Bild vor VapA-Injektion (Abbildung 5.12A) sind deutlich die höheren L_o -Domänen (hellgrau) sowie die niedrigeren L_α -Domänen zu erkennen. Die Höhenskalierung ist im Folgenden immer so gewählt, dass die L_o -Domänen eine Höhe von 0 nm haben, die L_α -Domänen also eine negative Höhe aufweisen. Bei der vorliegenden Lipidmischung und den Umgebungsbedingungen nehmen offensichtlich die L_o -Domänen eine etwas größere Fläche ein als die L_α -Domänen. Dies wird auch durch das Histogramm bestätigt, welches darüber hinaus eine mittlere Höhendifferenz der Domänen zwischen 2 nm und 3 nm angibt. Eine bevorzugte Inselbildung ist nicht zu verzeichnen, vielmehr sind die Domänen größtenteils untereinander verbunden. Eine Unterstruktur der Domänen ist nicht zu erkennen, aber die L_o -Domänen sind an einigen Stellen, jedoch nicht gleichmäßig über den Bildausschnitt verteilt, von kleinen L_α -Domänen durchsetzt. Die Messung im dynamischen Modus in Flüssigkeit resultiert in einer verringerten Auflösung der Höhenbilder, daher ist die von den LB-Filmen bekannte netzartige Struktur der L_o -Domänen in der gezeigten Vergrößerung nicht sichtbar. Ein vorliegendes Detailbild von $5 \times 5 \mu\text{m}$ Größe belegt, dass auch hier die L_o -Domänen eine Unterstruktur besitzen.

Eine Stunde nach Injektion von VapA (Abbildung 5.12B) hat sich das Bild bereits gewandelt. Die Domänen haben sich zu größeren Domänen verbunden, dabei hat sich die Gesamtlänge der Domänengrenzen im Bildausschnitt deutlich verringert. Der Höhenunterschied zwischen L_o - und L_α -Domänen beträgt in diesem Bild etwa 2 nm, was sowohl aus dem entsprechenden Histogramm als auch aus dem Höhenprofil hervorgeht. Neben dieser Umverteilung der Flächenverhältnisse der beiden Domänenpopulationen treten innerhalb von L_α -Domänen neue Bereiche auf. Diese sind rund bis oval geformt und um etwa 3 nm niedriger als die L_α -Domänen. Aufgrund dieser Höhendifferenz kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hier um freies Mica handelt, ebenso kann allerdings nach wie vor ein Film aus Lipiden oder Proteinen oder ein Mischfilm vorliegen. Im Zentrum der neu gebildeten Domänen befindet sich ein sehr kleiner Bereich von der Höhe der L_α -Domänen (vergleiche Höhenprofil, Abbildung 5.12D). Da sich im dynamischen Modus im Puffermedium die zwischen Probe und *Cantilever*-Spitze wirkenden Kräfte von den im Kontaktmodus an Luft wirkenden Kräften unterscheiden, lässt sich allein auf Grundlage der Höhenunterschiede keine Korrelation zwischen diesen neu gebildeten Domänen und den an den LB-Filmen beobachteten Strukturen machen.

Nach einer weiteren Stunde (Abbildung 5.12C) sind die L_α -Domänen nahezu vollständig verschwunden, die neu gebildeten Domänen haben sich weiter ausgebreitet. Dabei sind die L_o -Domänen zu einer Fläche verbunden, auf welcher die sehr niedrigen Bereiche inselförmige Domänen bilden. Der Höhenunterschied zwischen den L_o -Bereichen und den neu gebildeten Domänen beträgt, über den gesamten Bildausschnitt gemittelt, etwa 5,5 nm. Innerhalb der neuen, VapA-induzierten Domänen befinden sich nach wie vor die kleinen Erhebungen, welche sich am ursprünglichen Entstehungsort der Domänen befinden, also eine Art Kondensationskern zu bilden scheinen. In den L_o -Bereichen sind noch vereinzelte, punktförmige Vertiefungen verteilt, welche als Überrest der ehemaligen L_α -Domänen interpretiert werden können. Insgesamt ist im Messverlauf keine Veränderung

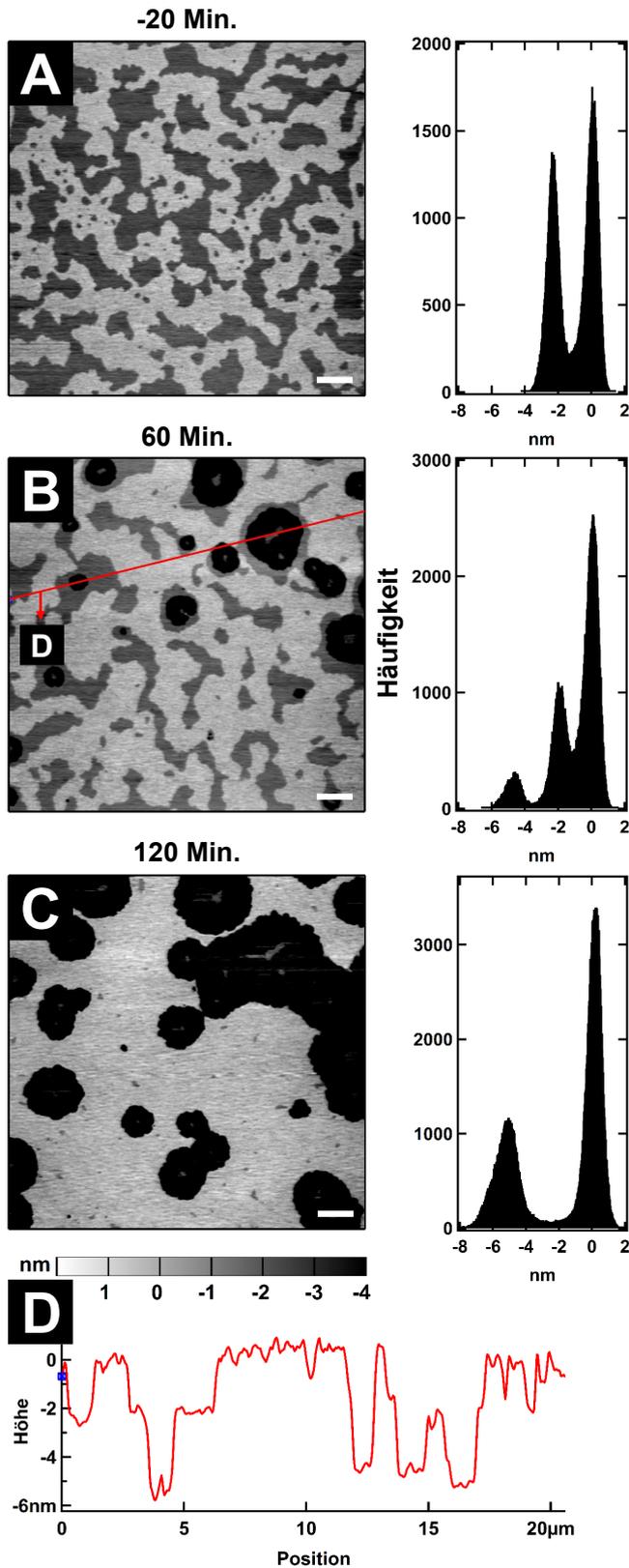


Abbildung 5.12

Zeitverlauf des Effekts von VapA auf DOPC:SM:Chol-Bilayer in Flüssigkeit bei pH 6,5. $20 \mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ Bilder derselben Probenposition ungefähr 20 Minuten vor Zugabe (A) beziehungsweise 60 (B) und 120 Minuten (C) nach Zugabe von $5 \mu\text{g/ml}$ VapA (Endkonzentration). Die Aufnahmedauer betrug für jedes Bild 16 Minuten. Weiße Balken entsprechen einer Länge von $2 \mu\text{m}$. Der Skalierungsbalken ordnet den Graustufen für alle Bilder entsprechende z-Koordinaten zu. Die Histogramme geben die Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen z-Positionen an. Das Höhenprofil (D) zeigt den Verlauf der z-Koordinate des Bildes B entlang der roten Linie. Die Messung erfolgte in 150 mM NaCl , 5 mM HEPES , pH 6,5 bei Raumtemperatur. Aufnahmen im dynamischen Modus mit Amplitudenfeedback bei einer Bildauflösung von 512×512 Bildpunkten und Scanrate $0,5 \text{ Hz}$. Die angegebenen Zeiten sind auf volle 5 Minuten gerundet.

der Oberflächenrauheit der Domänen erkennbar. Abschließend sei noch angemerkt, dass die Domänen in diesen Messungen ohne äußere Einflüsse weitestgehend ortsfest sind, also sowohl ihre Form als auch ihre Position höchstens leicht verändern.

5.5.2 Wechselwirkung von VapA mit ungeladenen Bilayern bei reduziertem pH-Wert

Im Vergleich zu den Ergebnissen der Experimente bei pH 6,5 wird in Abbildung 5.13 exemplarisch eine Messung bei einem pH-Wert von 4,5 gezeigt. Die Bildausschnitte entsprechen in diesem Fall einer Probenfläche von $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$. Da bei der gleichen Anzahl an Bildpunkten (512×512) mit der doppelten Scanrate von 1 Hz abgebildet wurde, wurden diese Aufnahmen mit der gleichen Scangeschwindigkeit gemacht. Die Endkonzentration von VapA betrug im Fall der präsentierten Messung $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$.

Im gezeigten Ausschnitt vor Injektion von VapA (Abbildung 5.13A) ist die Fläche der höheren L_o -Domänen mit Abstand größer als die der L_α -Domänen, welche inselförmig verteilt und mit maximalem Durchmesser von $1\ \mu\text{m}$ relativ klein sind. Es ist möglich, dass der Bildausschnitt in einer großen L_o -Domäne lokalisiert ist, in deren Umgebung sich auch größere L_α -Domänen finden ließen. Eine Unterstruktur einer der beiden Domänen lässt sich auch in diesem Fall nicht erkennen.

Eine Stunde nach der VapA-Injektion (Abbildung 5.13B) treten in den niedrigeren L_α -Domänen Anzeichen höherer Strukturen auf, durch welche die Rauheit in diesen Bereichen erhöht zu sein scheint. Häufig befinden sich diese höheren Strukturen zentral in den kleinen L_α -Domänen, deren Durchmesser teilweise leicht angestiegen ist. Die Höhe dieser neuen Strukturen entspricht ungefähr der Höhe der L_o -Bereiche. Der Höhenunterschied zwischen L_o - und L_α -Domänen beträgt in diesem Beispiel ungefähr 1 nm. Dass der Höhenunterschied in diesem Experiment niedriger ist, als anhand der Monolayermessungen für zwischen den Membranlayern symmetrische Domänen erwartet, kann ein Hinweis darauf sein, dass die hier beobachteten Domänen nur in einem Monolayer ausgeprägt waren. Im Normalfall wird allerdings angenommen, dass Membrandomänen symmetrisch vorliegen.

Nach einer weiteren Stunde (Abbildung 5.13C) haben sich, hauptsächlich in der oberen Bildhälfte, in den L_o -Domänen neuartige Domänen ausgebildet, welche etwa 1 nm höher sind als die L_o -Bereiche. Die Form und die Randstruktur dieser neuen, höheren Domänen sind sehr unregelmäßig ausgefranst. Sie sind vergleichbar mit der Form der in den L_o -Domänen geladener Monolayer beobachteten Strukturen⁵ (vergleiche Abbildung 5.11D). In der unteren Bildhälfte sind die neuen, höheren Domänen nicht vorherrschend, die meisten L_α -Domänen haben hier im Vergleich zum vorherigen Bild weitestgehend ihre Form und Größe behalten. Die Strukturen innerhalb der L_α -Domänen sind allerdings bereits etwas höher geworden. Bei den L_o -Domänen ist es zu keinem erkennbaren Anstieg der Rauheit gekommen.

Dies ist auch drei Stunden nach der VapA-Injektion (Abbildung 5.13D) nicht der Fall. Die neuen, höheren Domänen auf den L_o -Bereichen haben auch auf diesem Bild eine durchschnittliche Höhe von 1 nm über den L_o -Domänen. Sie bedecken inzwischen ungefähr die Hälfte der Fläche des Bildausschnitts, dehnen sich allerdings nur innerhalb der L_o -Bereiche aus. Strukturen innerhalb der L_α -Domänen haben ebenfalls etwas an

⁵Wie in Abschnitt 5.4.3 erläutert, fanden sich bei dem LB-Film der geladenen Lipidmischung nach VapA-Inkubation durchaus Strukturen dieser Art, deren Höhe größer war als die der umgebenden L_o -Domänen.

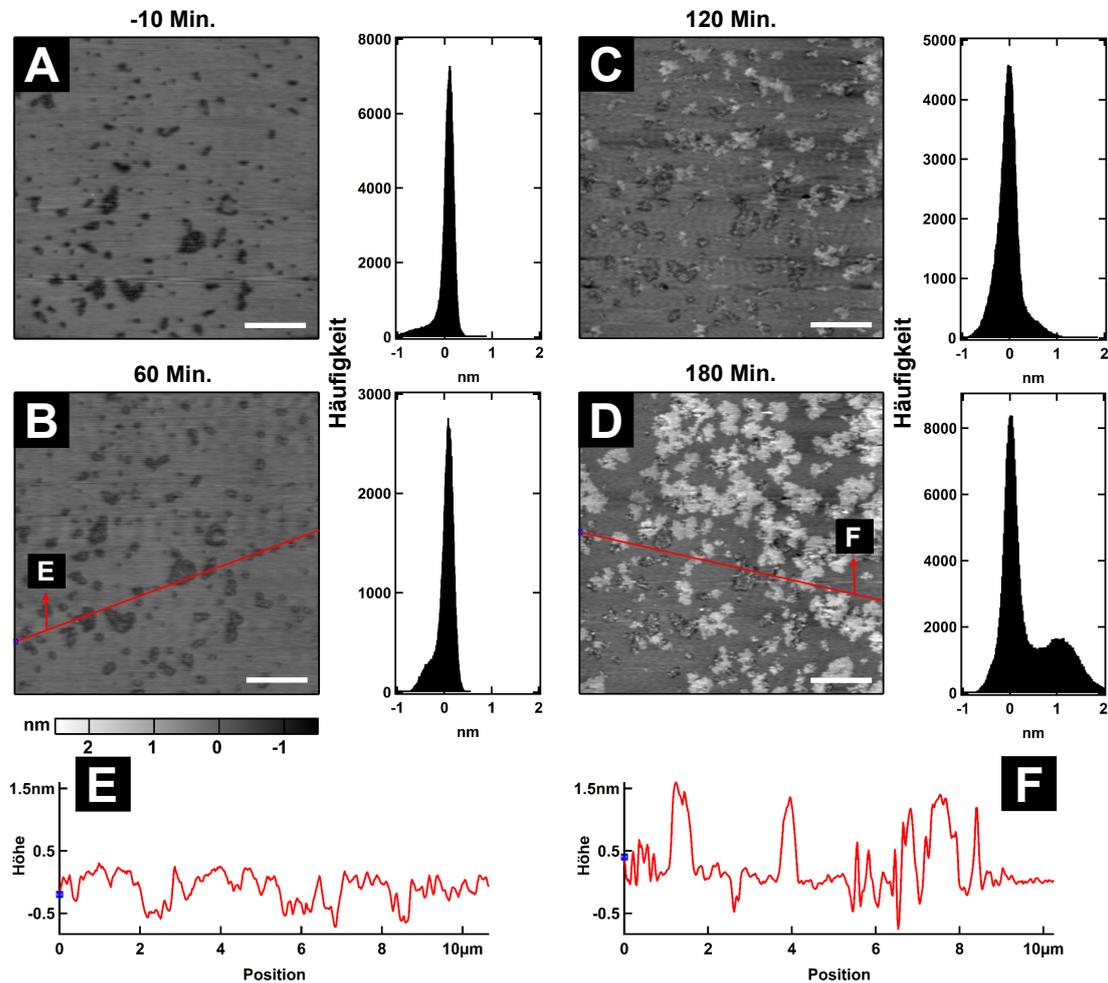


Abbildung 5.13

Zeitverlauf des Effekts von VapA auf DOPC:SM:Chol-Bilayer in Flüssigkeit bei pH 4,5. $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ Bilder derselben Probenposition ungefähr 10 Minuten vor Zugabe (A) beziehungsweise 60 (B), 120 (C) und 180 Minuten (C) nach Zugabe von $20 \mu\text{g/ml}$ VapA (Endkonzentration). Die Aufnahmezeit betrug für jedes Bild 8 Minuten. Weiße Balken entsprechen einer Länge von $2 \mu\text{m}$. Der Skalierungsbalken ordnet den Graustufen für alle Bilder entsprechende z-Koordinaten zu. Die Histogramme geben die Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen z-Positionen an. Die Höhenprofile E und F zeigen den Verlauf der z-Koordinaten der Bilder B und D entlang der roten Linie. Die Messung erfolgte in 150 mM NaCl , 5 mM HEPES , pH 4,5 bei Raumtemperatur. Aufnahmen im dynamischen Modus mit Amplitudenfeedback bei einer Bildauflösung von 512×512 Bildpunkten und Scanrate 1 Hz . Die angegebenen Zeiten sind auf volle 5 Minuten gerundet.

Höhe und Ausdehnung gewonnen. Aufgrund der begrenzten Auflösung lassen sich keine konkreten Verknüpfungen zu den an Monolayern beobachteten Effekten anstellen, es kann aber vermutet werden, dass es sich um vergleichbare Objekte handelt. Bei der Bewertung dieser Beobachtungen muss natürlich die gegenüber der Messung bei pH 6,5 höhere Proteinkonzentration einbezogen werden.

Die Bilayer mit PS-haltigen Lipidmischungen bei einem pH-Wert von 6,5 zeigten nach VapA-Injektion ähnliche Ausprägungen. Es kam zu einer Auffüllung der cholesterolarmen Domänen mit unebenen Strukturen und zur Bildung höherer Domänen, welche sich im Verlauf der Messung ausbreiteten, auf den cholesterolreichen Bereichen.

5.6 Elektrophysiologische Untersuchung der Wechselwirkung zwischen VapA und freistehenden Membranen

Um Informationen über die Permeabilisierung freistehender Membranen durch VapA und zusätzlich ergänzende Daten zu den Bindungseigenschaften zu gewinnen, wurden elektrophysiologische Messungen durchgeführt. An die von beiden Seiten zugänglichen, nach der Methode von Montal und Mueller [1972] präparierten Membranen wurde über zwei Elektroden eine Spannung angelegt. Änderungen der Membrankapazität im Zeitverlauf geben dabei Aufschluss über Dicke und Zusammensetzung des Membransystems, während über den Stromfluss durch die Membran deren Permeabilität verfolgt werden kann.

In diesem Abschnitt wird zunächst der Einfluss von VapA auf die Kapazität von Membranen der molaren Lipidzusammensetzung DOPC:SM:Chol (45% : 45% : 10%) diskutiert. Im Anschluss werden Ergebnisse zur Permeabilisierung dieser Membranen durch VapA bei den pH-Werten 6,5, 5,5 und 4,5 vorgestellt. Darüber hinaus werden die Effekte von VapA, dessen prozessierter Form VapA p12 und dem strukturell ähnlichen Protein VapB vergleichend gegenübergestellt. Der Salzgehalt des Puffersystems war in allen Fällen 150 mM NaCl und 5 mM HEPES.

Bei konstanter Messtemperatur von 37 °C wurde zunächst die Membran wie in Abschnitt 4.10 erläutert präpariert und einem anschließenden Spannungstest unterzogen. Damit wurde das Risiko eines späteren präparationsbedingten Zusammenbruchs der Membran verringert. In eines der mit 1,9 ml Puffer gefüllten Kompartimente wurden daraufhin 10 μ l der in PBS gelösten Proteine injiziert. Die Endkonzentration der Proteine betrug dabei 5 μ g/ml für VapA, 4,2 μ g/ml für VapA p12 und 6,7 μ g/ml für VapB.

Im Fall einer Kapazitätsmessung wurde ohne weitere Einflussnahme der Kapazitätsverlauf aufgenommen, bis die Messung durch eine Membranruptur oder durch eine Störung des Messsystems beendet wurde. Während die Bindung von Proteinen an die Membran häufig zu einem Anstieg der Kapazität führt, stellt die Permeabilisierung einen hierzu entgegenwirkenden Effekt dar, da hierdurch ihr Vermögen, elektrische Ladungen voneinander zu trennen, reduziert wird. Für eine Strommessung wurden nach der Injektion über die beiden Elektroden Spannungen zwischen 20 mV und 120 mV an die Membran angelegt.

Unter Verwendung von Formel 4.13 wurde eine Abschätzung der Porengrößen vorgenommen. Einerseits wurde die Stromspur der Messungen direkt in ein Porendurchmesseräquivalent umgerechnet. Andererseits wurden für einzelne Zeitabschnitte mit Hilfe von Histogrammen die Häufigkeitsverteilungen der Stromstärken diskreter Stromniveaus ermittelt und mit Gauss-Normalverteilungen angefitet. Die daraus gewonnenen Erwartungswerte wurden für die Berechnung der entsprechenden Porendurchmesser herangezogen.

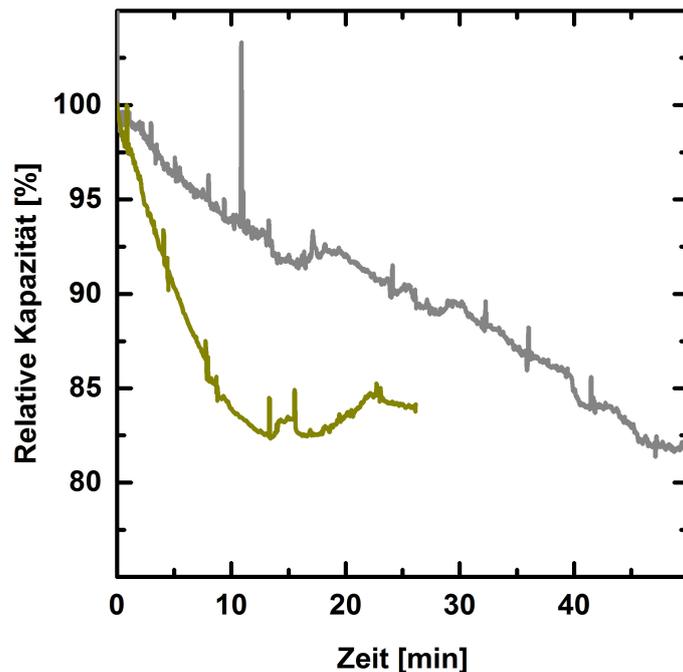


Abbildung 5.14
Kapazitätsänderung freistehender DOPC:SM:Chol-Membranen durch VapA bei pH 5,5. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der durch den Ausgangswert dividierten Kapazität zweier Messungen (grau und ocker). Zum Zeitpunkt 0 Minuten wurden 5 $\mu\text{g/ml}$ VapA (Endkonzentration) injiziert. Die Messungen erfolgten bei 37 °C in 150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 5,5. Für die Kapazitätsbestimmung kam die Spannungssprungmethode zum Einsatz. Die Daten wurden über ein Fenster von 20 Datenpunkten mit einem gleitenden Durchschnitt geglättet.

Im Fall einer qualitativen Beschreibung der anhand einer Strommessung beobachteten Effekte muss selbstverständlich berücksichtigt werden, dass die Amplitude von Ereignissen durch unterschiedliche angelegte Spannungen modifiziert wird. Der in Teilabbildungen aufgetragene Größenparameter enthält bereits die korrekte Gewichtung mit der angelegten Spannung.

5.6.1 Einfluss von VapA auf die Kapazität freistehender Membranen

Der Einfluss von VapA auf die Kapazität freistehender DOPC:SM:Chol Membranen ist in Abbildung 5.14 anhand zwei unabhängiger Messungen beim pH-Wert 5,5 gezeigt.

Direkt nach der Injektion von VapA begann ein Absinken des Kapazitätswerts. Während die Rate der Kapazitätsabnahme zwischen den Messungen variierte, befindet sich das Minimum der Kurve in beiden gezeigten Fällen zwischen 80% und 85% des Ausgangswerts. Auch ein anschließender, leichter Anstieg der Membrankapazität konnte in einem Fall beobachtet werden.

5.6.2 Permeabilisierung freistehender Membranen durch VapA

Für die Charakterisierung der Membranpermeabilisierung durch VapA wird zunächst auf den Effekt beim pH-Wert 5,5 eingegangen. Dieser ist geeignet, sowohl den intermediären Zustand reifender Phagosomen darzustellen, bei welchem die Expression von VapA nach oben reguliert wird (siehe Abschnitt 3.6), als auch den quasistationären Zustand der REV (siehe Abschnitt 3.5). Häufig bei Strommessungen an DOPC:SM:Chol-Membranen beobachtete Effekte sind anhand einer repräsentativen Messung in Abbildung 5.15 dargestellt.

Über den Zeitraum der Messung wurde die an die Membran angelegte Spannung schrittweise von 0 mV bis 120 mV erhöht. Während der ersten Phase der Messung ist wenig bis keine Aktivität von VapA zu verzeichnen. Vereinzelt auftretende Unregelmäßigkeiten

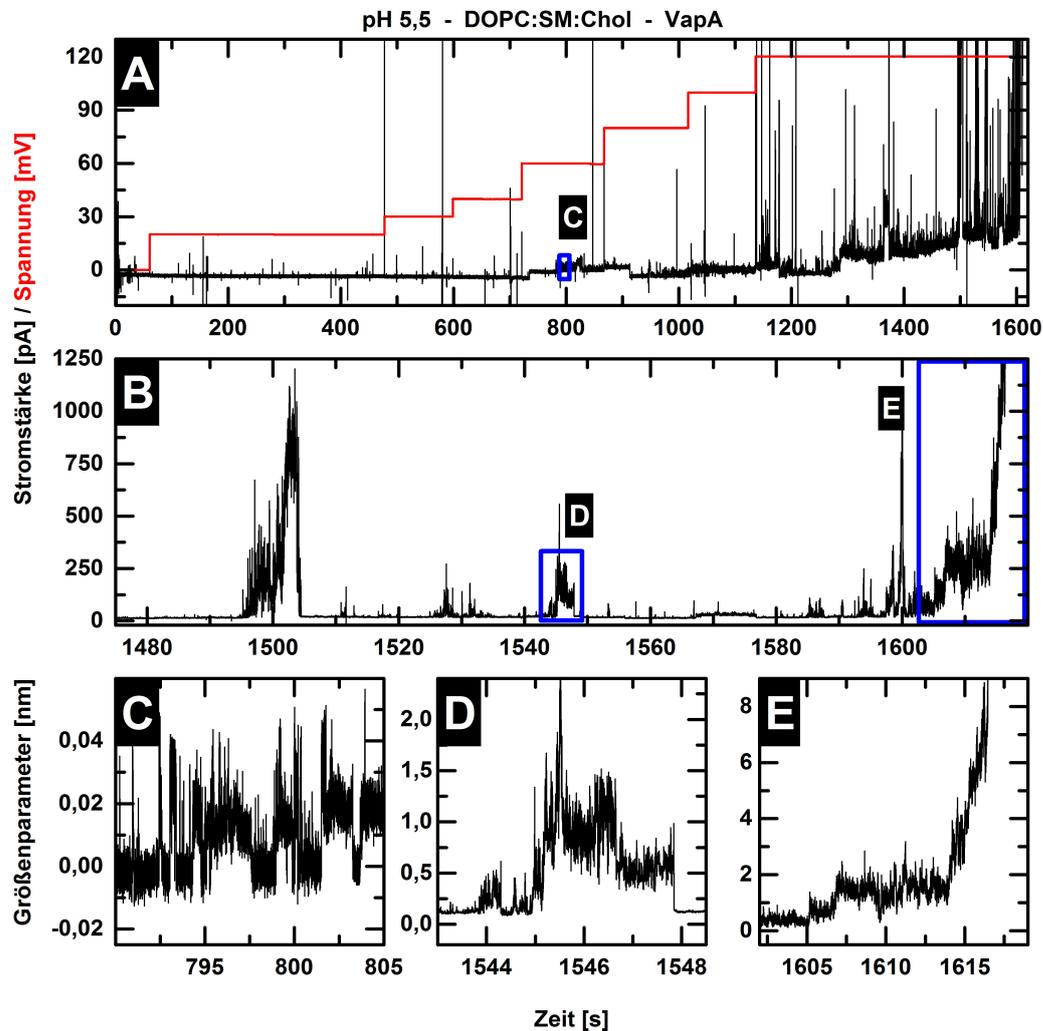


Abbildung 5.15

Permeabilisierung einer DOPC:SM:Chol-Membran durch VapA beim pH-Wert 5,5. Aufgetragen sind Stromstärke (schwarz) und angelegte Spannung (rot) für eine Übersicht des Messverlaufs (A) beziehungsweise eine vergrößerte Ansicht (B). Für die Detailansichten (C-E) wurde der Größenparameter gegen die Zeit aufgetragen. Blaue Rechtecke kennzeichnen die als Detailansichten vergrößerten Ausschnitte. Zum Zeitpunkt 0 s wurde VapA bis zu einer Endkonzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ injiziert. Die Messung erfolgte in 150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 5,5 bei 37°C .

des Stromverlaufs können nicht eindeutig auf den Einfluss von VapA zurückgeführt werden, da durch äußere Einflüsse, beispielsweise Vibrationen, verursachte Messartefakte nicht ausgeschlossen werden können. Ebenso sind die gelegentlich auftretenden Ausreißer des Stromsignals in positive oder negative Richtung durch Artefakte des Messsystems zu erklären, welche in allen Messungen beobachtet werden. Gelegentlich führen beispielsweise die Schaltvorgänge der Temperierung zu solchen Stromspitzen.

Weniger als 15 s nach dem Umschalten auf 60 mV (735 s nach VapA-Injektion) kam es zu einem in verschiedenen Messungen beobachteten Phänomen. Das Grundniveau des Stromsignals stieg abrupt um mehrere Picoampere an und blieb anschließend auf dem erhöhten Wert. Dieser Effekt unterscheidet sich aufgrund des abrupten Stromanstiegs und der langen Lebensdauer grundlegend von den im Folgenden beschriebenen unterschiedlich gearteten Membranpermeabilisierungen. Aufgrund der langen Lebensdauer der Stromerhöhung kann in diesem Fall von einer „teilpermanenten Läsion“ gesprochen werden - erst nach fast 200 s kehrt das Stromsignal wieder auf ein niedrigeres Niveau zurück. In anderen Fällen ist diese Art der Permeabilisierung auch permanent.

Eine weitere, anders geartete Ausprägung der Aktivität von VapA, welche noch während der Lebensdauer der stabilen Permeabilisierung auftrat, ist in Abbildung 5.15C gezeigt. Es traten fluktuierende Stromsprünge zwischen zwei oder mehr verschiedenen Stromniveaus auf. Diese können als offene beziehungsweise geschlossene Zustände mehr oder weniger definierter, transientser Läsionen oder Poren aufgefasst werden. Dabei kam es teilweise vor, dass sich nach kurzer Zeit das höhere Stromniveau stabilisierte, was auch in dem in Abbildung 5.15C gezeigten Beispiel der Fall war. Die Lebensdauern in den verschiedenen Zuständen variieren zwischen Bruchteilen einer Sekunde bis zu mehreren Sekunden. Dabei sollte betont werden, dass Größenordnung und Verteilung der Lebensdauern dieser „definiert-transienten Läsionen“ innerhalb eines begrenzten Zeitintervalls sich stark von denen in anderen Zeiträumen unterscheiden können. Die Nahordnung der Kinetiken ist also größer als deren Fernordnung. Gleiches gilt auch für die Amplitude der Stromfluktuationen, welche mit der Porengröße korreliert werden kann. Letztere wird in Abschnitt 5.6.6 gesondert behandelt.

Neben den definiert-transienten Läsionen kam es zu undefinierten Stromfluktuationen, welche in unterschiedlichen Intensitäten auftraten. Teilweise lagen die Amplituden in der Größenordnung der definierten Poren, teilweise gingen sie weit darüber hinaus, wie aus Abbildung 5.15B ersichtlich ist. Diese „undefiniert-heterogenen Läsionen“ konnten sich teilweise zu höheren Amplituden aufschaukeln, ersichtlich an den Läsionen bei 1500 s und 1610 s. Eine spezielle Eigenschaft ist außerdem, dass sich die Läsionen anschließend wieder schließen können, der Strom also wieder auf das Ausgangsniveau abfällt (siehe Abbildung 5.15D). Dieser Schließvorgang kann ein Indiz für ein kollektives Verhalten von VapA bei den betreffenden Läsionen sein. Eine sich aufschaukelnde, undefinierte Läsion führte in den meisten Fällen schließlich zum Zusammenbruch der Membran und beendete damit die Strommessung (siehe Abbildung 5.15E). Wie auch die definiert-transienten Läsionen traten die undefiniert-heterogenen Läsionen nach einer Inkubationszeit in nahezu jeder Strommessung mit VapA auf. Sowohl fortschreitende Zeit als auch höhere angelegte Spannungen führten dabei zu einer Intensivierung der Permeabilisierungsereignisse.

Der in den Detailansichten (Abbildung 5.15C-E) aufgetragene Größenparameter stellt einen Vergleichswert zwischen unterschiedlichen Permeabilisierungsereignissen mit der Einheit eines Porenradius dar, welcher ohne nennenswerte Annahmen über die Porengeometrie auskommt. Als Absolutwert entspricht er der momentanen (zeitabhängigen) Gesamtper-

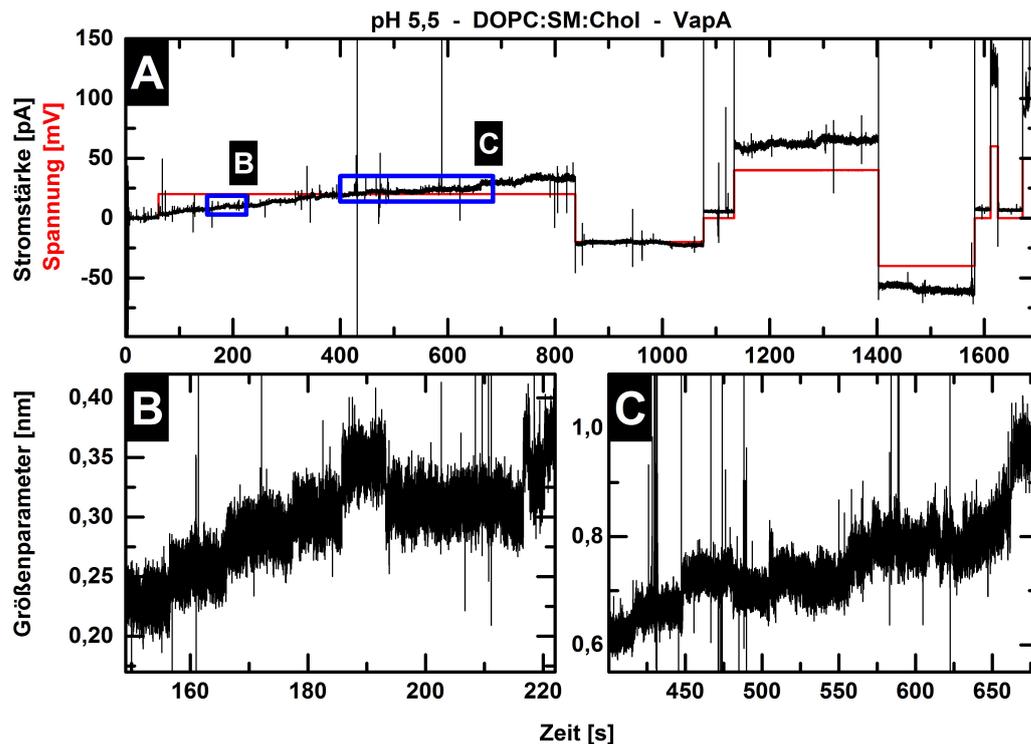


Abbildung 5.16

Stufenförmige Permeabilisierung einer DOPC:SM:Chol-Membran durch VapA beim pH-Wert 5,5. Aufgetragen sind Stromstärke (schwarz) und angelegte Spannung (rot) für eine Übersicht des Messverlaufs (A). Für die Detailansichten (B, C) wurde der Größenparameter gegen die Zeit aufgetragen. Blaue Rechtecke kennzeichnen die als Detailansichten vergrößerten Ausschnitte. Zum Zeitpunkt 0 s wurde VapA bis zu einer Endkonzentration von $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ injiziert. Die Messung erfolgte in 150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 5,5 bei 37°C .

meabilisierung der Membran. Es ist ersichtlich, dass die Werte der undefiniert-heterogenen Läsionen um eine Größenordnung größer sein können als die der definiert-transienten Läsionen.

Zum Zeitpunkt 1605 s (Abbildung 5.15E) trat eine stufenförmige Permeabilisierung auf. Diese kann von den oben beschriebenen definierten Läsionen unterschieden werden, da sie weniger transient ist, was auf eine offensichtlich langsamere oder trägere Kinetik zurückzuführen sein kann. Diese Form der Permeabilisierung trat ebenfalls in vielen Messungen auf, in einigen Zeitabschnitten überwog sie auch die bisher beschriebenen Ereignisse - Abbildung 5.16 zeigt ein Beispiel für einen solchen Messverlauf.

In diesem Fall begann die Permeabilisierung der Membran direkt nach dem Anlegen einer Spannung von 20 mV in Form von teilweise mehr, teilweise weniger klar definierten stufenförmigen Stromanstiegen. Diese können als Öffnungsvorgänge stabilerer Läsionen betrachtet werden. Wie an den Vergrößerungen dieses Effekts in Abbildung 5.16B und C ersichtlich ist, kam es zudem vereinzelt zu entgegengerichteten Ereignissen, also dem Schließen einer Läsion, wobei die Öffnungsvorgänge allerdings deutlich überwogen. Diese „stufenförmig-stabilen Läsionen“ traten in unterschiedlichen Größen auf, wobei sie häufig in der Größenordnung der definiert-transienten Läsionen lagen. Ob die stufenförmig-stabilen Läsionen auf den gleichen Mechanismus zurückzuführen sind wie der eingangs beschriebene

Effekt der teilpermanenten Läsionen, kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden.

Insgesamt lässt sich die Permeabilisierung von VapA also in vier verschiedene Effekte einteilen, welchen möglicherweise unterschiedliche molekulare Mechanismen zugrundeliegen. Definiert-transiente Poren können von undefiniert-heterogenen Läsionen klar unterschieden werden. Eine zusätzliche Ausprägung der definierten Poren sind die weniger transienten, stufenförmig-stabilen Läsionen. Schließlich stellen die teilpermanenten Läsionen einen weiteren, wenig transienten und stark definierten Effekt dar.

5.6.3 Permeabilisierung freistehender Membranen durch VapA bei verschiedenen pH-Werten

Neben dem pH-Wert 5,5 wurde die Permeabilisierung durch VapA sowohl bei pH 6,5 als auch bei pH 4,5 untersucht. Eine Messung beim pH-Wert 6,5, der einem frühen Stadium der Phagosomenreifung entspricht, ist in Abbildung 5.17 dargestellt.

In der ersten Hälfte dieser Messung traten vereinzelt stufenförmig-stabile Läsionen auf, zusätzlich kam es zu undefinierten Ausschlägen sowohl in positiver als auch in negativer Richtung und einer anschließenden Annäherung an das ursprüngliche Niveau. Diese undefinierten Ausschläge sind als durch Störeinflüsse verursachte Artefakte anzusehen, da sie in der beschriebenen Form ausschließlich in dieser Messung auftraten. Im weiteren Verlauf der Messung traten vermehrt stufenförmig-stabile Läsionen sowie undefiniert-heterogene Läsionen auf. Abbildung 5.17C zeigt eine Kombination aus stufenförmiger und undefinierter Permeabilisierung, in Abbildung 5.17D ist eine komplett undefinierte Läsion zu sehen. 660 s nach der Injektion von VapA kam es zu einem abrupten Anstieg des Stromniveaus, verbunden mit einer starken Zunahme undefinierter Stromfluktuationen. Wie bei pH 5,5 kommt es auch in diesem Fall zu einer sich aufschaukelnden undefinierten Permeabilisierung, die zum Zusammenbruch der Membran führt.

Die bei pH 5,5 beobachteten typischen, definiert-transienten Läsionen konnten beim pH-Wert 6,5 in diesem System wesentlich seltener und nur in Ansätzen beobachtet werden. Die Veränderungen des Größenparameters entsprechen den kleineren beim pH-Wert 5,5 auftretenden Läsionen. Obwohl zum Ende der Messung ein Anstieg der Größenparameter zu verzeichnen ist, erreichen die Läsionen insgesamt nicht dieselbe Intensität wie bei niedrigerem pH-Wert.

Ein anderes Bild ergab sich bei einem verringerten pH-Wert von 4,5, wie aus der exemplarisch in Abbildung 5.18 aufgezeigten Messung hervorgeht. Bereits 100 s nach dem Anlegen einer Spannung von 20 mV an die Membran traten die ersten undefiniert-heterogenen Läsionen auf, kurz darauf zudem definiert-transiente Läsionen (Abbildung 5.18D). Die Aktivität nahm im weiteren Verlauf zu, bis es etwa 800 s nach VapA-Zugabe bei 60 mV zu einem sprunghaften Anstieg des Stromniveaus, verbunden mit einer massiven Stromfluktuation, kam (siehe Abbildung 5.18B). Diese bestand sowohl aus definierten Fluktuationen zwischen zwei oder mehr Stromniveaus mit einer schnellen Kinetik, also definiert-transienten Läsionen, als auch aus undefiniert-heterogenen Läsionen. Erst nachdem die Spannung für etwa 300 s auf 20 mV reduziert war, reduzierte sich die Stromstärke der Fluktuationen wieder (1680 s nach Injektion). Nach einer Erhöhung der Spannung auf 40 mV stellten sich zunächst stärkere undefiniert-heterogene Läsionen ein und nach weiteren 150 s (1890 s nach Injektion) kam es erneut zu einem sprunghaften Anstieg von Stromniveau und Fluktuationen (Abbildung 5.18C und F). Zum Ende der Messung überwogen dann mehr und mehr die undefiniert-heterogenen Läsionen, welche

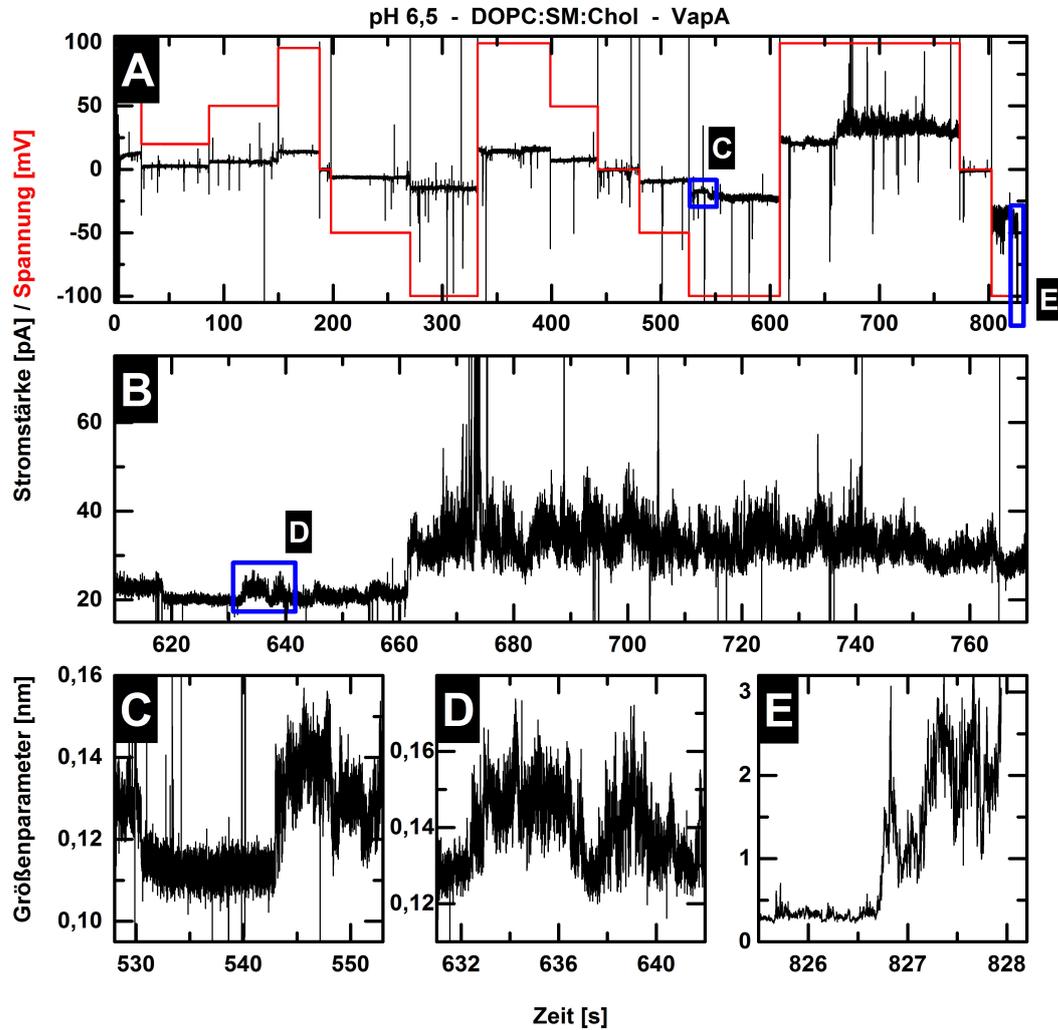


Abbildung 5.17

Permeabilisierung einer DOPC:SM:Chol-Membran durch VapA beim pH-Wert 6,5. Aufgetragen sind Stromstärke (schwarz) und angelegte Spannung (rot) für eine Übersicht des Messverlaufs (A) beziehungsweise eine vergrößerte Ansicht (B). Für die Detailansichten (C-E) wurde der Größenparameter gegen die Zeit aufgetragen. Blaue Rechtecke kennzeichnen die als Detailansichten vergrößerten Ausschnitte. Zum Zeitpunkt 0 s wurde VapA bis zu einer Endkonzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ injiziert. Die Messung erfolgte in 150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 6,5 bei 37°C .

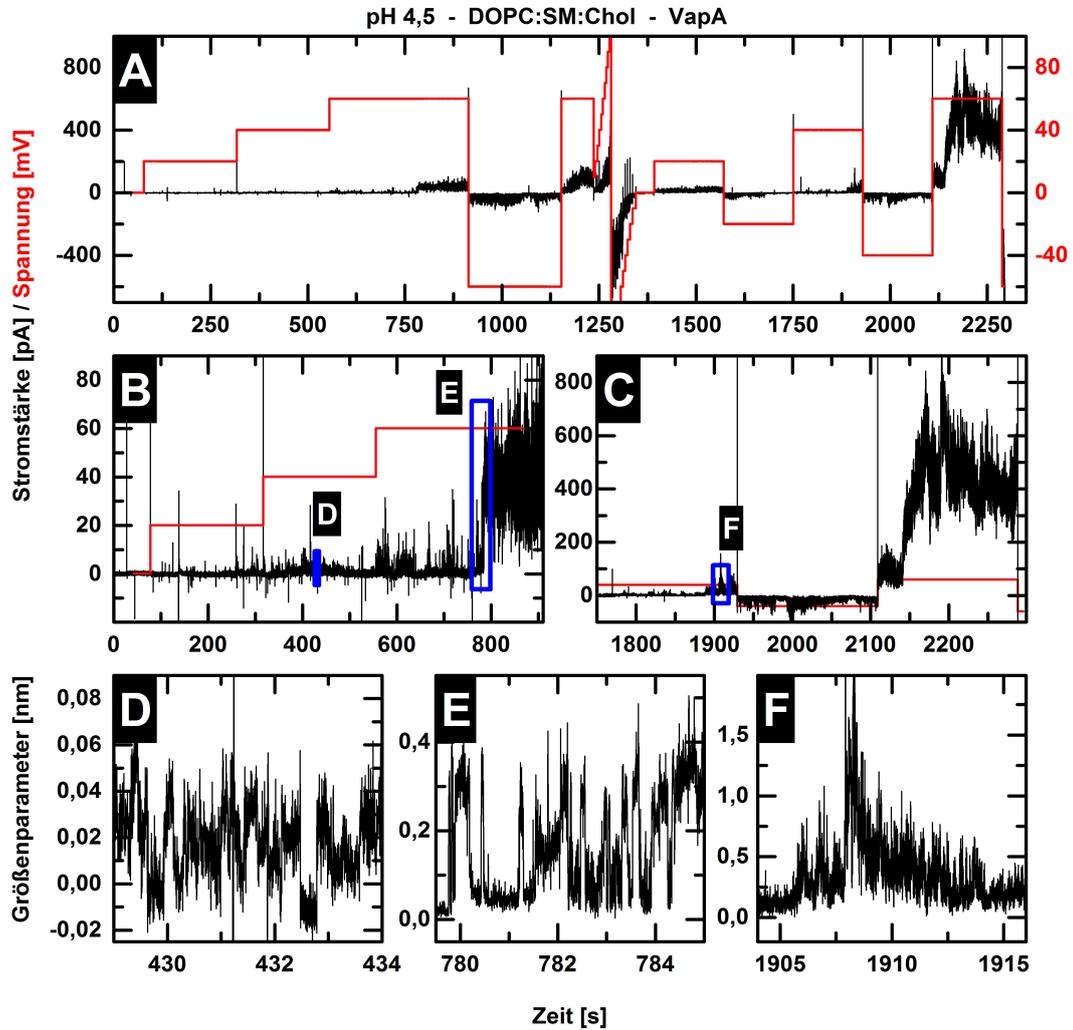


Abbildung 5.18

Permeabilisierung einer DOPC:SM:Chol-Membran durch VapA beim pH-Wert 4,5. Aufgetragen sind Stromstärke (schwarz) und angelegte Spannung (rot) für eine Übersicht des Messverlaufs (A) beziehungsweise zwei vergrößerte Ansichten (B, C). Für die Detailansichten (D-F) wurde der Größenparameter gegen die Zeit aufgetragen. Blaue Rechtecke kennzeichnen die als Detailansichten vergrößerten Ausschnitte. Zum Zeitpunkt 0 s wurde VapA bis zu einer Endkonzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ injiziert. Die Messung erfolgte in 150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 4,5 bei 37°C .

sich schließlich bei 60 mV angelegter Spannung aufschaukelten und zum Zusammenbruch der Membran führten.

An den Größenparametern lässt sich ablesen, dass die definiert-transienten Läsionen bei pH 4,5 durchaus größere Durchmesser erreichen können als bei pH 5,5. Im Gegensatz zu den Messungen bei pH 5,5 und besonders bei pH 6,5 wurden also durch VapA stärkere undefinierte und definierte Läsionen verursacht. Die Kinetiken der Fluktuationen der definierten Läsionen waren bei pH 4,5 schneller als bei pH 5,5, während bei pH 6,5 keine derartigen Läsionen beobachtet wurden.

Zu einem durch die Aktivität von VapA verursachten Zusammenbruch der Membran kam es in allen Fällen, wobei bezüglich der Lebensdauern der Membranen nach VapA-Injektion keine Tendenz erkennbar ist.

Bei einer Betragsänderung der angelegten Spannung, beispielsweise in Abbildung 5.18 ersichtlich, lässt sich anhand des Größenparameters beziehungsweise der Leitfähigkeit beurteilen, ob die Läsionen ein asymmetrisches Verhalten aufweisen. Dies wäre ein Hinweis auf eine asymmetrische Porengeometrie, beispielsweise eine Trichterform. In den meisten Fällen, so auch in der in Abbildung 5.18 gezeigten Messung, war eine symmetrische Charakteristik gegeben - der Größenparameter entsprach also vor dem Vorzeichenwechsel exakt dem Niveau nach dem Vorzeichenwechsel. Lediglich in Ausnahmefällen traten kleine Diskrepanzen zwischen den Werten auf, was sich allerdings nicht auf einen bestimmten pH-Wert oder eine andere Bedingung zurückführen ließ. Daher ist es wahrscheinlicher, dass die abrupte Spannungsänderung als solche in einigen Fällen einen zusätzlichen Einfluss auf die Leitfähigkeit der Membran nehmen kann, beispielsweise durch die Induzierung des Öffnens oder Schließens einer stabileren Läsion.

5.6.4 Permeabilisierung freistehender Membranen durch VapA p12

Die auf ein 12 kDa großes Fragment des Ursprungsproteins prozessierte Variante VapA p12 wurde hinsichtlich ihrer permeabilisierenden Aktivität mit VapA verglichen. Die Ergebnisse werden anhand von zwei exemplarischen Messungen bei pH 6,5 beziehungsweise pH 5,5 erläutert, welche in den Abbildungen 5.19 beziehungsweise 5.20 dargestellt sind.

Bei pH 6,5 kam es bei VapA p12, wie auch bei VapA, zu keinen nennenswerten definiert-transienten Porenbildungen. In der dargestellten Messung betrug die angelegte Spannung 20 mV beziehungsweise 40 mV. Mehrere stufenförmig-stabile Läsionen, welche in den meisten Fällen stabil blieben, sind über den Verlauf der Messung zu erkennen (siehe Abbildung 5.19B). Zudem traten undefiniert-heterogene Läsionen auf (Abbildung 5.19C), bei 40 mV mit einer deutlich höheren Prävalenz als bei niedrigerer Spannung. Bezüglich des Größenparameters lässt sich kein nennenswerter Unterschied zu den Messungen mit VapA bei pH 6,5 feststellen.

Auch die Aktivität bei pH 5,5 war im Fall von VapA p12 vergleichbar mit den für VapA angestellten Beobachtungen. In der in Abbildung 5.20 gezeigten Messung wurden Spannungen zwischen 10 mV und 100 mV an die Membran angelegt. Bereits bei 20 mV kam es 235 s nach VapA p12-Injektion zu einer teilpermanenten Läsion und anschließenden undefiniert-heterogenen Läsionen. Bei 50 mV (Abbildung 5.20B) traten definiert-transiente Läsionen auf (Abbildung 5.20D) sowie undefiniert-heterogene Läsionen und stufenförmig-stabile Läsionen.

In der zweiten Hälfte der Messung, bei 100 mV beziehungsweise -100 mV, zeigten sich wiederum definiert-transiente und undefiniert-heterogene Läsionen entsprechend höherer

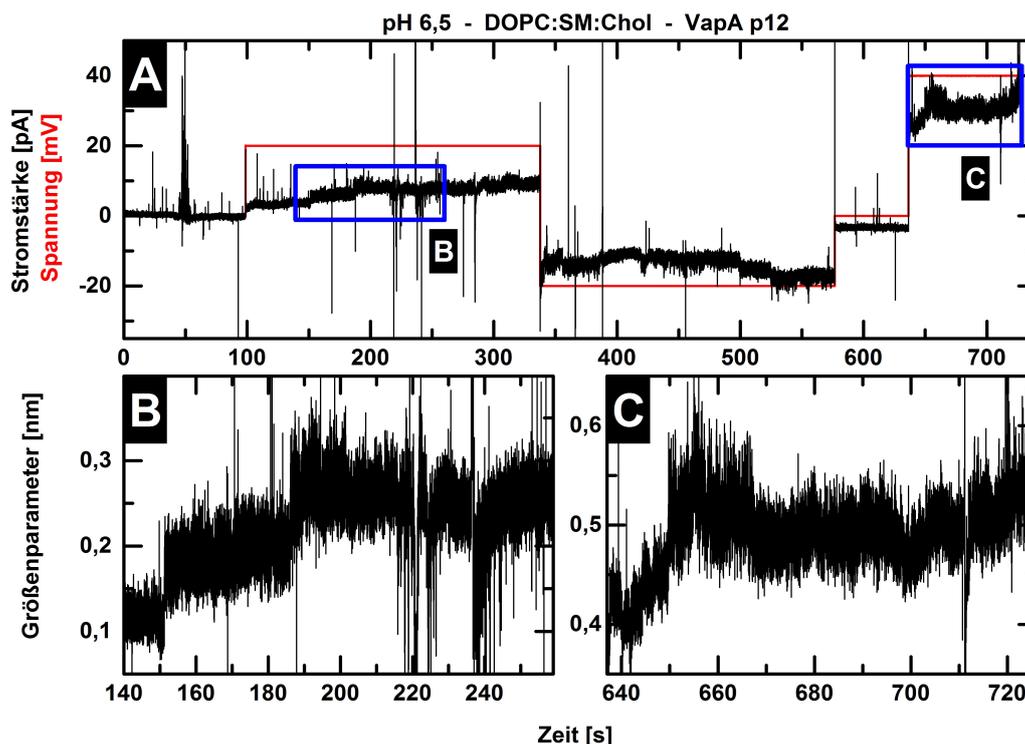


Abbildung 5.19

Permeabilisierung einer DOPC:SM:Chol-Membran durch VapA p12 beim pH-Wert 6,5. Aufgetragen sind Stromstärke (schwarz) und angelegte Spannung (rot) für eine Übersicht des Messverlaufs (A). Für die Detailansichten (B, C) wurde der Größenparameter gegen die Zeit aufgetragen. Blaue Rechtecke kennzeichnen die als Detailansichten vergrößerten Ausschnitte. Zum Zeitpunkt 0 s wurde VapA p12 bis zu einer Endkonzentration von $4,2 \mu\text{g}/\text{ml}$ injiziert. Die Messung erfolgte in 150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 6,5 bei 37°C .

Amplitude (Abbildung 5.20C, E, F). Nach dem Vorzeichenwechsel der Spannung 1013 s nach der Injektion von VapA p12 dominierten die undefinierten Permeabilisierungen, es kam allerdings nicht zu dem häufig beobachteten Aufschaukeln zu höheren Amplituden. Wieder war die Nahordnung von Amplitude und Lebensdauer der definiert-transienten Läsionen größer als deren Fernordnung, was auf eine heterogene Natur der Permeabilisierungen schließen lässt.

Insgesamt konnten in diesem System somit keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Effekten von VapA und VapA p12 festgestellt werden.

5.6.5 Permeabilisierung freistehender Membranen durch VapB

Das zu VapA strukturell ähnliche Protein VapB, welches in für Schweine virulenten *R. equi* Stämmen auftritt, wurde als weiteres Vergleichsprotein zu VapA auf seine Permeabilisierungsaktivität hin untersucht. Wie für VapA p12 werden Unterschiede und Gemeinsamkeiten an jeweils einer repräsentativen Messung beim pH-Wert 6,5 (Abbildung 5.21) und 5,5 (Abbildung 5.22) diskutiert.

Im Unterschied zu VapA und VapA p12 führte VapB bereits bei einem pH-Wert von 6,5 zu definiert-transienten Läsionen, und zwar schon 120 s nach der Injektion, wie Abbildung

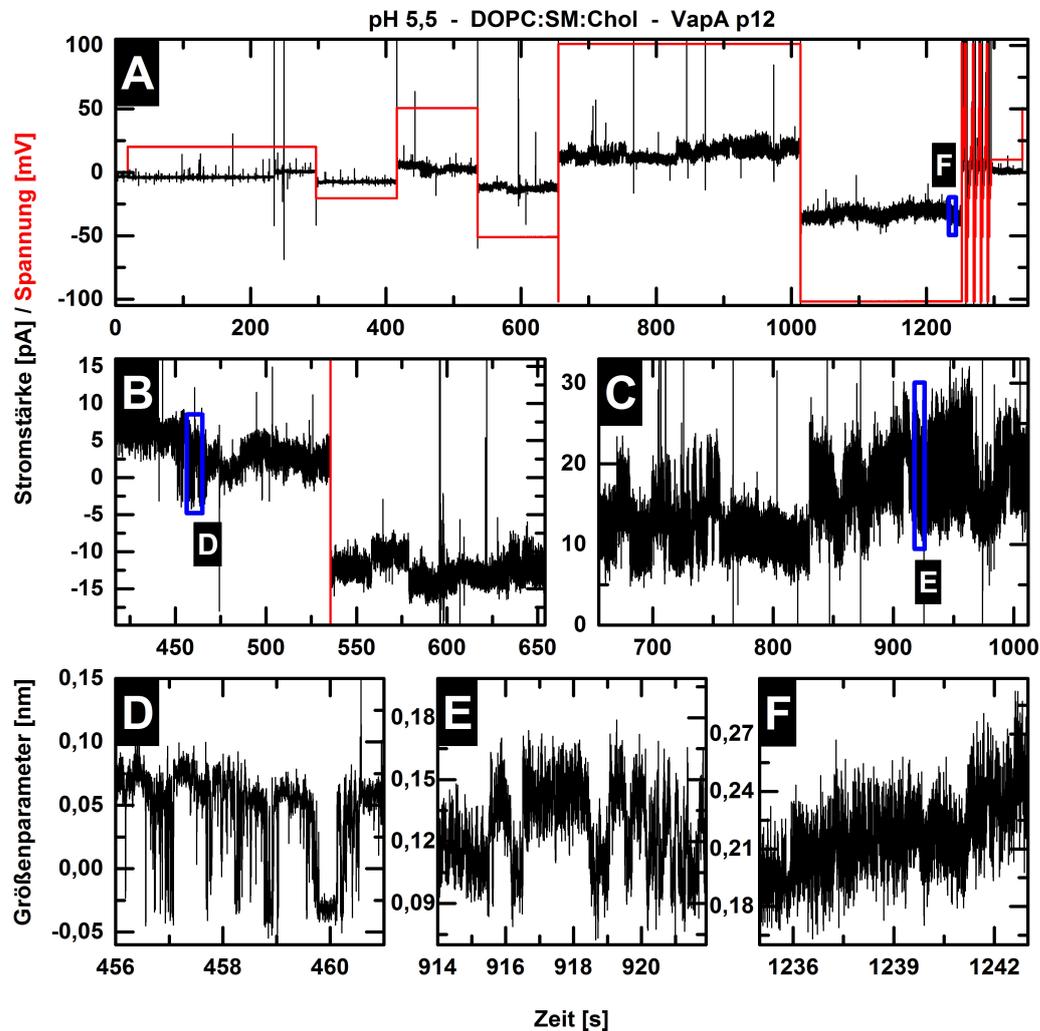


Abbildung 5.20

Permeabilisierung einer DOPC:SM:Chol-Membran durch VapA p12 beim pH-Wert 5,5. Aufgetragen sind Stromstärke (schwarz) und angelegte Spannung (rot) für eine Übersicht des Messverlaufs (A) beziehungsweise zwei vergrößerte Ansichten (B, C). Für die Detailansichten (D-F) wurde der Größenparameter gegen die Zeit aufgetragen. Blaue Rechtecke kennzeichnen die als Detailansichten vergrößerten Ausschnitte. Zum Zeitpunkt 0 s wurde VapA p12 bis zu einer Endkonzentration von $4,2 \mu\text{g}/\text{ml}$ injiziert. Die Messung erfolgte in 150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 5,5 bei 37°C .

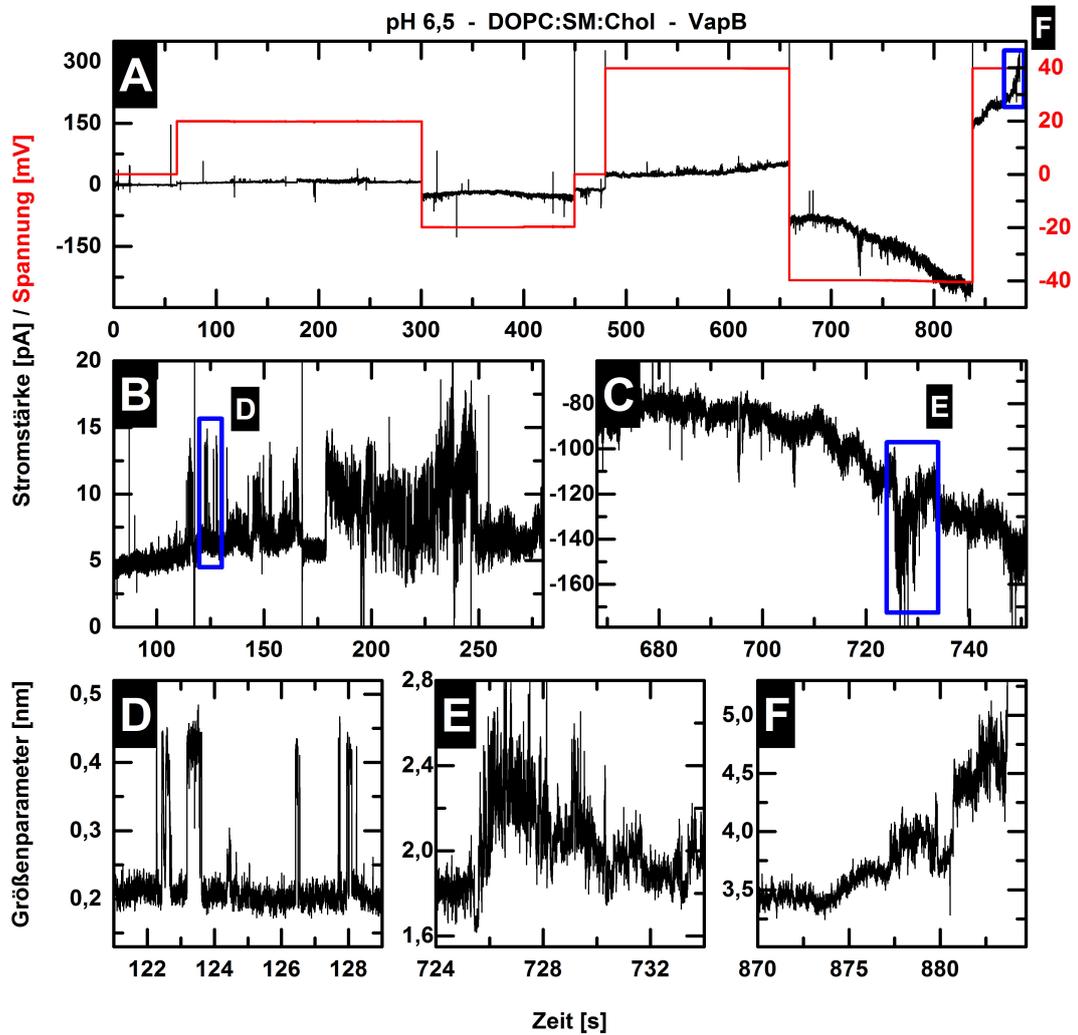


Abbildung 5.21

Permeabilisierung einer DOPC:SM:Chol-Membran durch VapB beim pH-Wert 6,5. Aufgetragen sind Stromstärke (schwarz) und angelegte Spannung (rot) für eine Übersicht des Messverlaufs (A) beziehungsweise zwei vergrößerte Ansichten (B, C). Für die Detailansichten (D-F) wurde der Größenparameter gegen die Zeit aufgetragen. Blaue Rechtecke kennzeichnen die als Detailansichten vergrößerten Ausschnitte. Zum Zeitpunkt 0 s wurde VapB bis zu einer Endkonzentration von $6,7 \mu\text{g/ml}$ injiziert. Die Messung erfolgte in 150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 6,5 bei 37°C .

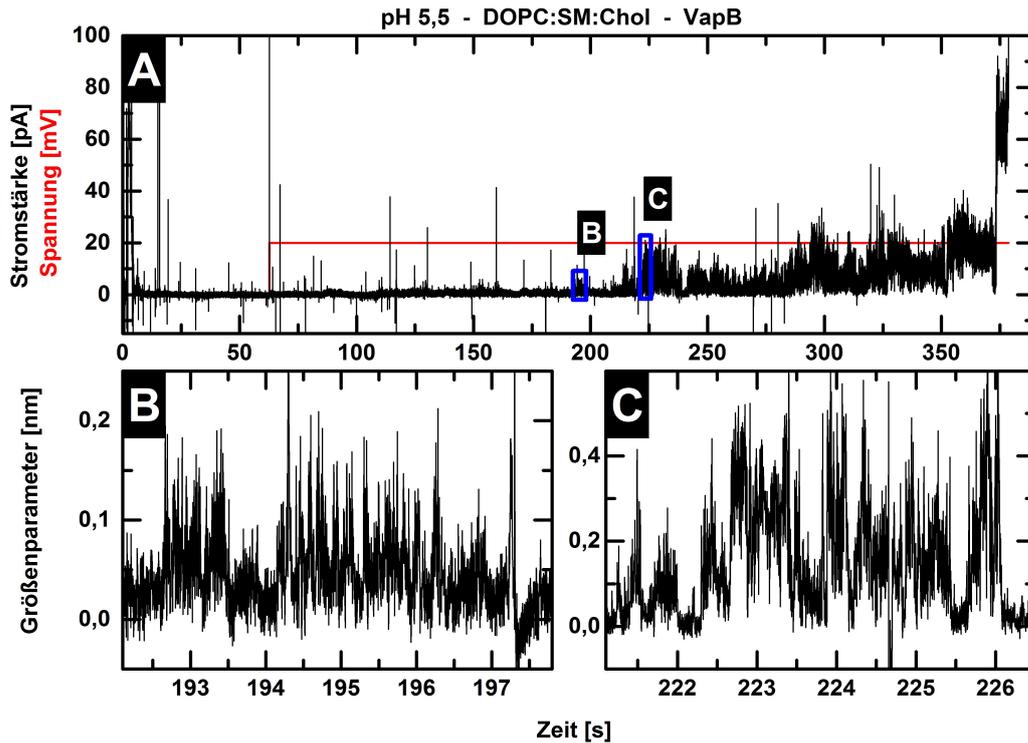


Abbildung 5.22

Permeabilisierung einer DOPC:SM:Chol-Membran durch VapB beim pH-Wert 5,5. Aufgetragen sind Stromstärke (schwarz) und angelegte Spannung (rot) für eine Übersicht des Messverlaufs (A). Für die Detailansichten (B, C) wurde der Größenparameter gegen die Zeit aufgetragen. Blaue Rechtecke kennzeichnen die als Detailansichten vergrößerten Ausschnitte. Zum Zeitpunkt 0 s wurde VapB bis zu einer Endkonzentration von $6,7 \mu\text{g}/\text{ml}$ injiziert. Die Messung erfolgte in 150 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 5,5 bei 37°C .

5.21D zeigt. Daneben kam es in großer Dichte zu undefiniert-heterogenen Läsionen, die in der zweiten Hälfte der Messung beziehungsweise nach Erhöhung der angelegten Spannung auf 40 mV das Niveau des Stromsignals sukzessiv erhöhten. Dies führte letztendlich zu einem Zusammenbruch der Membran.

Bei einem pH-Wert von 5,5 dagegen genügte eine Spannung von 20 mV, um massive Stromfluktuationen in Form definiert-transienter und undefiniert-heterogener Läsionen zu induzieren (Abbildung 5.22B, C). Im Anschluss an eine intensive teilpermanente Läsion kam es zum Zusammenbruch der Membran.

Der Größenparameter impliziert einen etwas größeren Porendurchmesser der Einzelereignisse bei Injektion von VapB. In anderen Messungen kam es auch zu stufenförmig-stabilen Läsionen, sodass insgesamt die Natur der Permeabilisierungen nicht von der Aktivität von VapA und VapA p12 zu unterscheiden war.

VapB zeigte somit in den Experimenten im Unterschied zu den zuvor untersuchten Proteinen schon beim höheren pH-Wert 6,5 definiert-transiente Läsionen.

5.6.6 Porendurchmesser definierter Läsionen

Aus den Stromspuren der gezeigten Experimente wurden an verschiedenen Positionen die Porendurchmesser abgeschätzt. Das Verfahren wird für vier Positionen von Messungen mit VapA in Abbildung 5.23 demonstriert.

Die über Häufigkeitshistogramme konkretisierten, diskreten Stromniveaus definierter Läsionen wurden mit Gauss-Normalverteilungen angefitet und die so ermittelten Erwartungswerte mit Hilfe von Formel 4.13 zur Ermittlung des entsprechenden Einzelporendurchmessers verwendet. Voraussetzung für die richtige Interpretation der Werte ist, dass es sich in allen Fällen um einzelne Permeabilisierungsereignisse handelt, was nicht das kollektive Zusammenwirken mehrerer Proteine an derselben Läsion ausschließt. Die Einschränkungen, denen die auf Formel 4.13 gestützte Berechnung unterworfen ist, wurden in Abschnitt 4.10.1 erläutert.

Die in Abbildung 5.23A analysierte Position stammt aus Abbildung 5.15C, einer Messung bei pH 5,5. Es sind Fluktuationen zwischen insgesamt drei verschiedenen diskreten Stromniveaus zu erkennen, bei dem niedrigsten handelt es sich um das ursprüngliche Grundniveau. Über den abgebildeten Zeitausschnitt verschiebt sich die Prävalenz vom niedrigen zum mittleren Stromniveau, während das hohe Niveau einen sehr geringen Anteil an der Gesamthäufigkeit der Zustände ausmacht und mit kürzerer Lebensdauer auftritt. Die resultierenden Differenzen zwischen den Erwartungswerten betragen 1,33 pA und 1,45 pA, was theoretischen Porendurchmessern von 0,33 nm beziehungsweise 0,35 nm entspricht.

Das folgende Beispiel in Abbildung 5.23B enthält eine drei verschiedene diskrete Stromniveaus umfassende, stufenförmige Permeabilisierung, ebenfalls bei pH 5,5. Es ergeben sich Stromdifferenzen von 1,35 pA und 1,9 pA und entsprechende Porendurchmesser von 0,58 nm beziehungsweise 0,69 nm. Für Abbildung 5.23C resultieren (bei pH 4,5) Porendurchmesser von 0,82 nm und 1,12 nm; für Abbildung 5.23 (bei pH 6,5) betrug der Wert 0,34 nm.

Für die Messungen mit VapA wurden Durchmesser definiert-transienter und stufenförmig-stabiler Läsionen für alle drei pH-Werte ermittelt, für VapA p12 und VapB lediglich für pH 5,5, und in Abbildung 5.24A als Boxplot-Diagramm dargestellt⁶. Die undefiniert-heterogenen Läsionen sowie die teilpermanenten Läsionen wurden in diese Auswertung nicht eingeschlossen⁷. Es ist eine klare Tendenz erkennbar, dass die Porengröße für VapA mit niedrigerem pH-Wert ansteigt. Während beim pH-Wert 6,5 die Durchmesser in einem schmalen Größenbereich liegen, ist die Streuung bei pH 5,5 und 4,5 größer. Insbesondere bei pH 5,5 treten Ausreißer in positiver Richtung auf.

Im Fall von VapA p12 lagen Mittelwert und Median etwas niedriger als bei VapA bei dem entsprechenden pH-Wert. Die Streuung war insgesamt geringer, die kleinere Ausdehnung der Box kann aber durch die niedrigere Anzahl der einbezogenen ermittelten Werte begründet sein. Ein wesentlicher Unterschied zwischen VapA und VapA p12 kann somit nicht festgestellt werden. Dagegen zeigt das Protein VapB etwas größere Porendurchmesser bei pH 5,5, allerdings fällt der Unterschied weniger deutlich aus als beim Vergleich zwischen

⁶Die in Abbildung 5.24A angegebenen Werte für n beziehen sich auf einzelne, wie in Abbildung 5.23 gezeigt ermittelte Porendurchmesser und sind somit nicht als Einzelereignisse, sondern als jeweils über einen gewissen endlichen Zeitraum beobachtete Läsionen zu verstehen.

⁷Da beim pH-Wert 6,5 die definiert-transienten Läsionen wesentlich seltener auftraten und weniger definiert waren als bei niedrigeren pH-Werten, haben die für die Auswertung gewählten Läsionen hier in Anteilen Charakteristika undefinierter Läsionen.

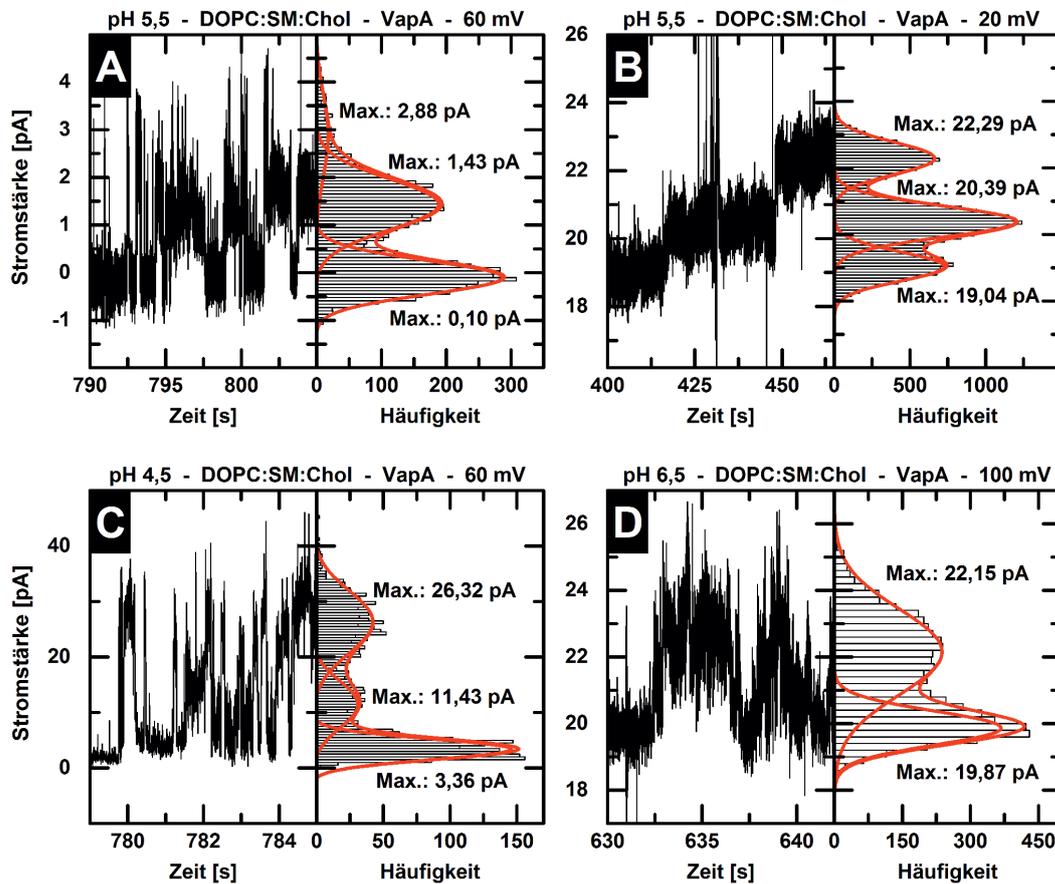


Abbildung 5.23

Bestimmung der Porengrößen beispielhafter Permeabilisierungen durch VapA. Für repräsentative Ausschnitte der Stromspuren (jeweils links) mit diskreten Stromniveaus als Indiz für definierte Porenbildung wurden die Häufigkeitsverteilungen dargestellt (jeweils rechts). Die Histogramme wurden mit mehreren Gauss-Normalverteilungen gefittet (rot), außerdem ist die kumulativ angepasste Gesamtkurve dargestellt (rot). Zu den Gaussprofilen sind die jeweiligen Erwartungswerte angegeben, deren Differenzen zur Berechnung von Einzelkanalleitfähigkeiten und Porengrößen verwendet wurden (siehe Abbildung 5.24). Die gezeigten Stromspuren finden sich wieder in Abbildung 5.15C (A), Abbildung 5.16C (B), Abbildung 5.18E (C) beziehungsweise Abbildung 5.17D (D).

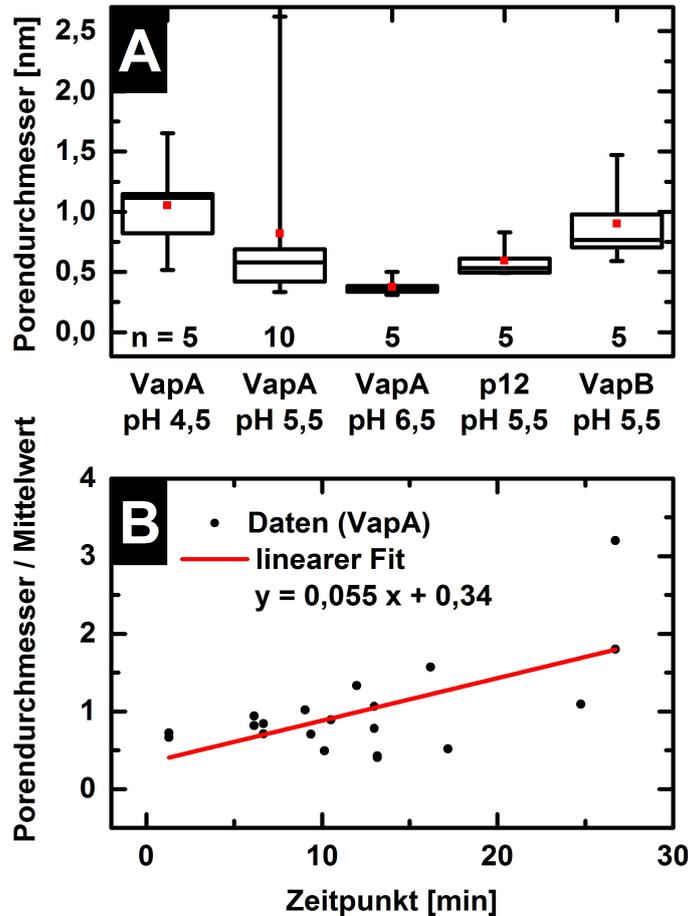


Abbildung 5.24

Vergleich der Porengrößen für VapA bei verschiedenen pH-Werten und für VapA p12 und VapB bei pH 5,5 (A) und Abhängigkeit der Porengrößen für VapA von der Inkubationszeit (B). (A) Die ermittelten Porendurchmesser wurden als Boxplot-Diagramm dargestellt. Die Boxen umfassen den Bereich von 25% bis 75%, die Fehlerbalken geben Aufschluss über Maximal- und Minimalwert. Der Median ist als Querbalken in der Box angegeben, die entsprechenden Mittelwerte als rote Quadrate. Der Wert n gibt die Anzahl der einzelnen einbezogenen mittleren Porendurchmesser an, die wie in Abbildung 5.23 veranschaulicht ermittelt wurden. (B) Aufgetragen sind die durch den entsprechenden Mittelwert dividierten Porengrößen für VapA gegen den Zeitpunkt nach der VapA-Injektion (schwarze Punkte). Die Datenpunkte wurden linear gefittet (rot).

verschiedenen pH-Werten. In allen Fällen war die Entfernung des Maximalwerts von der Box größer als die Entfernung des Minimalwerts, es gibt also eine stärkere Tendenz zu vereinzelt größeren Porendurchmessern als zu kleineren.

Durch Division der einzelnen Porendurchmesser durch den jeweiligen Gruppenmittelwert (entsprechend den roten Quadraten in Abbildung 5.24A) wurden die Werte für VapA bei den pH-Werten 6,5, 5,5 und 4,5 in eine gemeinsame Verteilung mit dem Mittelwert 1 zusammengeführt. Die Werte der drei dabei erzeugten Verteilungen wurden in Abbildung 5.24B gemeinsam gegen die zwischen VapA-Injektion und Porenereignis verstrichene Zeitspanne aufgetragen. Eine lineare Kurvenanpassung führte zu dem Zusammenhang

$$d_P^* = (0,055 \pm 0,016) \cdot t + (0,34 \pm 0,22) \quad (5.1)$$

zwischen verrechnetem Porendurchmesser d_P^* und Inkubationszeit t . Somit steigt mit zunehmender Inkubationszeit der mittlere Durchmesser der durch VapA verursachten definierten Läsionen leicht an.

Kapitel 6

Diskussion

Die primäre Funktion natürlicher Membranen ist die Abgrenzung des innen Liegenden gegen das aussen Liegende. Für die in dieser Arbeit betrachtete Thematik betrifft das einerseits das Bakterium *R. equi*, dessen „Innereien“ durch eine Membran umschlossen und dadurch zu einem lebenden Organismus vereint werden und andererseits das Phagosom, welches einen intrazellulären und durch die umgebende Membran abgeschlossenen Verdauungsapparat für unerwünschte Einzeller bildet. Wie wir in Kapitel 2 gesehen haben, gehen die Aufgaben von Membranen jedoch weit darüber hinaus. Insbesondere für die Phagosomenmembran besteht die Notwendigkeit, einen ständigen Kontakt und Austausch mit vesikulären Strukturen aufrecht zu erhalten und damit den notwendigen Austausch von Membran- und Lumenkomponenten zu gewährleisten - und andererseits sich in geeignetem Maße vor Manipulationen zu schützen.

Um die Funktionalität einer Membran beeinflussen oder ausser Kraft setzen zu können, ist es notwendig, mit der Membran zu interagieren. Dies gilt sowohl für das Wechselspiel des menschlichen Immunsystems mit Krankheitserreger umgebenden Membranen als auch für die Manipulation von humanen Membranen durch Krankheitserreger. Das Phagosom bildet diesbezüglich ein bemerkenswertes Kompartiment, schließlich kommt es hier zwischen isolierten Krankheitserregern und dem Immunsystem zu einem fokussierten Überlebenskampf.

Anhand der Ergebnisse zur Wechselwirkung von VapA mit rekonstituierten Membranen wird in diesem Kapitel ein möglicher Wirkmechanismus vorgeschlagen, welcher es VapA ermöglicht, den Prozess der Phagosomenreifung maßgeblich zu modifizieren und damit zum Überleben des Bakteriums *R. equi* im Phagosom beizutragen. Die Reihenfolge der diskutierten Ergebnisse ist an den in Abschnitt 6.5 ausformulierten Wirkmechanismus angelehnt.

Abschnitt 6.1 behandelt die Bindung des Proteins an Modellmembranen anhand der Ergebnisse der Biosensorexperimente und Kapazitätsmessungen, zusätzlich geht es um die Beeinflussung der mechanischen Membraneigenschaften. Anschließend werden die mit Fluoreszenzspektroskopie und Filmwaage gesammelten Ergebnisse zur Interkalation und einem möglichen Einfluss auf Membranfusionsereignisse in Abschnitt 6.2 diskutiert. Die Organisation der Proteine an Modellmembranen und die Beeinflussung von deren Domänenstruktur wird in Abschnitt 6.3 anhand der rasterkraftmikroskopischen Ergebnisse besprochen. Schließlich werden die elektrophysiologischen Daten zur Interpretation der Permeabilisierung von Modellmembranen in Abschnitt 6.4 herangezogen. Abgeschlossen wird die Diskussion durch eine Zusammenfassung der einzelnen Ergebnisse zu einem möglichen Wirkmechanismus von VapA an Phagosomenmembranen oder anderen für die Phagosomenreifung relevanten Membranen in Abschnitt 6.5.

6.1 Die Bindung von VapA an Modellmembranen und deren Rigidisierung

Die Voraussetzung oder der erste Schritt einer Interaktion besteht meist in der Annäherung der beiden Interaktionspartner. Es besteht allerdings die weitere Möglichkeit, dass die Wechselwirkung zwischen Protein und Membran indirekt stattfindet, also prinzipiell ohne die räumliche Nähe der Interaktionspartner auskommt [Borner et al., 1994]. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich der Fall betrachtet, dass das im Phagosom freigesetzte, bakterielle Protein VapA durch Diffusion in die Nähe der Wirtsmembran gelangt.

Die folgende Bindung eines Proteins an der Membran kann unterschiedlicher Natur sein, wie in Abbildung 6.1 veranschaulicht wird. Ein häufiger Mechanismus, welcher auch für viele AMPs beschrieben wird [Shai, 2002], ist die Bindung durch elektrostatische Wechselwirkung. Daneben werden die über Lipidmodifikationen des Proteins vermittelte Bindung, die spezifische Bindung an spezielle Membranlipide und die Bindung über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen aromatischen oder hydrophoben Aminosäureresten des Proteins und den Membranlipiden beschrieben [Anderluh und Lakey, 2008]. Dabei wird der Begriff Bindung im Sinn einer peripheren Anlagerung an die Membran verstanden und so von der Integration oder Interkalation der Proteine zwischen die Membranlipide abgegrenzt. Bindende Proteine können anhand ihrer sich einstellenden Nähe zur Membran nach Cho und Stahelin [2005] in die drei Klassen S-Typ-, I-Typ- und H-Typ-Proteine unterteilt werden. Während S-Typ-Proteine hauptsächlich mit den Kopfgruppen der Membranlipide interagieren und sich außerhalb der die Membran umgebenden Hydratschicht befinden, dringen I-Typ-Proteine in die Hydratschicht, H-Typ-Proteine sogar zwischen die Kopfgruppen der Lipide und interagieren sowohl mit den Kopfgruppen als auch mit der Fettsäurekettenregion [Cho und Stahelin, 2005].

Mit dem Biosensor wurden zunächst ungeladene und geladene Membransysteme bei pH 6,5 verglichen (siehe Abbildung 5.1, Abschnitt 5.1.1). Der Zusammenhang der Messvariablen Phase und Amplitude wurde für diese Messungen in Abbildung 6.2 weiter herausgearbeitet. Die ähnlich verlaufenden Lipidinjektionen führen zu einer Kombination aus Massenbelegung (Phase) und Fluidisierung (Amplitude). Im Fall der Kontrolle bleiben während der Pufferinjektion beide Parameter konstant (in den Abbildungen nicht gezeigt), die anschließende Bindung von VapA an die Funktionalisierung zeigt relativ zur Massenbelegung eine geringere Fluidisierung. Der Effekt von VapA auf die Membranen unterscheidet

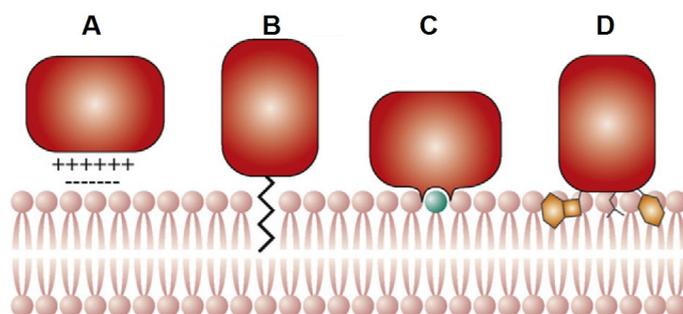


Abbildung 6.1
Bindung von Proteinen an der Membranoberfläche. Mögliche Mechanismen sind die elektrostatische Bindung (A), die Bindung durch Lipidmodifikation des Proteins (B), die spezifische Bindung an bestimmte Membranlipide (C) sowie die hydrophobe Wechselwirkung zwischen Aminosäureresten des Proteins und der Membran. Modifiziert nach Anderluh und Lakey [2008].

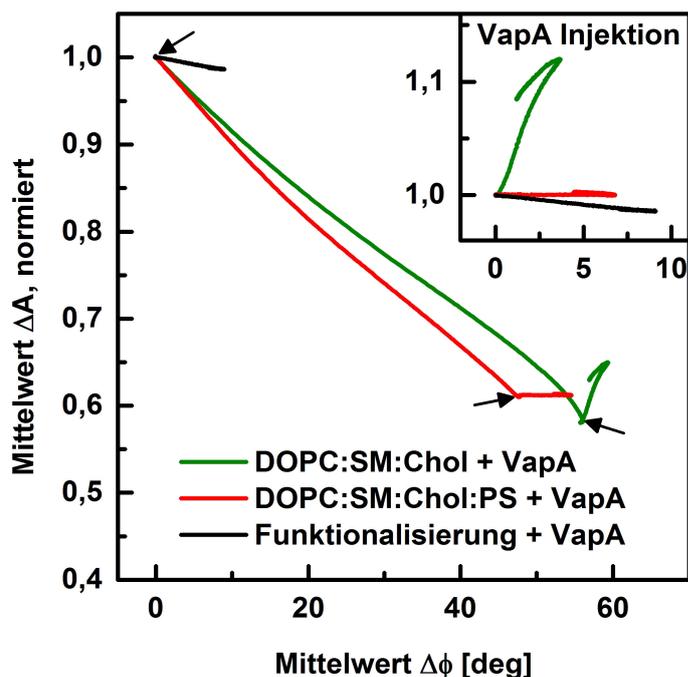


Abbildung 6.2

Beziehung von Phasensignal und Amplitudensignal für die Biosensormessung aus Abbildung 5.1. Die Änderung des Amplitudensignals ist gegen die Änderung des Phasensignals aufgetragen, dafür wurde jeweils der erste Datenpunkt auf 0 beziehungsweise 1 verschoben. Dargestellt ist der Verlauf von Liposomeninjektion und VapA-Injektion (großes Bild) beziehungsweise der Verlauf der VapA-Injektion (kleines Bild) für DOPC:SM:Chol-Membranen (grün), DOPC:SM:Chol:PS-Membranen (rot) sowie für die Kontrolle (schwarz). Schwarze Pfeile kennzeichnen den Beginn der VapA-Injektion. Messbedingungen siehe Abbildung 5.1.

sich dagegen von dem typischen Verhalten einer reinen Erhöhung der fluiden Masse auf dem Chip. Es findet eine Bindung an die Membranen statt, darüber hinaus kommt es zu einer Rigidisierung, welche bei der ungeladenen Membran sehr stark ausgeprägt ist. Auf der geladenen Membran verhält sich VapA ähnlich wie auf der reinen Funktionalisierung des Sensorchips - sowohl Bindung als auch Fluidisierung sind etwas schwächer als bei der Kontrolle. Dies deutet auf eine stärkere Bindung des Proteins an geladene Membranen hin, wengleich die unterschiedliche Ausprägung der Phasensignale teilweise auf einen Beitrag der Rigidisierung zurückzuführen ist.

Die gemäßigte Bindung von VapA an Membransysteme zeigt, dass generell eine Affinität des Proteins für die Anlagerung an Membranen besteht. Es ist darüber hinaus anzunehmen, dass ein Aspekt des Wirkmechanismus, zumindest unter bestimmten Bedingungen, eine deutliche Rigidisierung der intrazellulären Membranen ist. Von diesem Effekt können prinzipiell verschiedene mechanische Eigenschaften der Phagosomenmembran betroffen sein. Möglich sind unter anderem die Verringerung der Mobilität von Membranlipiden und -proteinen sowie die Beeinflussung des Lateraldruckprofils. In der Konsequenz könnte es damit zu einer Beeinträchtigung der Fusionsfähigkeit der Membran kommen und zu einer Beeinflussung der Kinetik für die Phagosomenreifung relevanter molekularer Prozesse.

Die Veränderung des Effekts bezüglich Bindung und Rigidisierung bei Modifizierung der Lipidzusammensetzung zeigt, dass die Wirkung von VapA abhängig von der Zusammensetzung der Membran ist. Einerseits ändert sich, wie wir in Abschnitt 3.3 gesehen haben, während der Phagosomenreifung die Zusammensetzung der Membran [Haas, 2007], wobei bisher nur wenige Informationen über den genauen Verlauf dieses Prozesses bekannt sind. Dies könnte einen an den Fortschritt der Phagosomenreifung angepassten Effekt von VapA bedingen. Bezogen auf die verschiedenen intrazellulären Membranen ist die Lipidspezies PS in der Plasmamembran mit etwa 10% am stärksten vertreten (siehe Abbildung 2.12), welche den Ursprung der Phagosomenmembran bildet. Nach einer Studie

von Desjardins et al. [1994a] verfügt auch die Phagosomenmembran über knapp 10% PS mit im Laufe der Phagosomenreifung steigender Tendenz. Daher ist eine gewisse Spezifität von VapA für die Phagosomenmembran denkbar. Da sich PS vornehmlich auf der Innenseite der Plasmamembran befindet [Eeman und Deleu, 2010], wird es sich zu Beginn der Phagosomenreifung eher im äußeren Lipidlayer der Phagosomenmembran befinden, könnte allerdings beispielsweise durch Flippasen nach und nach in den inneren Layer gelangen.

Die Messungen mit den Lipidmischungen DOPC:PS und PS beim pH-Wert 6,5 (Abbildung 5.2, Abschnitt 5.1.2) zeigen, dass eine weitere Erhöhung des PS-Anteils über 10% des Gesamtlipids keine erkennbare Auswirkung auf die Bindung von VapA hat. Durch die erhöhte VapA-Konzentration kam es sowohl auf der Funktionalisierung als auch an den Membranen zu einer verstärkten Bindung, wobei die Bindungszunahme auf der Funktionalisierung ausgeprägter war. Einen deutlichen Unterschied zwischen den verschiedenen PS-Anteilen lässt die Veränderung der Amplitudensignale erkennen. Während die Amplitude für die 10% PS enthaltende Membran einer sehr schwachen Fluidisierung entspricht, führte VapA im Fall der reinen PS-Membran zu einer stärkeren Fluidisierung, vergleichbar mit der Kontrolle. Für die Bindung von VapA im Sinn einer Immobilisierung auf der Membran, durch welche das Protein nachfolgend seine Wirkung entfalten kann, tritt eine Abhängigkeit vom PS-Gehalt offensichtlich eher bei niedrigen PS-Konzentrationen auf. Andererseits scheint die Tendenz, eine niedrigere Fluidisierung pro Massenbelegung zu verursachen beziehungsweise die Membran zu rigidisieren, für die untersuchten Lipidmischungen mit zunehmendem Neutrallipidgehalt anzusteigen. Diese Folgerungen sollten durch ergänzte Messungen gestützt werden.

Die beiden Lipidmischungen mit 10% PS und 100% PS wurden ebenfalls bei pH 4,5 untersucht (Abbildung 5.3, Abschnitt 5.1.2). Die Beobachtungen waren ein durch VapA vermittelter, mit dem Effekt bei pH 6,5 vergleichbarer Anstieg des Phasensignals bei der PS-Membran, eine temporäre Fluidisierung mit vollständiger Dissoziation sowie ein insgesamt geringerer Effekt von VapA auf die DOPC:PS-Membran. Die als Kontrolle dienende VapA-Injektion auf die PLL-Funktionalisierung führte bei pH 4,5 zu einer niedrigeren Massenbelegung und - im Gegensatz zu der Kontrolle bei pH 6,5 - zu einer leichten und ebenfalls temporären Rigidisierung. Da die Nettoladung von VapA His6 bei neutralem pH-Wert $-5 e_0$ beträgt und der isoelektrische Punkt bei 6,08 liegt, kommt es zwischen den untersuchten pH-Werten 6,5 und 4,5 zu einem Übergang von einer negativen Nettoladung zu einer positiven Nettoladung der VapA-Moleküle (siehe Tabelle 4.3). Die Nettoladung von PS bleibt in dem betrachteten Bereich aber negativ [Abramson et al., 1964]. Damit lässt sich eine modifizierte Wechselwirkung zwischen VapA und PS-haltigen Membranen sowie eine stärkere Abhängigkeit der Bindung von einem steigenden PS-Anteil der Lipidmischung erklären (vergleiche [Köhler et al., 1997]). Ebenso wird aber klar, dass die Bindung nicht allein auf elektrostatische Wechselwirkung zurückgeführt werden kann, ansonsten fiel die Bindung beim pH-Wert 6,5 geringer aus als bei pH 4,5. Im Kontext der Phagosomenreifung spielt somit der abnehmende pH-Wert eine wichtige Rolle im Sinn einer modifizierten Wechselwirkung zwischen VapA und der Phagosomenmembran. Der Vergleich der Messbedingungen im Flusssystem des Biosensors mit der Situation im Phagosom zeigt, dass die Dissoziation der Messsignale eine untergeordnete Rolle spielt. Erstens ist eine starke Konzentrationsabnahme des Proteins in Lösung wenig wahrscheinlich und zweitens werden die durch den Pufferfluss auf die auf dem Sensorchip immobilisierten Proteine wirkenden Scherkräfte in diesem Ausmaß nicht auf die Proteine

an der Phagosomenmembran wirken. Es lässt sich aber an den Ergebnissen ablesen, dass ein möglicherweise vom pH-Wert abhängiger Anteil der gebundenen Proteine stabil gegen entsprechende von außen wirkende Kräfte ist.

Die Ergebnisse zur Beeinflussung der Kapazität ungeladener Membranen (siehe Abbildung 5.14, Abschnitt 5.6.1) unterstützen die Beobachtung einer deutlichen, aber nicht starken Bindung von VapA. Während eine der gezeigten Messkurven eine gleichmäßige Verringerung der Kapazität zeigt, weist die zweite Kurve ein Minimum des Kapazitätswertes auf, gefolgt von einem leichten Anstieg des Signals. Der pH-Wert des Mediums lag mit 5,5 bei diesen Experimenten bereits unter dem isoelektrischen Punkt von VapA. Im Unterschied zu den oben diskutierten Biosensormessungen lag hier das Protein während des gesamten Messverlaufs in der Lösung vor und einmal gebundene Proteine waren keinen durch Pufferströmungen verursachten, mechanischen Kräften ausgesetzt. Neben der Dicke des freistehenden Bilayers ist die Kapazität abhängig von Fläche und Zusammensetzung der Membran (siehe Formel 2.9) [Gutsmann et al., 2001a]. Bei einer gleichmäßigen Bedeckung einer Membran mit Proteinen würde sich sowohl die Dicke als auch die Zusammensetzung des Systems ändern. Eine durch Proteine induzierte Modifizierung von mechanischen Membraneigenschaften könnte ebenso einen Einfluss auf die Dicke der Membran und damit auf die Kapazität haben, und schließlich kann auch die Änderung der Permeabilität zu Kapazitätsveränderungen führen. Da, wie in Abschnitt 6.4 diskutiert wird, die Permeabilisierung in diesem System in den meisten Fällen erst verzögert einsetzt und sich intensiviert, ist eine alleinige Zurückführung der Reduzierung der Kapazität auf eine Membranpermeabilisierung unwahrscheinlich. Somit kann auf einen Anstieg der Dicke des Bilayers, verursacht durch die Bindung von VapA, in Kombination mit einer Änderung der relativen Permittivität der Membran geschlossen werden.

Es wurde schon argumentiert, dass elektrostatische Interaktionen zwar einen Anteil an der Bindung von VapA an Membranen haben mögen, allerdings nicht ausschließlich dafür verantwortlich gemacht werden können. Weitere denkbare Mechanismen der Bindung sind in Abbildung 6.1 gegeben. Da die kovalent an VapA gebundene Lipidmodifikationen [Tan et al., 1995], wie in Abschnitt 3.6 ausgeführt, mit großer Wahrscheinlichkeit bei der Prozessierung von VapA zu VapA p12 abgespalten wird, könnte die Prozessierung einen Einfluss auf den Bindungsprozess haben und damit die gesamte Interaktion beeinflussen. Diese Vermutung kann mit ergänzenden Bindungsmessungen mit der prozessierten Form VapA p12 untersucht werden. Der Einfluss auf die mechanischen Membraneigenschaften spricht dafür, dass VapA zu den I - oder H-Typ Proteinen gehört. Insbesondere die Integration von Lipidmodifikationen oder Aminosäureresten des Proteins zwischen die Membranlipide kann einen Einfluss auf die mechanischen Membraneigenschaften haben und je nach Geometrie und Eigenschaften der eingebauten Region zu einer Rigidisierung oder einer Fluidisierung führen, wie Wiese et al. [2003] für AMPs ausführen. Die bei einem großen Anteil ungeladener Lipide verstärkt auftretende Rigidisierung der Membran kann demnach die Folge einer von der Lipidzusammensetzung abhängigen unterschiedlichen Anordnung der Proteine auf beziehungsweise in der Membran sein.

Inwieweit die Bindung von VapA mit einer Interkalation zwischen die Membranlipide einhergeht oder diese nach sich zieht, wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

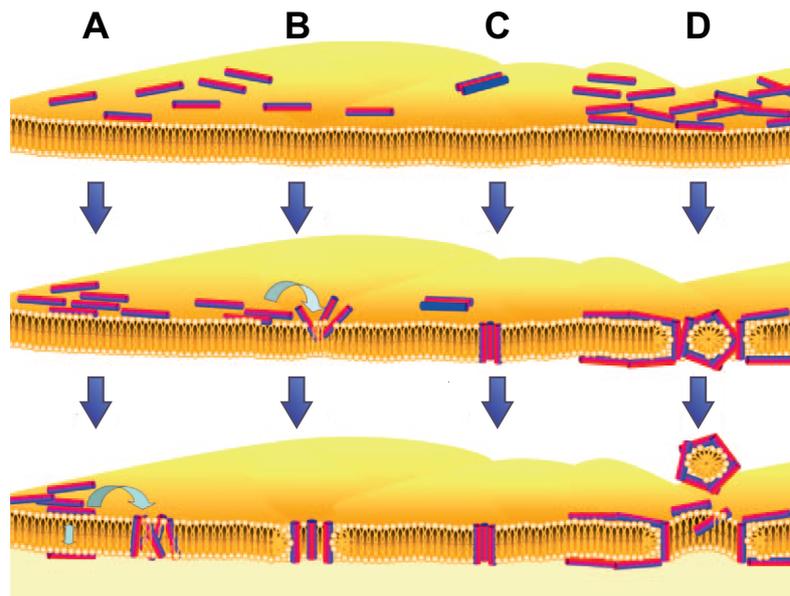


Abbildung 6.3

Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide. Der erste Schritt (oben) der dargestellten Mechanismen besteht in einer Bindung der Peptide (Zylinder) an die Membran. Beim Aggregat-Modell (A) wird die Membran durch Bildung von Peptid-Lipid-Aggregaten destabilisiert, wobei die Orientierung der Peptide variiert. Das *Toroidal-Pore*-Modell (B) beschreibt die Bildung einer Pore durch den Einbau der Peptide senkrecht zur Membranoberfläche. Neben den Peptiden wird die Pore von Membranlipiden ausgekleidet. Im *Barrel-Staffel*-Modell (C) wird ebenfalls eine Pore gebildet, die allerdings ausschließlich von Peptiden ausgekleidet wird. Das *Carpet*-Modell (D) geht von der Bedeckung der Membran durch einen Teppich aus Peptiden aus, welche bei Erreichen einer kritischen Konzentration die Integrität der Membran stören und durch Aggregation mit Membranlipiden Läsionen verursachen. Modifiziert nach Jenssen et al. [2006].

6.2 Die Interkalation von VapA in Modellmembranen

Für viele membranaktive Substanzen, allen voran AMPs, bildet die Interkalation einen wichtigen Interaktionsschritt für eine nachfolgende Membranpermeabilisierung beziehungsweise eine Manipulation der Membranfunktion.

Die geläufigsten Wirkmechanismen von AMPs, welche sich in Abbildung 6.3 wiederfinden, sind das Aggregat-Modell, das *Toroidal-Pore*-Modell (Ring-Poren-Modell), das *Barrel-Staffel*-Modell (Fassdauben-Modell) und das *Carpet*-Modell (Teppich-Modell) [Brogden, 2005; Jenssen et al., 2006]. In allen Fällen ist die in Abschnitt 6.1 thematisierte Bindung an die Membran der erste Schritt der Interaktion, und in allen Fällen ist der finale Zustand der einer permeabilisierten oder destrukturierten Membran. Zum Erreichen dieses finalen Zustands ist für das *Toroidal-Pore*-Modell und das *Barrel-Staffel*-Modell eindeutig die Interkalation der Peptide in die Membran zur Bildung einer definierten Pore notwendig. Beim Aggregat-Modell bewirkt die Interkalation dagegen eine Destabilisierung der Membran durch weniger definiert in die Membran eingebaute Peptide. Einzig das *Carpet*-Modell macht keine konkrete Aussage zu einer Interkalation, obgleich beispielsweise für das α -helikale Peptid LL-37 eine Interkalation parallel zur Membranoberfläche zwischen die Kopfgruppen der Membran vorgeschlagen wurde [Henzler-Wildman et al., 2004].

Sind die Wirkmechanismen von Proteinen auch sehr vielfältig, so konnte doch für viele Proteine mit membranassoziierten Funktionen eine Membraninterkalation gezeigt werden [Wiese et al., 1997; Gutschmann et al., 1999, 2001b]. Dass die Interkalation von VapA sich nicht ohne Weiteres mit diesen Beispielen vergleichen lässt, wird sich im Folgenden herausstellen.

Die in Abbildung 5.4 dargestellten Ergebnisse zur Interkalation von VapA in Membranen der Zusammensetzungen DOPC:SM:Chol und DOPC:SM:Chol:PS bei den pH-Werten 6,5 und 4,5 (Abschnitt 5.2.1) zeigen, dass in keinem Fall eine detektierbare Interkalation in SUVs stattfand. Im Vergleich interkalierte das Cathelicidin-Fragment LL-32 (siehe Abschnitt 4.4) in allen Fällen in die Vesikel, wobei sowohl die Anwesenheit von PS als auch die Absenkung des pH-Werts einen verstärkenden Einfluss auf die Interkalation hatte. Dass negative Ladungen der Membran einen begünstigenden Einfluss auf Bindung und Interkalation von positiv geladenen, amphiphilen AMPs haben, was zu deren Spezifität für die häufig negativ geladenen, äußeren Membranen von Bakterien führt, ist hinreichend bekannt [Shai, 2002]. Im Zusammenhang mit der Phagosomenreifung mag eine erhöhte Aktivität der Peptide mit sinkendem pH-Wert durchaus ihre Daseinsberechtigung haben, wobei angemerkt werden sollte, dass die primäre Zielstruktur der körpereigenen AMPs im Phagosom die äußere Membran des eingeschlossenen Krankheitserregers ist. Eine Funktion der Peptide an der Phagosomenmembran, welche mutmaßlich dem Fortschreiten der Phagosomenreifung dienlich sein könnte, kann dabei allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Die ausbleibende oder allenfalls sehr schwache Interkalation von VapA in die Vesikelmembranen, auch über den langen Zeitraum von über 30 Minuten, stellt vor dem Hintergrund einer deutlichen Bindung und einer ausgeprägten Permeabilisierung und Beeinflussung der Membran eine ungewöhnliche Eigenschaft von VapA dar. Das Protein unterscheidet sich dadurch von den bekannten Wirkmechanismen membranpermeabilisierender Substanzen, insbesondere AMPs. Für das Protein BPI (*Bactericidal Permeability-Increasing Protein*) konnte beispielsweise eine Interkalation in die Membran für eine Rigidisierung der Fettsäureketten verantwortlich gemacht werden [Wiese et al., 1997]. Ein weiteres Beispiel ist das Protein LBP, welches in Abhängigkeit der negativen Ladung an rekonstituierte Membranen bindet und in diese interkaliert [Gutschmann et al., 2001b].

Für die schwache Interkalation von VapA könnte die unnatürlich starke Membrankrümmung der SUVs verantwortlich sein, allerdings führte auch die Verwendung von GUVs für das FRET-Protokoll nicht zu einer detektierbaren Interkalation. Tatsache ist trotzdem, dass die im Phagosom freigesetzten Proteine mit einer nach innen tendenziell negativ gekrümmten Membran interagieren, die Vesikel in dem verwendeten Versuchsprotokoll dagegen eine nach außen positive Krümmung aufweisen.

Auch eine Induktion von Vesikelfusionen konnte für VapA nicht festgestellt werden (Abschnitt 5.2.2). Die entsprechenden Messungen wurden in Abbildung 5.5 zusammengefasst. Dies bedeutet, dass die mit der Bindung einhergehenden, im vorigen Abschnitt diskutierten Änderungen der mechanischen Membraneigenschaften nicht zu einer Erhöhung der Tendenz der Lipide führen, Membranfusionen zu bilden. Vorstellbar ist auf der anderen Seite aber eine durch VapA verursachte Verringerung dieser Tendenz, worüber die Ergebnisse keine Aussage zu treffen erlauben. Einen Hinweis auf ein solches Verhalten stellt die beobachtete Rigidisierung dar (vergleiche [Cevc und Richardsen, 1999]). Für die Phagosomenreifung könnte die Konsequenz in einer Hemmung von Fusions- beziehungsweise *Kiss-and-run*-Prozessen bestehen.

Anders als bei der Interkalation zeigte auch LL-32 keine signifikante Induktion von Fusionsereignissen zwischen den Vesikeln. Die beobachteten schwachen Signaländerungen sind wahrscheinlich nicht auf Fusionen zurückzuführen, sondern eine indirekte Folge anderer durch VapA verursachter Membraneffekte, zu deren Untersuchung das verwendete FRET-Protokoll nicht geeignet ist.

An der Filmwaage wurde die Veränderung der mittleren Fläche pro Lipidmolekül eines DOPC:SM:Chol-Monolayers an der Grenzfläche zwischen Puffer und Luft nach einer VapA-Injektion bei konstant gehaltenem Lateraldruck aufgenommen (siehe Abbildung 5.6, Abschnitt 5.3). Der pH-Wert des Mediums betrug 6,5. Dabei wurde der Effekt von VapA auf Membranen der Lateraldrücke 10 mN/m und 20 mN/m verglichen. Eine Interkalation der Proteine zwischen die Moleküle der Monolayer würde in diesem System zu einem Anstieg der mittleren Molekülfläche pro Lipidmolekül führen. Bei 20 mN/m konnte keine Interkalation verzeichnet werden, die mittlere Molekülfläche nahm sogar in einigen Fällen im Anschluss an die VapA-Injektion mit einer langsamen Kinetik ab. Der Wert von 20 mN/m befindet sich in dem in der Literatur angegebenen Bereich des bilayeräquivalenten Lateraldrucks (vergleiche Abschnitt 4.8), der Lateraldruck ist ein Maß für die Packungsdichte der Moleküle im Monolayer. Denkbare Mechanismen, welche zu der beobachteten, leichten Reduzierung der Molekülfläche führen könnten, sind die Veränderung bestimmter mechanischer Eigenschaften beziehungsweise die zu einer geringeren Beweglichkeit der Lipidmoleküle führende Beeinflussung der Lipidphase. Eine weitere Möglichkeit ist die Entfernung von Lipidmolekülen aus der Membran, was beispielsweise für den Peptidwirkmechanismus nach dem Carpet-Modell beschrieben wird (siehe oben, Abbildung 6.3).

Eine Verringerung des Lateraldrucks auf 10 mN/m und damit der Packungsdichte der Lipide führte zu dem Auftreten einer deutlichen Interkalation von VapA in den Monolayer, welche im zeitlichen Verlauf der Messungen zunahm (Abbildung 5.6, graue Kurve). Dies zeigt erstens, dass eine Interkalation stattfinden kann und zweitens, dass diese von mechanischen Eigenschaften der Membran abhängig ist - dies spricht auch für die angesprochene Abhängigkeit von der Membrankrümmung. Bezogen auf den Effekt von VapA auf die Phagosomenmembran ist es möglich, dass die für eine Interkalation notwendigen Voraussetzungen durch die gegebene Heterogenität biologischer Membranen per se lokal vorliegen oder durch andere Proteine oder Prozesse geschaffen werden. Dies könnte den Übergang der an die Membranoberfläche gebundenen Proteine von einem passiven in einen aktiven Zustand beziehungsweise in einen Zustand modifizierter Wechselwirkung mit der Membran auslösen. Für AMPs wurde ein solcher Übergang von einem gebundenen, passiven Oberflächenzustand zu einem aktiven, porenbildenden Zustand von Chen et al. [2003] beschrieben, wobei als Ursache für den Übergang das Erreichen einer kritischen Peptidkonzentration verantwortlich gemacht wird [Huang, 2000; Chen et al., 2003]. Die Strategie, abhängig von unterschiedlichen Umgebungsbedingungen, wozu auch die eigene Konzentration gezählt werden kann, die Art der Interaktion mit der Membran anzupassen, ist auch für VapA denkbar.

Da das wahrscheinlich durch Lipidmodifikationen in der Bakterienmembran verankerte Protein VapA in das Phagosom freigesetzt wird und somit im Lumen des Phagosoms löslich sein muss, gehört es nicht zu den klassischen Membranproteinen. Letztere zeichnen sich durch eine Instabilität nach der Extraktion aus der Membran aus [Scott et al., 2013], wonach im Umkehrschluss eine vollständige, membrandurchspannende Interkalation von VapA unwahrscheinlich erscheint. Die beobachtete Interkalation bei niedrigem

Lateraldruck kann damit eher einer partiellen Einstülpung beziehungsweise Integration der Proteine in das Gefüge der Membranlipide entsprechen. Ob für die Interkalation die Lipidzusammensetzung der Membran eine Rolle spielt, lässt sich nicht abschließend beantworten, denn die Messungen mit DOPC:SM:Chol:PS-Membranen führten zu einem mit den ungeladenen Monolayern vergleichbaren Ergebnis. Eine spezifische Beteiligung weiterer Membranlipide kann in weiterführenden Messungen untersucht werden. Die Interkalation des mykobakteriellen Membranlipids TDM in die Phagosomenmembran mit dem Ziel der Einflussnahme auf den Verlauf der Phagosomenreifung findet beispielsweise durch Vermittlung durch das Lipid PI statt [Almog und Mannella, 1996]. TDM braucht allerdings für eine Beeinflussung der Phagosomenreifung nicht notwendigerweise in die Membran interkalieren [Axelrod et al., 2008].

Die Diskussion der Anordnung und Organisation von VapA an der Phagosomenmembran wird im folgenden Abschnitt anhand der rasterkraftmikroskopischen Messungen fortgesetzt. Ein weiterer Aspekt ist die Beeinflussung der Struktur von Lipiddomänen durch VapA.

6.3 Die Organisation von VapA an Modellmembranen und die Beeinflussung der Domänenstruktur

Wie wir in Abschnitt 2.7 gesehen haben, sind Domänen ein essentieller Bestandteil von natürlichen Membranen und deren Komplexität sowie funktioneller Heterogenität. Da den meisten Proteinen eine Präferenz für die Interaktion mit bestimmten Lipiddomänen eigen ist, üben mit Membranen interagierende Proteine im Allgemeinen eine Wirkung auf das Phasenverhalten der Lipidmoleküle aus. Zudem kann durch Aggregation mit Lipidmolekülen, die Katalyse von Lipidmodifikationen [Zhao et al., 2007] oder selektive Vesikelbildung [Mukherjee und Maxfield, 2004] die lokale Lipidzusammensetzung der Membran variiert werden. Speziell ist auch ein Einfluss auf die Eigenschaften der Domänengrenzen möglich, was sich sowohl auf die Domänenstruktur als auch auf Abschnürungs- und Fusionsprozesse auswirken kann [Lipowsky, 2002].

Der bei 10 mN/m übertragene LB-Film (Abbildung 5.7A-C, Abschnitt 5.4.1) zeigt einen ausgedehnten L_{α} -Bereich, in welchem sich relativ gleichmäßig verteilt L_o -Mikrodomänen befinden. Außerdem ist eine L_o -Domäne mit 4 bis 5 μm Durchmesser sichtbar, die über eine netzartige Unterstruktur verfügt. Insgesamt machen die L_{α} -Bereiche einen deutlich größeren Teil der Probenfläche aus als die L_o -Domänen. Im Vergleich mit dem Verhältnis 45% : 45% : 10% der eingesetzten Lipide DOPC, SM und Chol fällt auf, dass nicht alle SM und Chol-Moleküle an der Bildung von L_o -Domänen beteiligt sein können. Da das Cholesterol mit 10% einen deutlich geringeren Anteil der Lipidmischung ausmacht, erscheint die Möglichkeit, dass SM und Chol in einem günstigen molaren Verhältnis L_o -Domänen ausbilden und das überschüssige SM in der L_{α} -Phase verbleibt. Das von Kahya et al. [2003] erstellte Phasendiagramm für Dreikomponenten-Mischungen von DOPC, SM und Chol bei 25 °C sagt für die verwendete Mischung die Koexistenz von L_{α} - und L_o -Phasen voraus, dagegen bilden sich nach den Beobachtungen von De Almeida et al. [2003] für die ähnliche Lipidmischung POPC:SM:Chol bei 23 °C zusätzlich L_{β} -Domänen aus. Obwohl diese in den generierten Höhenbildern nicht zu erkennen sind, kann die Existenz einer dritten Domänenform nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die vorliegende Lipidmischung kann ohne Zweifel über eine hier nicht quantifizierbare Tendenz verfügen, neben den bestehenden Lipidphasen L_{α} und L_o auch die L_{β} -Phase

auszubilden, was möglicherweise schon bei kleinen Änderungen des Systems oder der Umgebungsbedingungen wie einer Anhebung des Lateraldrucks oder einer modifizierten Kopplung des LB-Films an die Micaoberfläche auftreten kann.

Die netzartige Unterstruktur der L_o -Domänen, die teilweise nur bei einer hohen Auflösung der AFM-Bilder zutage tritt, kann unterschiedliche Ursachen haben. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um ein Artefakt des LB-Übertrags handelt. Da die Unterstrukturen allerdings sowohl in Messungen kurz nach dem Übertrag als auch in Messungen mit größerer zeitlicher Verzögerung beobachtet wurden, ist eine nachträgliche „Austrocknung“ der Domänen unwahrscheinlich. Es ist denkbar, dass unter den gegebenen Bedingungen zwar ein Zusammenschluss der für natürliche Membranen diskutierten L_o -Mikrodomänen [Damiani et al., 2004] erfolgt, aber die an den Domänengrenzen vorherrschende Linienspannung beziehungsweise der energetische Zustand nicht für einen flächendeckenden Zusammenschluss, sondern eine Fusion zu langgezogenen oder verzweigten Netzwerken begünstigt. In diesem Zusammenhang könnte sich die Unterscheidung zwischen inneren beziehungsweise gesamten Domänengrenzen und äußeren Domänengrenzen als nützlich erweisen, um sowohl die mikroskopischen als auch die makroskopischen Verhältnisse beschreiben zu können. Bei den Zwischenräumen des L_o -Netzwerks handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach wiederum um L_α -Domänen, begründet in der vergleichbaren Höhe. Die L_o -Mikrodomänen liegen zusätzlich frei in den L_α -Bereichen vor, gegebenenfalls lässt sich für sie analog zu der Aggregation von Lipidmonomeren eine Art CMC postulieren, welche natürlich stark von den lokalen Membraneigenschaften abhängig ist. Weitere Hinweise auf eine Aggregation von Mikrodomänen liefert ein Vergleich mit Abbildung 5.9A. Hier trat eine deutliche Distanz der Mikrodomänen zu der abgebildeten L_o -Domäne auf, vermutlich waren die unmittelbar benachbarten Mikrodomänen bereits in der großen Domäne aufgegangen. Eine genauere Beschreibung dieses Vorgangs würde eine Beobachtung der Dynamik auf dem noch nicht übertragenen Monolayer voraussetzen.

Nach einer dreistündigen Inkubation mit $1 \mu\text{g/ml}$ VapA (Abbildung 5.7D-F) wiesen die L_α -Bereiche eine Granulierung mit runden bis wurmförmigen Strukturen auf. Eine Beeinflussung der Dichte oder Struktur der netzartigen Struktur der L_o -Domänen kann an dieser Stelle weder ausgeschlossen noch nachgewiesen werden, da es sich bei den Experimenten nicht um Vorher-Nachher-Aufnahmen derselben Probe, sondern um unabhängige Experimente handelt. Die auftretende Granulierung stellt einen Aspekt einer selektiven Interaktion von VapA mit der L_α -Phase dar. Einerseits kann diese direkt durch eine großflächige Bindung von VapA an den Monolayer, genauer an die nun auf der Unterseite befindlichen Kopfgruppen, verursacht werden beziehungsweise durch einen partiellen Einbau zwischen die Kopfgruppen. Ebenso ist es möglich, dass die beobachtete Granulierung durch die massive Beeinflussung struktureller oder mechanischer Membraneigenschaften durch vereinzelt gebundene Proteine induziert wird. Berücksichtigt man, dass bei dem vorliegenden Lateraldruck von 10 mN/m bei den Filmwaagenmessungen ein deutlicher Einbau verzeichnet wurde, erscheint es die plausiblere Erklärung zu sein, dass die Interaktion von VapA mit der Membran in Form von flächendeckender Bindung und partieller Interkalation stattfindet.

Ein weiterer in Abbildung 5.7 beobachteter Effekt ist das vereinzelt Auftreten kleiner annähernd kreisförmiger Strukturen sowohl innerhalb der Zwischenräume der L_o -Domänen, als auch auf der granulierten L_α -Fläche, die sich aufgrund der Höhe klar von der L_o -Phase unterscheiden. Die Ausprägung wird durch die Inkubation mit VapA verstärkt - die Objekte werden sowohl höher als auch in lateraler Ebene größer (vergleiche Abbildung

5.7A-C und D-F). Es könnte sich hierbei entweder um aggregierte Proteine handeln oder um durch die Anwesenheit von VapA induzierte, ausstülpungsähnliche Ausprägungen der Membranlipide. Die Aggregation von Proteinen als Untereinheiten größerer Strukturen wurde beispielsweise für Amyloid-bildende Proteine gezeigt. Auf der Zellmembran können sich diese zu toxischen Aggregaten anordnen, welche dann die Membranintegrität stören beziehungsweise die Membran permeabilisieren können [Butterfield und Lashuel, 2010]. Eventuelle nichtlamellare Strukturen der Membranlipide würden einem lokalen Phasenübergang von der lamellaren Phase zu einer hexagonalen oder kubischen Phase, verursacht durch einen hohen Krümmungsstress, entsprechen (siehe Abschnitt 2.4).

Bei einem Lateraldruck von 20 mN/m übertragene DOPC:SM:Chol-LB-Filme ohne vorherige VapA-Inkubation (Abschnitt 5.4.1, Abbildung 5.8A-C) wiesen keine nennenswerten Unterschiede zu den bei niedrigerem Lateraldruck hergestellten Proben auf, obwohl die Packungsdichte der Lipidmoleküle deutlich erhöht wurde. Bei diesem Lateraldruck kam es im Filmwaagenexperiment nicht zu einer Interkalation, sondern zu einer leichten Verringerung der mittleren Molekülfläche der Lipide.

Durch die Inkubation mit VapA kam es, bis auf den unten diskutierten Zusammenschluss einzelner Domänen zu größeren Netzwerken, nicht zu einer strukturellen Modifizierung der L_o -Domänen (Abbildung 5.8D-F). Auch hier bestätigt sich also das Bild einer Präferenz von VapA, mit der L_α -Phase zu interagieren. Dies kann eine Konsequenz des in den Filmwaagenexperimenten beobachteten, für die Interkalation benötigten niedrigen Lateraldrucks sein. Für LL-37 wird von Henzler-Wildman et al. [2004] ein spezifischer Einbau in die L_α -Phase ebenfalls durch die dort vorhandene höhere Fluidität erklärt. Die sich in den L_α -Bereichen ausbildende Unterstruktur ist im Gegensatz zu dem LB-Film bei niedrigerem Lateraldruck in der Form deutlicher definiert, und zwar als wurmartige Strukturen von intermediärer Höhe und daran assoziierten punktförmigen Objekten. Beide Strukturen sind gleichmäßig über die L_α -Fläche verteilt. Die zwei verschiedenen Ausprägungen der L_α -Unterstruktur bei unterschiedlichem Lateraldruck lassen sich mit den im vorangegangenen Abschnitt vorgeschlagenen möglichen zwei Zuständen *gebunden* und *partiell interkaliert* korrelieren - im reinen Oberflächenzustand ist die Organisation von VapA, welches sich zwischen Mica und Monolayer befindet, offensichtlich geordneter beziehungsweise deutlicher abgegrenzt. Ob die wurmförmigen Strukturen direkt durch VapA gebildet werden, oder eine durch VapA verursachte Ausprägung der Lipide darstellt, lässt sich hier nicht abschließend klären. Insbesondere die Natur der flankierenden, punktförmigen Objekte (vergleiche Abbildung 5.8E und Abbildung 5.9C) kann in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen - es ist als nicht unwahrscheinlich anzusehen, dass es sich dabei - zumindest teilweise - um einzelne VapA-Moleküle handelt. Eine alternative Erklärung für die wurmartigen Strukturen stellt außerdem eine durch die Anwesenheit von VapA induzierte Ausbildung einer L_β -Phase dar. Für den Phasenübergang erster Ordnung zwischen L_α - und L_β -Phase beschreiben Xie et al. [2002] die Ausbildung von Keimen, die sich anisotrop zu länglichen Bereichen ausdehnen (siehe Abschnitt 2.7). Somit entspricht die Form der entstehenden Strukturen der für die Ausbildung der L_β -Phase bekannten Ausprägung. Analog wurde für LL-37 beschrieben, dass eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem Peptid und den Kopfgruppen der Membranlipide zu einer höheren Packungsdichte der Lipide und damit zu einer Beeinflussung der Phasenübergangstemperatur führt [Henzler-Wildman et al., 2004]. Dabei muss allerdings bedacht werden, dass die Höhe der L_o -Phase, zumindest in lamellaren Systemen, zwischen den Höhen von L_α - und L_β -Phase liegen sollte. Es ist möglich, dass die Fettsäureketten der in

der L_α -Phase befindlichen Lipide wegen des relativ niedrigen Lateraldrucks relativ flach auf der Oberfläche ausgebreitet vorliegen, dies für die L_o -Phase dagegen nicht gegeben ist. In diesem Fall ist es denkbar, dass die L_β -Phase entgegen der in Bilayern geltenden Höhenverhältnisse eine intermediäre Höhe einnimmt.

Neben der Unterstruktur der L_α -Bereiche treten wie bei niedrigerem Lateraldruck die in den Zwischenräumen des L_o -Netzwerks lokalisierten Einschlüsse unterschiedlicher Höhen auf. Da ihre Erscheinung den Objekten, welche die wurmartigen Strukturen flankieren, ähnelt, handelt es sich unter Umständen um die gleichen Strukturen.

In Abbildung 5.9 werden die Inkubationszeiten eine, zwei und drei Stunden der Monolayer mit VapA gegenübergestellt (Abschnitt 5.4.2). Besonders augenscheinlich ist, dass die Unterstrukturen der L_α -Domänen (vergleiche Abbildung 5.8E und Abbildung 5.9D und E) in unterschiedlichen Ausprägungen auftreten können. Dies findet sich auch in der verhältnismäßig hohen Standardabweichung der Filmwaagenexperimente bei 20 mN/m wieder (siehe Abbildung 5.6). Vermutlich führt sowohl die Heterogenität der Proben als auch schwankende Umgebungsbedingungen zu einer stärkeren oder schwächeren Ausprägung, wobei die in Abbildung 5.9E dargestellte Probe eher einen Ausnahmefall bildet.

Bei einer Inkubationszeit von einer Stunde tritt ein frühes Stadium der sich in den L_α -Bereichen bildenden Unterstrukturen auf, nach drei Stunden sind diese Strukturen bereits zu einem Netzwerk verbunden. Die Häufung der flankierenden, punktförmigen Strukturen lässt sich offensichtlich mit dem Fortschreiten der Ausbildung der wurmförmigen Strukturen korrelieren. Dass sie nach 60-minütiger Inkubation nur sehr vereinzelt auftreten, verglichen mit einer flächendeckenden Bildung der wurmartigen Strukturen, spricht für eine kausale Abhängigkeit der punktförmigen Strukturen von den wurmartigen Strukturen. Insofern ist dies ein Indiz, welches gegen die Vermutung, die punktförmigen Strukturen seien einzelne VapA-Moleküle, spricht. Es ist derweil sehr wahrscheinlich, dass VapA direkt an der Bildung der wurmartigen Strukturen beteiligt ist, also vermutlich mehr oder minder mit ihnen kolokalisiert. In Abbildung 5.9C haben die wurmartigen Strukturen ein Stadium erreicht, in welchem sie durchaus als Domänen bezeichnet werden können, wobei offen ist, ob es sich um Lipid-, Protein- oder Mischdomänen handelt. Dass die Bildung dieser Domänen bei kürzerer Inkubationszeit beobachtet werden konnte, ist klar, dass diese Bereiche einen neuen Aspekt des LB-Filmes darstellen und nicht etwa die Überreste von ehemaligen L_α -Bereichen sind. Aus diesen Gründen erscheint es sinnvoll, sie als „VapA-induzierte Domänen“ zu bezeichnen.

Ein interessantes Detail sind die in Abbildung 5.9C bis E ersichtlichen sehr hohen und möglicherweise geordneten oder kristallinen Strukturen. Sofern es sich nicht um Artefakte handelt, bieten sich zwei Erklärungen an. Einerseits kann es sich um VapA-Aggregate oder VapA-Lipid-Aggregate handeln. Huang und Feigenson [1999] beschreiben für die Löslichkeit von Cholesterol bei Überschreitung einer kritischen Cholesterolkonzentration das Auftreten von Cholesterol-Monohydrat-Kristallen. Unter der Annahme, dass die Interaktion von VapA zu einer Tendenz führen kann, dass ein gewisser Anteil von SM aus den L_o -Domänen in die L_α -Phase übergeht, könnte dies zu einem Anstieg des Cholesterolanteils in den L_o -Strukturen führen, sodass die kritische Cholesterolkonzentration lokal in den Domänen überschritten wird. Dies ist an dieser Stelle allerdings eine nicht belegbare Spekulation. Es ist dagegen auch möglich, dass die hohen Strukturen lediglich einem späteren oder ausgeprägteren Stadium der kleinen Strukturen entsprechen, die die wurmartigen Strukturen flankieren. In Analogie zu den VapA-induzierten Domänen sollen diese beiden Strukturen im Folgenden als „VapA-induzierte Aggregate“ bezeichnet werden.

Auch eine auf 20% verringerte VapA-Konzentration von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ reichte aus, um in signifikantem Maß mit einem DOPC:SM:Chol-Monolayer zu interagieren (Abschnitt 5.4.2). Bei der in Abbildung 5.10 dargestellten Messung treten gleich mehrere neue Effekte auf, die bei höherer Konzentration nicht beobachtet wurden. Daher sind an dieser Stelle weitere vertiefende Messungen notwendig, um die Relevanz der Beobachtungen eindeutig beurteilen zu können. Es soll hier trotzdem der Versuch einer Interpretation angestellt werden, deren Stellenwert mit der entsprechenden Einschränkung zu versehen ist.

Ein bereits bei höherer VapA-Konzentration lokal aufgetretener Effekt ist die Fusionierung der häufig kreisförmigen L_o -Domänen zu größeren Netzwerken. Bei niedriger VapA-Konzentration trat dieses Phänomen global, also nahezu auf der kompletten Probenfläche auf. Es deutet darauf hin, dass die Linienspannung an der äußeren Begrenzung der Domänen durch den Einfluss von VapA modifiziert wird. Dies kann aufgrund einer Beeinflussung der L_o -Domänen, aber auch der L_α -Domänen geschehen. Diese Modifikation der Linienspannung würde in natürlichen Membranen zu einer Beeinflussung von Membrankrümmung beziehungsweise Membranfusionseigenschaften führen¹ und passt sich somit in den bisher beschriebenen Wirkmechanismus von VapA ein. In dem auf die zwei Dimensionen der Grenzfläche beschränkten Monolayer kommt es daher zu einer Krümmungsfrustration. Für eine spezifische Interaktion von VapA mit den Domänengrenzen, wie sie von Gutschmann et al. [2000] für CAP18 beobachtet wurde, gibt es allerdings keine Hinweise.

Viele der die ursprünglich freiliegenden L_o -Domänen verbindenden Bereiche, die mit einer Fusionspore verglichen werden können, weisen eine geringere Dichte des L_o -Netzwerks auf als die Domänen selbst. Dies lässt die betreffenden Bereiche auf dem Übersichtsbild Abbildung 5.10A dunkler erscheinen, obwohl die Netzwerke an sich keine geringere Höhe aufweisen. Auch einige der L_o -Domänen sind dieser Dichtenreduzierung unterworfen, insbesondere an der linken Bildseite. Der in Abbildung 5.10B vergrößerte Ausschnitt erweckt den Anschein, dass sich die betreffenden Domänen in den Randbereichen regelrecht auflösen. Da nur eine Momentaufnahme des Monolayers vorliegt, kann über die Dynamik der Prozesse selbstverständlich nicht geurteilt werden. Die scheinbar in der Auflösung befindlichen L_o -Domänen deuten darauf hin, dass in diesem Fall neben der Interaktion zwischen VapA und den L_α -Bereichen auch die L_o -Domänen direkt oder indirekt beeinflusst werden. Dass dies auf die geringere VapA-Konzentration zurückzuführen ist, ist unwahrscheinlich, allerdings nicht auszuschließen.

Schließlich kann an Abbildung 5.10 neben den in diesem Fall breiteren VapA-induzierten Domänen das Auftreten runder, meistens in die L_o -Domänen eingelassener Domänen festgestellt werden. Diese besitzen eine löchrige Struktur und sind etwas niedriger als die VapA-induzierten Domänen. Bezogen auf die Rolle von VapA kann es sich um eine Wirkung handeln, die der Ursache der VapA-induzierten Domänen ähnlich ist, möglicherweise mit dem Unterschied, dass sich die Interaktion hier mit den L_o -Domänen vollzieht. Auch eine von den VapA-induzierten Domänen unabhängige Wirkung ist möglich.

Für die Untersuchungen von LB-Filmen der Lipidmischung DOPC:SM:Chol ergeben sich also die folgenden Hauptaussagen: VapA induziert innerhalb der L_α -Bereiche die Ausbildung VapA-induzierter Domänen, welche zuerst eine langgezogene beziehungsweise

¹Wie von Lipowsky [2002] ausgeführt, ist die Bildung von Abschnürungen für eine bestehende Domäne energetisch günstig, da dadurch die entlang der Domänengrenzen durch die unterschiedlichen Höhen und Krümmungsmodule verursachte Linienspannung sukzessiv reduziert wird.

wurmartige und schließlich eine Netzwerkstruktur aufweisen. Diese Bereiche werden häufig von punktierten Strukturen, VapA-induzierten Aggregaten, flankiert und werden vermutlich durch eine großflächige Bindung von VapA an die Kopfgruppen der Membranlipide induziert. Ob es sich um Lipid-, Protein- oder Mischdomänen handelt, ist nicht bekannt. Es besteht die Möglichkeit, dass es sich bei diesen VapA-induzierten Domänen um eine L_{β} -Phase handelt. Bei niedrigerem Lateraldruck erhalten die L_{α} -Bereiche dagegen eine granulare Struktur, welche sich durch einen integrativeren Effekt von VapA erklären lässt. Die L_o -Domänen werden durch VapA weniger beeinflusst, es gibt allerdings Hinweise auf einen selektiven Effekt auf diese Domänen unter hier nicht spezifizierbaren Voraussetzungen. Zudem übt VapA einen Einfluss auf die Linien- und Grenzspannung der Domänengrenzen aus, was eine Rolle für Fusions- und Abschnürungsprozesse spielen kann. In vielen Fällen wird eine Ausfüllung der vorhandenen Zwischenräumen der L_o -Domänen durch VapA-induzierte Aggregate beobachtet, deren Zusammensetzung nicht geklärt ist.

Die aus DOPC:SM:Chol:PS-Monolayern hergestellten LB-Filme (Abbildung 5.11, Abschnitt 5.4.3) unterscheiden sich von denjenigen ohne PS hauptsächlich durch eine dichtere Bedeckung der L_{α} -Bereiche mit L_o -Mikrodomänen. Ob sich das PS innerhalb der L_{α} -Bereiche oder der L_o -Domänen oder in beiden befindet, ist bisher in der Literatur nicht eindeutig geklärt worden. Die Anwesenheit von PS wird aber in jedem Fall zu einer von ungeladenen Monolayern abweichenden Linien- und Grenzspannung an den Domänengrenzen führen, was auch einen Einfluss auf die vorgeschlagene, der CMC äquivalente, kritische Mikrodomänenkonzentration haben dürfte.

Nach drei Stunden Inkubation mit $1 \mu\text{g/ml}$ VapA bildeten sich wieder VapA-induzierte Domänen, deren Ausprägung sich nicht signifikant von der Situation ohne PS unterschied. Im Gegensatz zu den ungeladenen LB-Filmen ließ sich allerdings an vielen L_o -Domänen ein Einfluss von VapA erkennen. Zentral in den L_o -Domänen befanden sich vergleichbar mit den für die niedrige VapA-Konzentration beschriebenen runden Domänen (Abbildung 5.10) teils niedrigere, teils höhere und unregelmäßig begrenzte Strukturen, welche jedoch in diesem Fall mit dem L_o -Netzwerk verbunden waren. Zudem fanden sich kleinere dieser Bereiche über die L_o -Domänen verteilt. Das Netzwerk der L_o -Domänen ist in diesen Strukturen ausgedünnt. Damit in Zusammenhang stehen könnte die Ausfüllung von Zwischenräumen des L_o -Netzwerks mit runden bis ovalen VapA-induzierten Aggregaten, welche darüber hinaus auch in den L_{α} -Bereichen auftreten. Sie weisen unterschiedliche Größen auf, wobei die in Durchmesser und Höhe größeren Exemplare sich innerhalb der ausgedünnten Regionen befinden. Die Bilder geben allerdings keinen Aufschluss über einen möglichen kausalen Zusammenhang der beiden Erscheinungen. Wiederum kann als Erklärung dienen, dass die VapA-induzierten Aggregate aus VapA-Molekülen bestehen. Diese würden sich zu größeren Aggregaten zusammenschließen und in diesem Zustand eine Aktivität bezüglich der L_o -Domänen entfalten. Ebenso kann es sich bei den VapA-induzierten Aggregaten um Lipid- oder Mischaggregate aus Lipiden und VapA handeln. In diesem Fall könnte auch die Ausdünnung des L_o -Netzwerks als Materialverlust zugunsten dieser Aggregate erklärt werden. Ein ähnliches Phänomen wurde von Grandbois et al. [1998] für das Protein Phospholipase A_2 beobachtet. Hier konnte der Effekt durch eine Degradierung des Phospholipidbilayers in Form einer chemischen Modifikation beziehungsweise Hydrolyse der Lipide erklärt werden.

Die unregelmäßig induzierten Strukturen in den L_{α} -Bereichen, die in der Höhe mit den L_o -Domänen übereinstimmen oder etwas höher sind, können entweder direkt als Überrest aggregierter L_o -Mikrodomänen oder ebenfalls als Mischaggregate interpretiert werden,

wobei es keinen Hinweis auf deren tatsächlichen Ursprung gibt.

Die Lokalisierung von VapA in den LB-Filmen kann nach den bisherigen Erkenntnissen auf die VapA-induzierten Domänen und auf die VapA-induzierten Aggregate eingeschränkt werden.

Die Messungen an festkörperunterstützten Bilayern (Abschnitt 5.5) haben gegenüber den bisher diskutierten LB-Filmen den Vorteil, dass die Dynamik der Veränderungen der Membranstruktur an einer festen Probenposition verfolgt werden kann. Dabei ist anzumerken, dass sich dieses Modellsystem bezüglich mechanischer Membraneigenschaften, Oberflächenkopplung, Lipidmobilität und Zugänglichkeit für die Proteininteraktion stark von den Monolayern an der Flüssigkeits-Luft-Grenzfläche unterscheidet, zumal durch die Messung in Flüssigkeit eine verringerte laterale Auflösung der Bilder resultiert.

Untersucht wurde zunächst die Lipidmischung DOPC:SM:Chol im molaren Verhältnis 40% : 40% : 20% beim pH-Wert 6,5 und einer VapA-Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Abschnitt 5.5.1, Abbildung 5.12). Diese Messungen zeigten hauptsächlich zwei verschiedene Wirkungen von VapA. Innerhalb der L_{α} -Domänen kam es zur Bildung niedrigerer Domänen, welche etwa 3 nm niedriger waren als diese. Damit einher ging die Umstrukturierung der Domänenstruktur, was zu einer drastischen Verringerung der Gesamtlänge der Domänengrenzen führte. Hier findet sich ein weiterer Hinweis auf die Erhöhung der Linienspannung zwischen den Domänen beziehungsweise auf stark modifizierte mechanische Eigenschaften der neuen Domänen. Unter der Annahme, dass die L_{α} -Domänen eine übliche Höhe von ungefähr 6 nm aufweisen, sollte es sich hier nach wie vor um eine Membran mit modifizierten Eigenschaften handeln. Der Höhenunterschied zwischen den neu gebildeten Domänen und den L_{α} -Domänen beträgt ungefähr 5 nm. Eine mögliche Erklärung liefert das von Pokorny et al. [2002] eingeführte *Sinking-Raft*-Modell (sinkendes-Floß-Modell), welches eine Abwandlung des bereits vorgestellten Carpet-Modells darstellt und in Abbildung 6.4 veranschaulicht wird. Demnach aggregieren an einer Membranseite gebundene Peptide und bilden begrenzte Bereiche, die durch Wechselwirkung mit den Membranlipiden in der Membran einsinken. Eine Asymmetrie von Masse, Ladung oder Oberflächenspannung führt in der Folge zu einer lokalen Destabilisierung der Membran. Durch eine Läsion können die Peptide auf die gegenüberliegende Seite der Membran gelangen, sodass schließlich die Asymmetrie der Verteilung aufgehoben ist und die Membran lokal restabilisiert wird [Pokorny und Almeida, 2004; Rausch et al., 2007; Butterfield und Lashuel, 2010]. Ursprünglich für α -helikale Peptide konzipiert, wurde das Sinking-Raft-Modell von Rausch et al. [2007] auch zur Erklärung der Wirkung von Peptiden mit β -Faltblatt-Struktur herangezogen, die sich auf der Membran zu größeren β -Faltblatt-Aggregaten organisieren. Dieses Konzept absinkender Domänen lässt sich in Teilen möglicherweise auf die Wirkung von VapA übertragen.

Das Zurückbleiben einer erhöhten, meist punktförmigen Struktur im Zentrum der neuen Domänen lässt sich in Bezug auf deren Entstehung als eine Art Kondensationskern interpretieren. Es könnte hier ein Zusammenhang mit den in Abbildung 5.10 (und gegebenenfalls in Abbildung 5.11) beobachteten porösen, runden Bereichen bestehen, welche größtenteils ebenfalls eine erhöhte Struktur aufweisen.

Das Auftreten einer gleichmäßigen Bedeckung der L_{α} -Domänen mit VapA-induzierten Domänen konnte an der in Abbildung 5.12 dargestellten Messung nicht beobachtet werden. Die ursprünglichen L_{α} -Domänen sind zwei Stunden nach der VapA-Injektion nahezu vollständig den L_{α} -Domänen und den neu gebildeten, niedrigeren Domänen gewichen. Dies muss auf die unterschiedlichen Eigenschaften der verwendeten Rekonstitutionssysteme

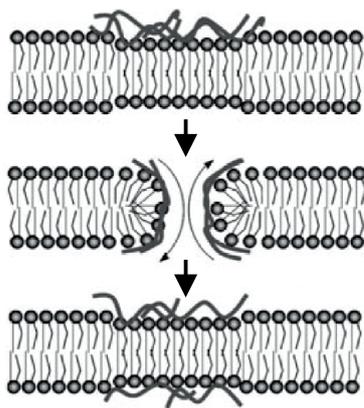


Abbildung 6.4

Das *Sinking-Raft*-Modell für porenbildende Peptide als Modifizierung des *Carpet*-Modells. In einem ersten Schritt binden die Peptide aufgrund elektrostatischer und hydrophober Wechselwirkung an die äußere Membranseite. Sie bilden lokale, durch Peptidaggregate bedeckte Bereiche, welche in die Membran „einsinken“ (oben). Durch die Asymmetrie von Masse, Ladung oder Oberflächenspannung wird die Membran destabilisiert. Durch die entstehende Läsion gelangen die Peptide auf die innere Membranseite (Mitte). Durch einen Ausgleich der Asymmetrie stabilisiert sich die Membran im Anschluss wieder (unten) [Rausch et al., 2007]. Modifiziert nach Butterfield und Lashuel [2010].

zurückgeführt werden. Unwahrscheinlich, aber denkbar ist zumindest, dass eventuell zusätzlich auftretende, höhere Domänen sich im vorliegenden Fall nicht von den L_o -Domänen unterscheiden lassen. Gemessen an den integrierten Häufigkeiten der Histogramme aus Abbildung 5.12A und C beträgt der Flächenanteil der L_α -Domänen vor VapA-Zugabe ungefähr 40%, zwei Stunden nach VapA-Zugabe machen die neu gebildeten niedrigen Domänen 35% der Gesamtfläche aus. Geht man von einer Konvertierung ausschließlich der L_α -Domänen in niedrige Domänen aus, so lässt sich der geringere Flächenanteil durch eine engere Packung der Lipide oder eine Verschiebung der entsprechenden Domänen aus dem Bildausschnitt erklären - somit besteht keine Notwendigkeit einer zusätzlichen (vierten) Domänenform. Insofern kann auch nicht von einer Vergrößerung der Fläche der L_o -Domänen gesprochen werden.

Bei einem pH-Wert von 4,5 (Abbildung 5.13, Abschnitt 5.5.2) zeigte sich ein anderes Gesamtbild. Eine Stunde nach Zugabe von VapA traten innerhalb der L_α -Domänen neu gebildete Strukturen auf, welche offensichtlich zu einer Erhöhung der Rauheit in diesen Bereichen führten und deren Höhe maximal die Höhe der L_o -Domänen erreichte. Es ist zu vermuten, dass es sich hierbei um die bei LB-Filmen beobachteten VapA-induzierten Domänen handelt. Dieses Phänomen trat ebenfalls bei PS-haltigen Bilayern auf. Sowohl eine Erniedrigung des pH-Werts als auch die Hinzunahme negativ geladener Lipide führt in diesem System also zu einer Modifizierung des von VapA auf die Membran ausgeübten Effekts. Dass die VapA-induzierten Domänen beim pH-Wert 6,5 an Bilayern nicht beobachtet wurden, kann möglicherweise durch den Unterschied des Rekonstitutionssystems erklärt werden. Vor dem Hintergrund der Phagosomenreifung, durch welche mutmaßlich der Übergang zwischen unterschiedlichen Interaktionsmustern von VapA reguliert wird, könnten die Festkörperunterstützung der Bilayer sowie die Kopplung zwischen den beiden Lipidlayern die Dynamik in Richtung eines normalerweise im frühen Phagosom stattfindenden Wirkmechanismus verschieben.

Eine weitere für ungeladene Bilayer beim pH-Wert 4,5 oder bei geladenen Bilayern stattfindende Wechselwirkung betrifft die cholesterolreichen L_o -Domänen. Hier entstanden neue Domänen mit einer größtenteils einheitlichen Höhe mindestens 1 nm über den L_o -Domänen, erst eine Stunde nach VapA-Injektion beginnend. Diese Bereiche, die eine unregelmäßige Randstruktur aufweisen, dehnten sich im weiteren Verlauf der Messung weiter aus und bedeckten drei Stunden nach der VapA-Injektion bereits knapp die Hälfte der abgebildeten Fläche. Diese Wechselwirkung mit den L_o -Domänen ist ausgeprägter als die bei LB-Filmen beobachteten Effekte an L_o -Domänen. Sie besteht vermutlich in einer intensiven Bindung

von VapA an diese Domänen, wobei die initiale Phase dieses Effekts eine gegenüber der Bildung der VapA-induzierten Domänen langsamere Dynamik aufweist beziehungsweise eine längere Inkubationszeit mit VapA voraussetzt. Da bei dieser Messung im Vergleich zu der Messung bei pH 6,5 die vierfache Proteinkonzentration verwendet wurde, besteht die Möglichkeit, dass die verstärkte Wechselwirkung von VapA mit den L_o -Domänen eine hohe Proteinkonzentration voraussetzt, was bei niedrigeren Konzentrationen eine erhöhte Inkubationszeit bedeuten würde. Folglich kann diese Art der Wechselwirkung in einigen Systemen nicht oder nur mit erhöhten Versuchslängen beziehungsweise Proteinkonzentrationen beobachtet werden, wobei sich die Inkubationszeiten nicht ohne Weiteres zwischen verschiedenen Modellsystemen übertragen lassen. Bei der Einbaumessung an der Filmwaage (Abbildung 5.6) kam es bei 10 mN/m 130 Minuten nach Proteininjektion zu einem Anstieg der Steigung der Kurve, welcher in diesem Zusammenhang möglicherweise als zusätzliches Auftreten einer Interaktion mit den L_o -Domänen erklärt werden kann. Speziell für die fluoreszenzspektroskopischen Messungen können die hier beobachteten langsamen Kinetiken durchaus zu einer limitierenden Einschränkung werden.

Ein deutlich unterschiedlicher Effekt einerseits zwischen ungeladenen und geladenen Lipidsystemen und andererseits zwischen den beiden pH-Werten 6,5 und 4,5 wurde auch für die Biosensormessungen diskutiert. Dort wurde begründet, dass sowohl eine Erniedrigung des pH-Werts als auch die Hinzunahme von geladenen Lipiden den Stellenwert der elektrostatischen Wechselwirkung bei der Interaktion von VapA mit der Membran deutlich verschieben. In Bezug auf die Wechselwirkung mit verschiedenen Domänen ist hinzuzufügen, dass selbstverständlich auch als ungeladen bezeichnete Lipidspezies über elektrische Ladungen verfügen, welche sich zur Nettoladung Null kompensieren. Da die Ladungsschwerpunkte allerdings gegeneinander verschoben sind, also das Dipolmoment der Lipide ungleich Null ist, werden auch DOPC und SM unter bestimmten Bedingungen eine gewisse Netto-Oberflächenladung besitzen. Ob die elektrostatische Wechselwirkung hier letztendlich ins Gewicht fällt, hängt von vielen Faktoren des Messsystems ab. In vielen Fällen wird diese vermutlich vollständig durch die Hydratschicht der Membran abgeschirmt werden.

Die bisher diskutierten Aspekte des Wirkmechanismus von VapA sollen im Folgenden Abschnitt um die Permeabilisierung der Phagosomenmembran erweitert werden, welche vor dem Hintergrund der Phagosomenreifung sicherlich eine große Bedeutung für das Überleben von *R. equi* im Phagosom hat.

6.4 Die VapA vermittelte Permeabilisierung von Modellmembranen

Die Permeabilisierung von Membranen stellt einen wichtigen Aspekt vieler Wirkmechanismen dar, welche zur Beeinträchtigung der Barrierefunktion biologischer Membranen konzipiert sind. Solche treten sowohl auf Seiten des Immunsystems auf, das beispielsweise antimikrobielle Peptide zur Permeabilisierung von bakteriellen Membranen instrumentalisiert, als auch auf Seiten der Krankheitserreger, deren Proteine und Peptide mit den Strukturen des Wirts und speziell mit dessen Immunsystem interagieren. Die Permeabilisierungsmechanismen dieser Moleküle lassen sich teilweise verallgemeinern, wie dies in Abschnitt 6.2 für AMPs erläutert wurde, da diese häufig für weit verbreitete Zielstrukturen spezifisch sind. Für Proteine ist eine Verallgemeinerung häufig nicht möglich,

da in vielen Fällen eine Wechselwirkung mit spezifischen Proteinen als Zielstrukturen vorliegt. Dies ist beispielsweise für das virale Protein R des HI-Virus gegeben, welches durch eine direkte Wechselwirkung mit einem Protein der Mitochondrienmembran große Membrankanäle bildet und dadurch die äußere Mitochondrienmembran permeabilisiert, was häufig einen Zelltod zur Folge hat [Jacotot et al., 2001]. Gegen Pilze aktive Antibiotika, die Polyene, weisen dagegen eine Spezifität für die Interaktion mit Ergosteroldomänen auf, wodurch sie häufig in der Lage sind, die Zellmembranen zu permeabilisieren und andererseits gerichtete Membrantransportprozesse zu unterbinden [te Welscher et al., 2012]. Auf der anderen Seite können Proteine bezüglich der Membranpermeabilisierung auch regulatorische Funktionen aufweisen. Für die erwähnte Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, die einen zentralen Schritt im Apoptoseprozess darstellt, erfüllen unterschiedliche BCL-2-Proteine solche regulatorischen Funktionen sowohl in pro-apoptischer als auch in anti-apoptischer Richtung [Chipuk und Green, 2008; Lindner et al., 2013]. Ein porenbildender Vertreter der BCL-2-Proteine ist das BAX-Protein, welches durch die Bildung von Proteolipidporen zur Freisetzung von zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran lokalisierten Proteinen führt [Chipuk und Green, 2008]. Eine Inhibition von Permeabilisierungen der Lysosomenmembran, welche ihrerseits einen Zelltod herbeiführen würde, wird beispielsweise vom mutmaßlich membranassoziierten Hitzeschockprotein 70 durch Stabilisierung der Membran erreicht [Nylandsted et al., 2004].

Insbesondere für die Überlebensstrategien intrazellulärer Pathogene (siehe Abschnitt 3.4) spielt die Permeabilisierung von Wirtsmembranen häufig eine wichtige Rolle. Die fakultativ intrazelluläre Hefe *Cryptococcus neoformans* beispielsweise setzt als wesentliche Überlebensstrategie im Phagosom eine massive Permeabilisierung der Phagosomenmembran ein, durch die der phagosomale pH-Wert an das umgebende Lumen angeglichen wird [Tucker und Casadevall, 2002].

Die elektrophysiologischen Messungen, die in der vorliegenden Arbeit vorgestellt wurden (Abschnitt 5.6), erlauben die Charakterisierung der grundlegenden Permeabilisierungsmechanismen, welche durch VapA an freistehenden Membranen verursacht werden. Im Unterschied zu den übrigen verwendeten Methoden beruhte die Messung auf dem Anlegen einer Spannung an die Membran, was zum einen seine Entsprechung in der natürlichen Situation an der Phagosomenmembran findet, zum anderen aber eine wichtige Veränderung der Umgebungsbedingungen darstellt, was bei der Interpretation berücksichtigt werden sollte. Insbesondere eine Interkalation in die Membran kann durch eine elektrische Transmembranspannung begünstigt werden. Dabei kann das Ansteigen der Transmembranspannung durchaus ein Bestandteil der Phagosomenreifung sein, zu welchem der aktive Austausch von Lumenkomponenten und insbesondere von Ionen mit Endosomen und Lysosomen beiträgt. Die unterschiedlichen Effekte von VapA werden hier zunächst an den Ergebnissen für Membranen der Zusammensetzung DOPC:SM:Chol im molaren Verhältnis 45% : 45% : 10% bei pH 5,5 (Abschnitt 5.6.2) diskutiert.

Anhand der in Abbildung 5.15 dargestellten Messung wurden vier häufig auftretende unterschiedliche Permeabilisierungsarten von VapA identifiziert. Die präsentesten Effekte sind heterogene, transient-definierte Läsionen, welche als Stromfluktuationen zwischen mindestens zwei verschiedenen Stromniveaus auftreten und theoretischen Porendurchmessern von wenigen Nanometern entsprechen, sowie undefiniert-heterogene Läsionen unterschiedlicher Größen, die mehrere Nanometer erreichen können. Daneben wurden zwei unterschiedliche, stabilere Läsionsformen beobachtet, bei denen keine Fluktuation auftrat, sondern das Stromniveau durch einen Anstieg oder einen Abfall ein für eine gewisse Dauer

stabiles Niveau erreichte. Es kann dabei zwischen stufenförmig-stabilen Läsionen, deren Stromniveaus Lebensdauern von ungefähr 10 Sekunden besitzen, sowie teilpermanenten Läsionen, welche mindestens für mehrere Minuten erhalten bleiben, unterschieden werden.

Unabhängig von der Größenabschätzung der Läsionen, die später in diesem Abschnitt behandelt wird, bedeutet allein die Detektion eines Permeabilisierungseffekts, dass eine auftretende Läsion groß genug ist, um die im Medium vorhandenen Ionen durch die Membran passieren zu lassen - nur unter dieser Voraussetzung ist ein Anstieg des Stromsignals zu erwarten. In jedem Fall sprechen wir also hier von Läsionen, deren Radius größer ist als der effektive hydratisierte Radius von kleinen, einwertigen Ionen und damit selbstverständlich auch von Protonen.

Die definiert-transienten Läsionen lassen auf einen definierten Wirkmechanismus schließen - eine einfache Destabilisierung der Membran reicht als Erklärung nicht aus. Die Lebensdauern in den einzelnen Zuständen sind unterschiedlich, aber wie im Ergebnisteil beschrieben wurde ist ihre Nahordnung größer als die Fernordnung. Einer zwischen offen- und geschlossen-Zustand fluktuierenden Läsion kann häufig eine konkrete Porengröße zugeordnet werden, obwohl es ebenso vorkommt, dass die Porengröße - also die Differenz der Stromniveaus - während der Lebensdauer der Pore variiert. Sobald eine Pore endgültig offen oder geschlossen ist, weist eine später auftretende Pore eine andere Größe und Dynamik auf als die vorherige. Dabei nimmt das Stromniveau nach dem Ende der definierten Fluktuationen den offen- oder den geschlossen-Zustand an. Auch ein Übergang einer bestehenden Läsion zwischen definiert-transientem und undefiniert-heterogenem Verhalten kann nicht ausgeschlossen werden.

Für die Realisierung von Läsionen sind verschiedene Szenarien denkbar. Eine Läsion könnte durch genau ein VapA-Molekül verursacht werden oder durch das Zusammenwirken mehrerer Moleküle. Die Läsion könnte direkt vermittelt werden, also den Charakter einer Pore haben, an deren Bildung VapA direkt beteiligt ist oder indirekt, beispielsweise durch eine lokale Veränderung der Membraneigenschaften und eine damit einhergehende Destabilisierung der Membran (Vergleich Carpet-Modell, Abbildung 6.3). Beispiele für eine direkte Wirkung sind das *Toroidal-Pore*- und das *Barrel-Stack*-Modell (Abbildung 6.3B und C), für eine indirekte Wirkung das Carpet-Modell (Abbildung 6.3D). Da die für Peptide beschriebenen Wirkmechanismen standardisierte Modelle darstellen und zudem teilweise nicht direkt auf Proteine übertragbar sind, kommen für das Aggregat-Modell (Abbildung 6.3A) und das *Sinking-Raft*-Modell (Abbildung 6.4) sowohl eine indirekte als auch eine direkte Wirkung infrage.

Die Eigenschaften der beobachteten definiert-transienten Läsionen, insbesondere die Nahordnung von Lebensdauer und Porengröße, sprechen für einen zugrundeliegenden direkten Permeabilisierungsmechanismus. Anhand der vorliegenden Daten auf die Anzahl der beteiligten Proteine zu schließen gestaltet sich allerdings beliebig schwierig. Da bei unveränderten Messparametern zu verschiedenen Zeiten Läsionen unterschiedlicher Durchmesser auftreten, erscheint die Beteiligung mehrerer Proteine an einer Läsion die wahrscheinlichere Alternative zu sein. Für das Poliovirus-Protein 2B wurde von Agirre et al. [2002] ein analoger Permeabilisierungsmechanismus beschrieben. Die Bildung definierter Poren erfolgt hier durch eine Oligomerisierung der an die Oberfläche negativ geladener Membranen gebundenen Proteine. Die resultierenden Poren lassen kleinere Moleküle mit Molekulargewichten unter 1000 durch die Membran passieren. Vergleichen lassen sich die definiert-transienten Läsionen zudem mit der in Abbildung 6.5C dargestellten Stromspur für das AMP Gramicidin S. Hancock und Rozek [2002] schlagen als Interpretation einen

Wirkmechanismus nach dem *Toroidal-Pore*-Modell oder nach dem Aggregat-Modell vor.

Die zweite beobachtete Permeabilisierungsform, undefiniert-heterogene Läsionen, äußert sich in Stromfluktuationen ohne die Beteiligung feststellbarer fester Stromniveaus. Das bedeutet, dass eine Läsion dieses Typs während des Bestehens keinen klaren Porendurchmesser besitzt, also nicht nur zwischen offen- und geschlossen-Zustand fluktuiert, sondern auch oder ausschließlich in der Porengröße. Da für die undefiniert-heterogenen Läsionen unterschiedliche Ausprägungen beobachtet wurden, ist nicht eindeutig, ob den verschiedenen Ausprägungen derselbe Mechanismus zugrunde liegt. Es soll im Folgenden jedoch versucht werden, eine gemeinsame Interpretation zu finden. Zu den variablen Ausprägungen zählt zunächst die Größe der Läsionen. Einige dieser Läsionen besitzen einen entsprechenden mittleren Durchmesser in der Größenordnung der Porendurchmesser der definiert-transienten Läsionen, andere überschreiten diese Größe um ein Vielfaches. Heterogenität besteht darüber hinaus bezüglich der Lebensdauer der undefinierten Läsionen. Einige - zumeist die Exemplare geringerer Größe - können über sehr lange Zeitspannen aktiv bleiben, also ein ähnliches Maß an Stromfluktuationen aufrechterhalten oder dieses langsam erhöhen, andere bleiben nur für wenige Sekunden aktiv. Eine ungewöhnliche Eigenschaft dieses Läsionstyps ist zudem, dass die Läsionen sich sehr abrupt vollständig schließen können. Dass dieses Phänomen zumeist für größere undefinierte Läsionen beobachtet wurde, ist durch die deutlichere Sichtbarkeit von sehr abruptem Schließen bei großen Läsionen zu erklären, es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass das Schließen einer kleinen Läsion derselben Dynamik folgen kann. Größere Läsionen tendieren auch häufig dazu, sich zu größeren Porendurchmessern aufzuschaukeln, was möglicherweise mit dem Verhalten der stufenförmigen Läsionen korreliert werden kann. In diesem Fall kann es sich also nicht um mehrere, voneinander statistisch unabhängige Poren handeln, wie vom Markov-Modell beschrieben [Ball und Rice, 1992]. Somit kann das Verhalten entweder mehreren statistisch voneinander abhängigen Poren oder Einzelporen mit variierendem Porendurchmesser beziehungsweise mit variierender Leitfähigkeit zugeordnet werden. Die letztere Erklärung scheint, begründet durch das sehr abrupte Schließen, die plausiblere zu sein.

Für die undefiniert-heterogenen Läsionen ist eine indirekte Vermittlung der Permeabilisierung durch VapA naheliegend. Die Anwesenheit von VapA-Molekülen auf der Membran und die damit verbundene Beeinflussung der Membraneigenschaften führen also lokal zu einer Destabilisierung der Membranintegrität. Dadurch kommt es zu zeitlich und örtlich begrenzten Zusammenbrüchen der Membran - diese können ohne weitere Annahmen als Unordnung in der Membran beschrieben werden. Dieser durch einige AMPs vermittelte Mechanismus wird von Huang et al. [2004] auf die Verursachung von internem Stress oder Membrankrümmung zurückgeführt. In den Fällen kleinerer Läsionen ist die Unordnung scheinbar noch hinreichend begrenzt, sodass die umgebene intakte Membran nicht maßgeblich destabilisiert und schließlich in der Lage ist, die Ordnung des destabilisierten Bereichs wiederherzustellen, sich also selbst wieder zu schließen. Das selbstständige Schließen beziehungsweise Reparieren von Permeabilisierungen durch die Membran wurde von Walev et al. [2001] für durch das porenbildende Toxin Streptolysin-O gebildete Läsionen beschrieben. Eine größere undefiniert-heterogene Läsion resultiert vermutlich aus einer höheren lokalen Proteinkonzentration beziehungsweise aus einem größeren zusammenhängenden, von VapA bedeckten Bereich. Gegen eine Erklärung durch das gleichzeitige Entstehen vieler kleinerer Permeabilisierungen spricht das erwähnte abrupte Schließen einiger großer Läsionen (siehe oben). Dies würde einen synchronisierten Vorgang an von-

einander räumlich getrennten Membranpositionen erfordern. Einen weiteren zusätzlichen Erklärungsansatz für das Schließen der großen undefiniert-heterogenen Läsionen gibt das *Sinking-Raft-Modell* (siehe Abschnitt 6.3, Abbildung 6.4). Rausch et al. [2007] führen als Erklärung für die Permeabilisierung eine Asymmetrie an der Membran von Masse, Ladung oder Oberflächenspannung an. Unter der Annahme, dass die einzige treibende Kraft für die Aufrechterhaltung der Permeabilisierung diese hypothetische Asymmetrie ist, stellt das Schließen der Läsion beziehungsweise die Restabilisierung der Membran eine logische Konsequenz dar, sobald die Läsion eine für den Durchtritt von Proteinen hinreichende Ausdehnung erreicht hat und die Asymmetrie ausgeglichen werden kann. Anders formuliert würden auf die gegenüberliegende Seite der Membran gelangte Proteine gerichtete Effekte auf die Membran durch Verursachung entgegengesetzt gerichteter Effekte kompensieren und die eine Konsequenz der unkompensierten Effekte darstellende Permeabilisierung beenden. Die durch das oben angeführte Toxin Streptolysin-O verursachte Membranpermeabilisierung nutzen *Clostridium*-Bakterien zur Einschleusung von bakteriellen Proteinen in die Wirtszelle, wo diese in der Lage sind, das Zytoskelett zu zerstören [Walev et al., 2001]. Für AMPs sei überdies das Self-Promoted-Uptake-Modell angeführt, welches die Durchquerung der Bakterienmembran zur Erreichung der eigentlichen Zielstruktur im Inneren des Bakteriums als Hauptfunktion der Membranpermeabilisierung beschreibt. Dies eröffnet eine weitere Möglichkeit der durch VapA verursachten Konsequenzen für die Phagosomenreifung. Indem es sich selbst (oder anderen Proteinen) den Durchtritt durch die Phagosomenmembran ermöglicht, könnte es außerhalb des Phagosoms weitere Wechselwirkungen mit zuvor unerreichbaren Zielstrukturen entfalten. Analoges zeigte sich für in Phagosomen eingeschlossene *M. tuberculosis* Bakterien. Durch eine Permeabilisierung der Phagosomenmembran sind sie in der Lage, über bakterielle Antigene Einfluss auf die Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I-Komplexe zu nehmen [Teitelbaum et al., 1999]. Auf der anderen Seite führen anhaltende undefiniert-heterogene Läsionen in vielen Fällen zu einem allmählichen Anstieg des Stromniveaus. Es muss also eine gewisse Stabilität der geöffneten Läsionen unterstellt werden. Eine Entsprechung der undefiniert-heterogenen Läsionen findet sich in den in Abbildung 6.5B abgebildeten, von linearem Bactenecin verursachten Stromfluktuationen. Zum Zusammenbruch werden die Membranen durch eine sich zu hohen Stromwerten aufschaukelnde, undefiniert-heterogene Permeabilisierung gebracht. Dies ist zwar nicht mit der Zerstörung des Phagosoms gleichzusetzen, zeigt aber, dass die Läsionen durchaus Größen annehmen können, die große Herausforderungen an die Integrität der gesamten Phagosomenmembran stellen können. Der Zusammenbruch des rekonstituierten Bilayers zeigt dabei lediglich, dass das Messsystem hier an seiner Grenze angelangt ist.

Weniger häufig als die beschriebenen transienten Permeabilisierungen traten stabilere Läsionsöffnungen und -schließungen auf, wobei die stufenförmig-stabilen Läsionen in wenigen Fällen für begrenzte Zeitabschnitte die übrigen Permeabilisierungstypen dominierten (siehe Abbildung 5.16). Die entsprechenden theoretischen Porendurchmesser lagen zumeist in der Größenordnung der definiert-transienten Läsionen, sodass unter Umständen ein gemeinsamer zugrundeliegender Mechanismus angenommen werden kann, der im Fall der stufenförmigen Läsionen um einen unbekanntem Aspekt erweitert ist. Ob das Aufschaukeln der größeren, undefiniert-heterogenen Läsionen zu höheren Stromwerten eine analoge Erweiterung der undefinierten Läsionen um einen gemeinsamen Aspekt darstellt, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Für stabilere Läsionen treten in Abgrenzung von den definiert-transienten Poren keine Fluktuationen zwischen offen- und geschlossen-Zuständen

auf. Diese Diskrepanz zwischen den Stromverläufen kann entweder durch einen veränderten Mechanismus von VapA erklärt werden, beispielsweise ein stabilerer Einbau oder eine festere Bindung zwischen den VapA-Molekülen zu hypothetischen Oligomeren, oder durch veränderte Eigenschaften des Interaktionspartners, also der Membranlipide. Die letztere Alternative könnte zum Beispiel in der Wechselwirkung entweder mit cholesterolarmen oder mit cholesterolreichen Domänen bestehen. Auch kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass der Randbereich der Membran in unmittelbarer Nähe der Aperturbegrenzung von der restlichen freistehenden Membran abweichende Eigenschaften besitzt. Da sich kein Beispiel für einen offensichtlichen simultanen Anstieg oder Abfall des Stromsignals um mehrere Stufen finden lässt, ist in diesem Fall das Vorliegen von Einzelereignissen wahrscheinlich. Jedoch tritt das Öffnen und Schließen dieser Läsionen innerhalb einer eingeschränkten Zeitspanne häufig wiederholt auf, wofür möglicherweise eine räumliche Nähe der Ereignisse als Erklärung dienen kann. Nach Beendigung der Bildungsaktivität der stufenförmig-stabilen Läsionen wird kein weiteres Schließen definierter Läsionen beobachtet, das Stromniveau bleibt auf dem angehobenen Zustand. Somit sind die Läsionen zeitlich stabil in der Membran verankert. Vergleichen lassen sich diese Läsionen mit dem von Hancock und Rozek [2002] beschriebenen Effekt von Porinen auf freistehende Membranen (siehe Abbildung 6.5A), wobei die von Porinen gebildeten Kanäle zu höheren Stromanstiegen führen und die von VapA induzierten stufenförmig-stabilen Läsionen in begrenzten Zeiträumen auftreten.

Der vierte der von VapA an den freistehenden Membranen vermittelte Permeabilisierungstyp, teilpermanente Läsionen mit dem Charakteristikum eines sprunghaften Anstiegs beziehungsweise Abfalls des Stromniveaus um mehrere Picoampere, trat ebenfalls in vielen Messungen auf. Er stellte jedoch einen verhältnismäßig seltenen Effekt dar, zumal die Lebensdauer mehrere Minuten betrug, oder die Läsion bis zum Ende der Messung stabil blieb. An teilpermanenten Läsionen zu einem frühen Zeitpunkt nach VapA-Injektion zeigt sich, dass das Stromniveau über die gesamte Lebensdauer der Permeabilisierung weitestgehend konstant blieb, da hier noch wenige weitere Permeabilisierungseffekte überlagert sind. Um diese Effekte zu verursachen, sind sehr stabile Konstrukte unter direkter Beteiligung von VapA-Molekülen notwendig. Eine weitere Abgrenzung von den bisher diskutierten definierten Läsionstypen, die über die zu stufenförmigen Läsionen angeführten Erklärungsmöglichkeiten hinausgeht, ist anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht möglich. Eine Untersuchung der Proteinorientierung auf der Membran unter verschiedenen Voraussetzungen beziehungsweise weiterführende Experimente zur molekularen Anordnung von Proteinen und Lipiden könnten Aufschluss über die Zuordnung der verschiedenen Permeabilisierungsformen zu entsprechenden Mechanismen geben.

Eine allgemeine Beobachtung ist das abrupte Intensivieren der Fluktuationsintensität definiert-transienter und undefiniert-heterogener Läsionen. Dieses Phänomen tritt häufig kurze Zeit nach einer Erhöhung der angelegten Spannung auf. Dies kann durch eine zeitverzögerte Reaktion auf die Spannungserhöhung erklärt werden. Beispielsweise könnte damit eine weitere Interkalation, eine Umorientierung der Proteine oder eine Umstrukturierung der Läsion verbunden sein, welche durch die höhere Spannung zwar ermöglicht, aber nicht instantan eingeleitet werden.

Für eine systematisch asymmetrische Form der Permeabilisierungen ließ sich anhand des Größenparameters beziehungsweise der Leitfähigkeit bei Vorzeichenwechseln der angelegten Spannung kein Hinweis finden. Wie in Abschnitt 5.6.3 erläutert blieb der Größenparameter in den meisten Fällen konstant. Bei deutlich asymmetrischen Porensymmetrien wäre

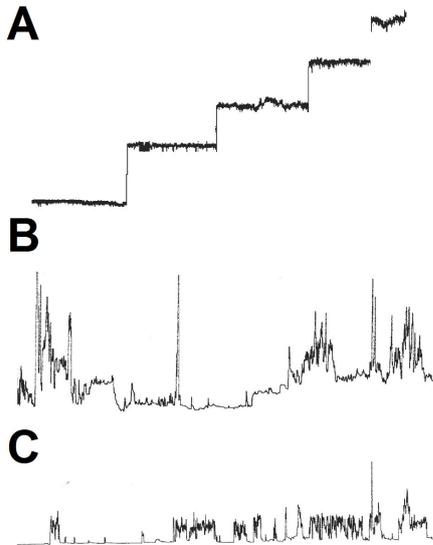


Abbildung 6.5

Stromspuren unterschiedlicher Mechanismen der Membranpermeabilisierung. (A) Der wiederholte Einbau von Porinen verursacht große definierte Kanäle mit relativ einheitlicher Größe und hoher zeitlicher Stabilität. (B) Das AMP lineares Bactenecin führt zu in Größe und Lebensdauer stark variierenden Stromfluktuationen. (C) Das AMP Gramicidin S bildet definierte Kanäle von einheitlicher Größe, aber variabler Lebensdauer. Modifiziert nach Hancock und Rozek [2002].

bei einem Vorzeichenwechsel eine systematische Veränderung der Porenleitfähigkeit zu erwarten.

Im Zuge der Prozesse der Phagozytose und der Phagosomenreifung kommt es zu einer Ansäuerung des Phagosoms vom pH-Wert des extrazellulären Mediums bis zu einem bakteriziden pH-Wert von etwa 4,5 (siehe Abschnitt 3.3). Der Umbau des Phagosoms zur REV führt zu einer Unterbrechung der Phagosomenreifung und zu einem stationären, intermediären pH-Wert zwischen 5 und 6 [von Bargen und Haas, 2009]. Die in diesem Abschnitt beschriebenen Effekte wurden hauptsächlich anhand der bei pH 5,5 generierten Daten beschrieben, jedoch unter Einbeziehung allgemeiner Beobachtungen, welche sich auf die Gesamtheit der Daten beziehen. Der pH-Wert 5,5 wurde stellvertretend für den Zustand des intermediären Phagosoms gewählt, darüber hinaus entspricht er dem stationären Zustand der REV. Für die Zustände des frühen beziehungsweise späten Phagosoms bei pH 6,5 und 4,5 spezifische Beobachtungen (Abschnitt 5.6.3) werden im Folgenden diskutiert, wobei anzumerken ist, dass der Expressionsgrad von VapA bei einem pH-Wert von etwa 5,0 sein Maximum erreicht [Benoit et al., 2001].

Bei einem pH-Wert von 6,5 (Abbildung 5.17) konnten gegenüber den Messungen bei pH 5,5 zwei relevante Unterschiede festgestellt werden. Die definiert-transienten Läsionen traten wesentlich seltener auf, waren weniger ausgeprägt und wiesen eine schwächere Definierung auf. Augenscheinlich ist zudem, dass die Größenparameter der Permeabilisierungen bei pH 6,5 sich auf relativ kleine Werte beschränkten. Ein verringerter pH-Wert von 4,5 (Abbildung 5.18) führte dagegen zu größeren Porendurchmessern und schnelleren Kinetiken der definiert-transienten Läsionen. Es ist also eine klare Tendenz von VapA zu einer Intensivierung der Läsionsbildung mit sinkendem pH-Wert zu erkennen. Besonders deutlich wird dies bei der in Abbildung 5.24A dargestellten Auswertung der abgeschätzten Porengrößen (Abschnitt 5.6.6). Sowohl der Mittelwert als auch der Median der Porendurchmesser nahm mit absinkendem pH-Wert zu.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich eine Korrelation des Läsionsdurchmessers beziehungsweise der Intensität der Membranpermeabilisierung mit dem Fortschreiten der Phagosomenreifung annehmen. Dies macht insofern Sinn, als dass eine Anpassung der

Aktivität an den aktuellen pH-Wert des Phagosoms eine wesentlich effektivere Regulierung auf einen stationären pH-Wert ermöglicht als eine bei hohen und niedrigen pH-Werten gleichbleibende Permeabilisierung. Bei Abweichungen von dem für *R. equi* mutmaßlich optimalen pH-Wert würde die Aktivität entweder erhöht oder reduziert, sodass der Abweichung entgegengesteuert werden würde. Schließlich wird eine Änderung des pH-Werts maßgeblich durch die momentane Bilanz aus ein- und ausströmenden Ionen und Protonen festgelegt. Dieses Verhalten entspricht etwa einem Proportionalregler.

Die in Abbildung 5.23 dargestellte Ermittlung der theoretischen Porengrößen und deren Auswertung in Abbildung 5.24 sind auf der Grundlage von Formel 4.13 erstellt und unterliegen einer Reihe vereinfachender Annahmen. Die angenommene zylindrische Geometrie der Läsion kann beispielsweise durch in die Läsion weisende Aminosäurereste deutlich eingeschränkt werden, auch die Länge der Pore muss nicht zwangsläufig der Dicke der Membran entsprechen. Insbesondere für kleine Porendurchmesser ist darüber hinaus eine deutliche Überschätzung der Leitfähigkeit des Mediums anzunehmen, da es hier zu einem verlangsamten Durchtreten von Ionen kommen kann, deren hydratisierter Radius sich in der Größenordnung der Läsion befindet. Wie Marrink et al. [2009] berichten, treten Natrium- und Chlorionen nur langsam durch Poren mit einem Durchmesser kleiner als 3 nm. In seiner Bachelorarbeit gibt Komorowski [2014, S. 68] für eine gleichzeitige Unterschätzung der Porenlänge um den Faktor 2 und eine Überschätzung der spezifischen Leitfähigkeit um den Faktor 5 eine resultierende Unterschätzung des Porendurchmessers um einen Faktor von 3,3 an. Angesichts der ermittelten Porendurchmesser in der Größenordnung von 1 nm kann also von einer deutlichen Unterschätzung ausgegangen werden. Das für die Situation im Phagosom bedeutsame Durchtreten von Protonen sollte bei einem Stokesradius² von 0,028 nm und einem effektiven hydratisierten Radius von 0,282 nm für Protonen [Nightingale Jr, 1959] sogar für Läsionen möglich sein, die mit dem verwendeten Versuchsdesign nicht detektierbar sind.

Anhand der in Abbildung 5.24B gezeigten Auswertung konnte eine Korrelation zwischen dem theoretischen Porendurchmesser und der Inkubationszeit mit VapA nachgewiesen werden. Dies bestätigt den qualitativen Eindruck, dass sich die Größenparameter, aber auch die Permeabilisierung insgesamt mit fortschreitender Zeit intensivieren. Als Erklärung kann dienen, dass die Bildung von größeren Poren die Beteiligung einer größeren Anzahl von VapA-Molekülen voraussetzt, was im Fall der undefinierten Läsionen zu einer größeren destabilisierten Fläche oder im Fall der definierten Läsionen zu einem größeren definierten Porenradius führen würde. Da sämtliche Ergebnisse für eine mit steigender Inkubationszeit fortschreitende Interaktion sprechen, kann davon ausgegangen werden, dass zu späteren Zeitpunkten eine höhere Dichte von VapA-Molekülen auf der Membranoberfläche vorhanden ist.

Als Vergleichssubstanzen wurden bei den pH-Werten 6,5 und 5,5 VapA p12 und VapB auf ihr Permeabilisierungsverhalten hin untersucht. Dass die prozessierte Form VapA p12 (Abschnitt 5.6.4) von VapA eine höhere oder niedrigere Permeabilisierungsaktivität aufweist als die unprozessierte Form konnte dabei ebensowenig festgestellt werden wie ein qualitativer Unterschied der Permeabilisierungen, welcher auf einen modifizierten Wirkmechanismus hindeuten würde. Wie aus Abbildung 5.24A hervorgeht, kam es zudem zu keiner deutlichen Veränderung der Porengröße gegenüber unprozessiertem VapA. Insofern ist anzunehmen, dass die im Phagosom stattfindende Prozessierung von VapA nicht den

²Der Stokesradius ist der den Diffusionseigenschaften eines Partikels entsprechende Kugelradius.

6.4 Die VapA vermittelte Permeabilisierung von Modellmembranen

Zweck einer erhöhten Membranpermeabilisierung hat, andererseits auch nicht die Permeabilisierung einschränkt. Durch die Prozessierung wird N-terminal ein Abschnitt von 76 Aminosäuren zuzüglich des gegebenenfalls von der rekombinanten Aufreinigung verbliebenen *His-Tags* entfernt, und aller Wahrscheinlichkeit nach ebenfalls die Lipidmodifikation.

Für das für die Virulenz in Schweinen spezifische Protein VapB wurde anhand der in Abschnitt 5.6.5 vorgestellten Ergebnisse bei pH 6,5 eine gegenüber VapA deutlich erhöhte Bildung von definiert-transienten Läsionen nachgewiesen. Für den pH-Wert 5,5 zeigten sich zudem leicht erhöhte Werte des Porendurchmessers (Abschnitt 5.6.6). Darüber hinaus lag keine nachweisbare Veränderung bezüglich der Läsionsmechanismen vor, sodass die Spezifität für Schweine(phagosomen) bisher nicht durch die Permeabilisierungseigenschaften erklärt werden kann.

Im nachfolgenden Abschnitt sollen die bisher gesammelten Informationen zu einem Gesamtkonzept des Wirkmechanismus für VapA an der Phagosomenmembran zusammengeführt werden.

6.5 Zusammenfassung und Ausblick: Der Wirkmechanismus von VapA

„... es gibt wahrscheinlich so viele verschiedene phagosomale Kompartimente wie es 'phagosomale Pathogene' gibt“. Dieser von Haas [2002, S. 247] geäußerten Vermutung liegt maßgeblich die Dynamik und die Fähigkeit der Phagosomenmembran zugrunde, sich auf gegebene Situationen durch eine Vielzahl an Prozessen und möglichen Zuständen anzupassen. Eines der erwähnten phagosomalen Pathogene ist *R. equi*, welches in der Lage ist, die Phagosomenreifung zu unterbrechen und sich im Inneren des Phagosoms zu vermehren [Hondalus und Mosser, 1994; Fernandez-Mora et al., 2005]. Das Protein VapA von *R. equi* ist essentiell für die Virulenz des Bakteriums [Giguère et al., 1999; Jain et al., 2003]. Es ist zudem an der Modifizierung des Phagosoms zu einer REV und für die Verhinderung der Ansäuerung des Phagosoms notwendig [von Bargen und Haas, 2009; von Bargen et al., 2009].

Die Expression und die Freisetzung von VapA in das phagosomale Lumen wird durch verschiedene phagosomenspezifische Umgebungsbedingungen, insbesondere oxidativen Stress, induziert [Benoit et al., 2002]. K. von Bargen [2010, S. 92 f., S. 112] beobachtete die Ausbreitung von VapA nicht nur innerhalb des Phagosoms, sondern darüber hinaus angereichert in vesikulären Strukturen der Wirtszelle, welche als Endosomen und Lysosomen identifiziert wurden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Wirkmechanismus von VapA an Modellmembranen zu untersuchen um Hinweise auf dessen Funktion während der Phagosomenreifung zu sammeln und damit einen Beitrag zu der Frage zu erbringen, wie es *R. equi* möglich ist, im Phagosom zu überleben. Zu diesem Zweck wurde die Wechselwirkung von VapA mit einer Reihe unterschiedlicher Membranrekonstitutionssysteme mit Hilfe verschiedener biophysikalischer Methoden untersucht. Anhand der Ergebnisse lässt sich das Bild eines fünfstufigen Wirkmechanismus von VapA mit Membranen zeichnen, welcher eine Reihe von möglichen Verknüpfungspunkten mit der Beeinflussung der Phagosomenreifung aufweist. Der für VapA vorgeschlagene Wirkmechanismus, der in Abbildung 6.6 zusammenfassend dargestellt ist, setzt sich zusammen aus (1) der Bindung an die Phagosomenmembran, (2) der partiellen Interkalation zwischen die Membranlipide, (3) der Aggregation und Organisation auf oder in der Membran und der Einflussnahme auf die Lipiddomänenstruktur, (4) der Permeabilisierung der Membran durch Bildung unterschiedlicher Läsionen und schließlich (5) der Auflösung der Membranintegrität, was zu einer Zerstörung der Membran führen kann. In der Reihenfolge der fünf Interaktionsschritte wird der Wirkmechanismus im Folgenden weiter spezifiziert.

Die Bindung von VapA an festkörperunterstützte Modellmembranen (Abbildung 6.6, (1)) wurde mit Hilfe eines Biosensors analysiert. Dabei konnte eine deutliche Bindung festgestellt werden. Die Bindung erhöhte sich mit steigendem Anteil von negativ geladenem PS von 0% auf 10% in der Membran, allerdings nicht bei einer weiteren Erhöhung auf 100% PS. Dies führt zur Vermutung einer gewissen Bindungsspezifität von VapA für die Phagosomenmembran, da diese im Vergleich zu anderen intrazellulären Membranen einen hohen PS-Anteil von knapp 10% aufweist. Eine Reduzierung des pH-Werts, durch welche die Nettoladung von VapA einen Vorzeichenwechsel erfährt, führte zu einer leichten Reduzierung der Bindung. Eine Implikation für eine bevorzugte Bindung zu einem frühen Zeitpunkt der Phagosomenreifung kann nicht ausgeschlossen werden. Darüber hinaus ermöglichten es die

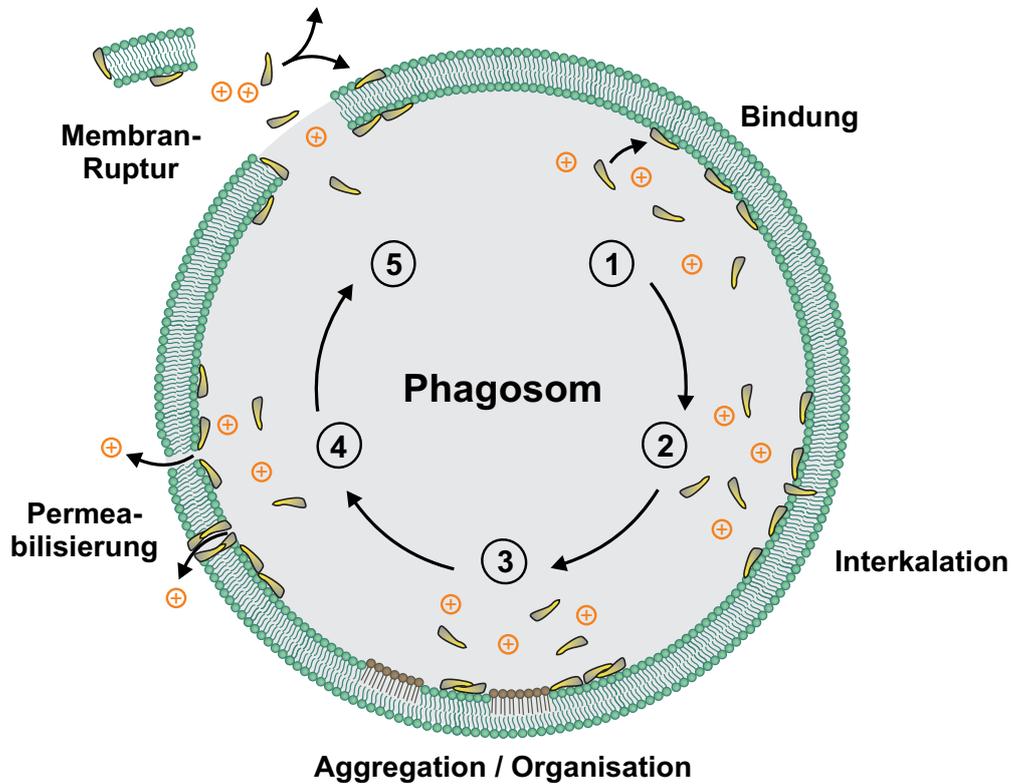


Abbildung 6.6

Für die Wechselwirkung von VapA mit der Phagosomenmembran vorgeschlagener fünfstufiger Wirkmechanismus. (1) In einem ersten Schritt bindet VapA an die Phagosomenmembran. Es kommt zu einer Beeinflussung verschiedener mechanischer Membraneigenschaften. (2) Für die Interkalation zwischen die Membranlipide ist eine niedrige lokale Oberflächenspannung notwendig. (3) VapA aggregiert auf beziehungsweise in der Membran oder organisiert sich in membranbedeckenden Domänen. Dadurch nimmt es Einfluss auf die Domänenorganisation der Membranlipide. (4) Eine Permeabilisierung der Phagosomenmembran durch definierte und undefinierte Läsionen ermöglicht es Protonen und Ionen, die Membran zu passieren und wirkt damit der Ansäuerung des Phagosoms entgegen. (5) Schließlich ist VapA in der Lage, die Stabilität der Membran soweit zu reduzieren, dass es zum lokalen oder globalen Zusammenbruch der Membran kommen kann.

Biosensormessungen, eine Rigidisierung der Membran festzustellen, die sich offensichtlich bei Erhöhung der PS-Konzentration verringerte. Dies kann möglicherweise durch eine stärkere Wechselwirkung von VapA mit den Membranlipiden erklärt werden, wodurch über die Veränderung des Strukturfaktors eine starke Krümmungsfrustration und damit eine Tendenz zu nichtlamellaren Lipidphasen induziert werden kann. Eine Konsequenz der Rigidisierung ist die Beeinflussung verschiedener mechanischer Membraneigenschaften, was letztendlich zu einer geringeren Fusionsfähigkeit der Phagosomenmembran mit Endosomen oder Lysosomen führen kann oder zu einer Beeinträchtigung von relevanten Interaktionen, Proteininterkalationen oder Signaltransduktionsprozessen an der Membran.

Eine partielle oder vollständige Interkalation von VapA zwischen die Membranlipide (Abbildung 6.6, (2)) wurde anhand von Filmwaagenexperimenten ausschließlich im Fall eines Lateraldrucks unterhalb des für natürliche Membranen angenommenen Werts beobachtet. Dies bedeutet, dass dieser Effekt vermutlich nur dort lokal auftreten kann, wo die Anforderung einer geringen Lipidpackungsdichte an die mechanischen Membraneigenschaften erfüllt ist. Da dies vermutlich nur für einen Teil der gebundenen VapA-Moleküle gegeben ist, ist von der gleichzeitigen Präsenz von interkalierten und gebundenen Proteinen auf der Membran auszugehen, welche dadurch unterschiedliche Wirkungen entfalten können. Eine Verbindung zu den Aspekten Organisation und Permeabilisierung ist wahrscheinlich. Als weitere mögliche Bedingung für das Erreichen eines interkalierten Zustands wurde auf der Grundlage fluoreszenzspektroskopischer Experimente mit kleinen Lipidvesikeln das Ausmaß beziehungsweise das Vorzeichen der Membrankrümmung diskutiert. Für die ebenfalls beobachtete Reduzierung der mittleren Lipidmolekülfläche bei höherem Lateraldruck wurde die Modifikation mechanischer Membraneigenschaften oder eine aktive Entfernung von Lipidmolekülen aus der Membran vorgeschlagen. Dies hätte weitere Konsequenzen für mögliche Permeabilisierungsmechanismen. Darüber hinaus konnte VapA keine Fusionsereignisse zwischen Lipidvesikeln induzieren.

Rasterkraftmikroskopische Messungen an festkörperunterstützten Monolayern und Bilayern wurden verwendet, um die Organisation von VapA an Modellmembranen aufzuklären (Abbildung 6.6, (3)). Für Monolayer zeigte sich die flächendeckende Bindung von VapA an cholesterolare Bereiche (L_α) durch die Bildung VapA-induzierter Domänen, die zunächst eine wurmartige Struktur aufwiesen und sich im weiteren Verlauf netzwerkartig organisierten. Diese Domänen scheinen bezüglich der L_α - und L_o -Domänen eine intermediäre Höhe zu besitzen und könnten prinzipiell direkt aus VapA-Molekülen oder durch Induzierung eines zusätzlichen Phasenzustands der Membranlipide gebildet werden. Bei reduziertem Lateraldruck erhielten die L_α -Bereiche eine granulare Strukturierung anstelle einer aufgelagerten Domänenstruktur, was im Sinn des interkalierten Zustands interpretiert werden kann. Zusätzlich traten innerhalb von L_α -Bereichen und innerhalb von Zwischenräumen der Unterstruktur der L_o -Domänen VapA-induzierte Aggregate in unterschiedlichen Größen auf, die entweder als reine Proteinaggregate, als Lipid-Protein-Mischaggregate oder aufgrund einer induzierten nichtlamellaren Phase als Lipidausstülpungen erklärt werden können und insbesondere die VapA-induzierten Domänen flankierten. Es wurden zudem Hinweise gefunden, dass VapA die Zuordnung der Membranlipide in L_α - und L_o -Domänen modifizieren könnte. Auf die L_o -Domänen konnte hauptsächlich für PS-haltige Membranen ein in einer lokalen Ausdünnung und Höhenänderung der Domänenunterstruktur bestehender Einfluss festgestellt werden, was eine generelle Präferenz für die L_α -Phase zeigt. In Bilayerexperimenten wurde darüber hinaus die Bildung höherer Domänen auf den L_o -Domänen sowohl für PS-haltige Membranen

als auch für ungeladene Membranen bei reduziertem pH-Wert beobachtet. Dieses trat allerdings erst nach einer längeren Inkubationszeit auf und ist ein Anhaltspunkt für eine sich zeitlich verändernde und intensivierende Wirkung von VapA, was eine Ursache der unterschiedlichen Permeabilisierungsarten darstellen kann. Die bei höherem pH-Wert an Bilayern beobachtete Bildung von niedrigeren Domänen in den L_α -Domänen liefern einen Hinweis auf die Beteiligung eines mit dem *Sinking-Raft*-Modell vergleichbaren Mechanismus. Die starke Reduzierung der Gesamtlänge der Domänengrenzen bei diesem Prozess lässt sich durch gegenüber den L_α -Domänen wesentlich veränderte mechanische Eigenschaften erklären. Schließlich wurde das Zusammenschließen von L_α -Domänen zu größeren Netzwerken als Beeinflussung der Linienspannung zwischen L_α - und L_σ -Domänen interpretiert. Dadurch kann sich ein Einfluss auf Fusions- und Abschnürungsprozesse an der Phagosomenmembran ergeben, was für VapA unter anderem einen möglichen Weg darstellt, das Phagosom zu verlassen.

Durch die elektrophysiologische Analyse von freistehenden Membranen konnte eine Membranpermeabilisierung festgestellt werden, welche geeignet ist, Protonen und Ionen den Durchtritt durch die Membran zu ermöglichen und damit dem Protonengradienten an der Phagosomenmembran entgegenzuwirken (Abbildung 6.6, (4)). Es wurden vier Läsionscharakteristika unterschieden. Definiert-transiente Läsionen zeichneten sich durch unterschiedliche, kurze Lebensdauern und kleine Porendurchmesser im Bereich weniger Nanometer aus. Als zugrundeliegenden Mechanismus erfordern sie eine direkte Beteiligung mehrerer VapA-Moleküle. Die definiert-transienten Läsionen traten hauptsächlich bei niedrigen pH-Werten auf. Hier kann möglicherweise eine Verbindung zu den bei niedrigem pH-Wert auftretenden Domänen im System der festkörperunterstützten Bilayer hergestellt werden. Das aus schweinevirulenten *R. equi*-Bakterien stammende Protein VapB führte dagegen auch bei höherem pH-Wert zu diesen Läsionen. Den zweiten Permeabilisierungstyp bilden undefiniert-heterogene Läsionen, deren Durchmesser mehrere Nanometer erreichen konnte. Sie werden vermutlich durch eine Destabilisierung der Membran durch VapA-Anreicherung auf der Membranoberfläche, also unter indirekter Beteiligung mehrerer VapA-Moleküle, gebildet. Die Lebensdauern der undefiniert-heterogenen Läsionen variierten stark, und mindestens bei großen Läsionen kam es zu einem abrupten Schließen. Als mögliche Erklärung wurde eine durch den Membrandurchtritt von VapA vermittelte Aufhebung der Asymmetrie als Ursache der Läsionsbildung diskutiert. Weitere beobachtete Läsionstypen sind stufenförmig-stabile Läsionen, deren Charakteristik mit der Membranpermeabilisierung durch Porine vergleichbar ist, sowie teilpermanente Läsionen, die sich durch einen abrupten Öffnungsvorgang und eine hohe Stabilität auszeichnen. Nach einer Spannungserhöhung verzögert auftretende Intensivierungen der Permeabilisierung könnten auf einem Einfluss der Transmembranspannung auf den Übergang zwischen dem gebundenen und interkalierten Zustand zurückgeführt werden. Die Verringerung des pH-Werts führte zu einem deutlichen Anstieg der Porengröße und zu einer Intensivierung der Läsionsbildung, was eine Regulierung der Aktivität von VapA durch die fortschreitende Phagosomenreifung nahelegt. Darüber hinaus war ein leichter Anstieg der Porengröße mit zunehmender Inkubationszeit zu verzeichnen, dies kann als weitere Bestätigung eines kollektiven Wirkmechanismus gewertet werden. Im Vergleich mit der durch das prozessierte Protein VapA p12 vermittelten Permeabilisierung konnte kein Unterschied gefunden werden. Das C-terminale, konservierte Fragment von VapA ist also für den Prozess der Läsionsbildung verantwortlich, die Prozessierung ist hierfür allerdings nicht notwendig.

Der Zusammenbruch der Membranen, häufig durch eine massive undefiniert-heterogene

Läsion, in sämtlichen elektrophysiologischen Experimenten zeigt, dass der durch VapA auf die Membran ausgeübte Einfluss ausreichen kann, um die gesamte Integrität der Phagosomenmembran maßgeblich zu beeinträchtigen (Abbildung 6.6, (5)). Es ergaben sich außerdem Hinweise auf einen von der Konzentration und zusätzlich der Inkubationszeit abhängigen Permeabilisierungsmechanismus. Insgesamt eröffnet die lokale Zerstörung der Membran einen weiteren Mechanismus, durch welchen VapA, andere bakterielle Moleküle und schließlich auch *R. equi* selbst aus dem Phagosom gelangen könnten.

Die wegen der hohen Sequenzhomologie zu VapB auch für VapA p12 angenommene, von Geerds et al. [2014] aufgeklärte Struktur von VapB p12 besteht in einem aus zwei Mäander-Motiven gebildeten, achtsträngigen β -Fass, welches von unten durch eine einzelne α -Helix verschlossen wird. Die sich an der Unterseite befindenden polaren Seitenketten [Geerds et al., 2014] kommen ebenso für eine Bindung an die Membran infrage wie die α -Helix oder die von Geerds et al. [2014] spekulativ genannte, unter flexiblen Schleifen auf der Oberseite verborgene Bindetasche. Trotz der zylindrischen Architektur kommt eine Durchlässigkeit für Protonen im Zentrum des Moleküls nicht infrage. Insofern sind die kollektiv vermittelte Destabilisierung auf der einen Seite und die definierte, durch Oligomerisierung oder Lipid-Protein-Aggregation vermittelte Porenbildung auf der anderen Seite plausible Mechanismen, die zur Permeabilisierung der Phagosomenmembran führen können.

VapA ist also in der Lage, an verschiedenen Punkten mit dem Prozess der Phagosomenreifung zu interagieren. Dies betrifft einerseits die Beeinflussung der mechanischen Eigenschaften der Phagosomenmembran, wodurch es zur Inhibition unterschiedlicher Prozesse bis hin zur Fusion mit Lysosomen und Endosomen kommen kann. Desweiteren stellt die Permeabilisierung der Phagosomenmembran einen effektiven Regulierungsmechanismus zur Kontrolle des phagosomalen pH-Werts dar. Der Austritt von VapA aus dem Phagosom, entweder durch große Läsionen oder innerhalb von vesikulären Abschnürungen, bildet eine Möglichkeit zur Beeinflussung weiterer Faktoren der Immunabwehr von der Manipulation von Lysosomen und Endosomen bis hin zu einer Einflussnahme auf die Antigenpräsentation auf der Zellmembran [Teitelbaum et al., 1999]. Die potentielle Wechselwirkung mit der Lysosomenmembran [von Bargen, 2010, S. 112] stellt einen für die Wirtszelle kritischen Mechanismus dar, da eine Permeabilisierung von Lysosomen zur Nekrose der Zelle führen kann [Rodríguez-Muela et al., 2015]. Prinzipiell kann VapA sogar in der Lage sein, auch die Zellmembran als Barriere zu überwinden und seinen Einfluss so auf weitere Wirtszellen auszudehnen. Darauf deuten auch Beobachtungen von Takai et al. [1991a] hin, die VapA auch im Kulturüberstand identifizieren konnten. Die Wechselwirkung von VapA mit der Phagosomenmembran stellt somit einen wichtigen, wenn nicht sogar notwendigen Beitrag bei der Bildung der REV dar. Damit bestätigt der in dieser Arbeit herausgearbeitete Wirkmechanismus in weiten Teilen die von K. von Bargen [2010, S. 115] vermutete Rolle von VapA während der Phagosomenreifung.

Die verschiedenen und miteinander in Beziehung stehenden Aspekte des Wirkmechanismus, die in der vorliegenden Arbeit charakterisiert werden konnten, bieten viele Ansatzpunkte für weitere zukünftige Untersuchungen.

Bezüglich der Bindung kann die Abhängigkeit vom PS-Anteil der Membran bei niedrigen PS-Konzentrationen mit weiteren Biosensormessungen vertieft und verifiziert werden. Dabei kann eine Spezifität für weitere Membranlipide einbezogen und geklärt werden, ob die beobachtete Spezifität auch für andere negativ geladene Lipide auftritt. Es bietet sich weiter an, die Abhängigkeit der Rigidisierung vom Anteil der Neutrallipide und

von möglichen weiteren Membranlipiden des Phagosoms systematisch zu analysieren. Um das Verständnis des genauen Bindungsmechanismus weiter zu verbessern, kann ein möglicher Einfluss der Lipidmodifikation auf die Bindung durch zusätzliche Messungen mit VapA p12 analysiert werden. Darüber hinaus sind weitere Untersuchungen mit dem Protein VapA p12 bezüglich der möglichen Konsequenzen der Prozessierung auf den Wirkmechanismus vorgesehen.

Die Vermutung, dass die Membrankrümmung einen Einfluss auf die Interaktion von VapA hat, kann an porenüberspannenden Membranen überprüft werden. Durch die Verwendung unterschiedlicher Salzkonzentrationen kann nach Gleisner et al. [2014] ein osmotischer Druck erzeugt werden, durch welchen sich unterschiedliche Membrankrümmungen einstellen lassen.

Einen weiteren Aspekt stellt die vermutete Inhibierung von Fusionsereignissen durch VapA dar. Eine Inhibition kann beispielsweise an fluoreszenzspektroskopischen Messungen mit einer zusätzlichen Membranfusionen induzierenden Substanz gezeigt werden.

Für die Aufklärung eines möglichen Einflusses auf die Linienspannung an den Grenzen zwischen L_{α} - und L_o -Domänen bietet sich ein statistischer Vergleich zwischen Domänenfläche und Domänengrenze. Hierfür sind zusätzliche LB-Filme mit unterschiedlichen VapA-Konzentrationen notwendig, die darüber hinaus Aufschluss über die speziell bei sehr hohen und niedrigen Konzentrationen auftretenden Effekte geben können.

Von großem Interesse für die Beurteilung der an LB-Filmen gewonnenen Erkenntnisse ist außerdem die Dynamik der Prozesse, die unter anderem zu VapA-induzierten Domänen und Aggregaten führen. Hierfür bietet die Kombination der Filmwaage mit einem Fluoreszenzmikroskop eine ausgezeichnete Möglichkeit, da die sich ausbildenden Strukturen sowohl am flüssigkeitsgestützten als auch am festkörpergestützten Monolayer direkt miteinander verglichen werden können. Eine solche Untersuchung könnte zudem weitere Hinweise auf die genaue Lokalisierung von VapA und auf die nicht abschließend geklärte Beteiligung von Membranlipiden an den beobachteten Strukturen liefern. Außerdem könnte die Aussagekraft der AFM-Messungen an LB-Filmen durch zwei LB-Überträge desselben Monolayers vor und nach der Injektion von VapA erhöht werden.

Eine weitere Methode zur Lokalisierung von VapA ist die Funktionalisierung des AFM-*Cantilevers* mit VapA-Antikörpern. Andersherum kann die Kopplung von VapA an die *Cantilever*-Spitze Aufschluss über die Bindungsaffinität von VapA für unterschiedliche Membrandomänen geben. Schließlich ist auch die quantitative Bestimmung mechanischer Membraneigenschaften mit dem AFM möglich, sodass sich die Möglichkeit bietet, deren Beeinflussung durch VapA unter verschiedenen Bedingungen zu analysieren.

Röntgenkleinwinkelstreuung bietet sich als Methode an, um den Einfluss von VapA auf die intrinsische Membrankrümmung und die mögliche Tendenz zur Bildung nichtlamellarer Lipidphasen zu beleuchten.

Die elektrophysiologischen Messungen zur Membranpermeabilisierung können um eine Untersuchung des Einflusses von hohen und niedrigen Proteinkonzentrationen erweitert werden. Zum Einfluss negativ geladener Lipide auf die Permeabilisierung liegen bereits Daten vor, die in Hinblick auf weitere für die Phagosomenmembran relevante Lipidspezies erweitert werden können. Der allgemeine Wirkmechanismus kann im Montal-Mueller Aufbau zumindest theoretisch auf einen möglicherweise vorliegenden Self-Promoted-Uptake-Mechanismus hin untersucht werden, indem durch die Membran getretene VapA-Moleküle im Medium des zweiten Kompartiments nachgewiesen werden. Auch die Auslösung von Lipid- oder Lipid-Protein-Aggregaten aus der Membran könnte prinzipiell mit diesem

Ansatz belegt werden. Alternativ ist dieser Nachweis auch mit Hilfe der Kernspinresonanzspektroskopie möglich, wie Henzler Wildman et al. [2003] für den Mechanismus von LL-32 demonstriert haben.

Es konnten bereits viele Hinweise auf unterschiedliche Orientierungen von VapA auf Modellmembranen gesammelt werden, sei es der Übergang vom gebundenen in den interkalierten Zustand, die Bildung von Oligomeren oder von Lipid-Protein-Aggregaten. Als nächster Schritt ist eine Untersuchung der Proteinorientierung mittels orientiertem Zirkulardichroismus geplant, um die Bedingungen für einen solchen Übergang herauszuarbeiten. Erste vielversprechende Probemessungen wurden bereits in Zusammenarbeit mit Dr. Jochen Bürck vom Karlsruher Institut für Technologie durchgeführt.

Mit Röntgenreflektivitätsexperimenten an festkörperunterstützten Bilayern am Deutschen Elektronen-Synchrotron konnte in ersten Messungen keine Wirkung von VapA an den Bilayern festgestellt werden. Durch eine Anpassung der Probenpräparation von Lipid-multilayern ist es möglich, das Protein in teilhydratisierten Multilayern zu präparieren, sodass eine Detektion von Veränderungen der Membrandicke oder Abweichungen von der lamellaren Struktur sensitiver detektiert werden können und eine weitere Nutzung dieser Methode wieder erfolgversprechend ist.

Um den Zusammenhang der am Modellsystem gesammelten Erkenntnisse mit der Situation an der Phagosomenmembran herzustellen, sind Experimente mit aus Phagosomen hergestellten Membranpatches oder mit intakten Phagosomen essentiell. Hier sind speziell die Untersuchung der mechanischen Eigenschaften und der Organisation von VapA auf der Membran mit rasterkraftmikroskopischen Messungen vielversprechende Ansätze. Dies könnte auch weitere Hinweise auf den Übergang von VapA vom gebundenen in den interkalierten Zustand geben. Eine große Herausforderung für zukünftige Untersuchungen ist die in diesem Zusammenhang notwendige Klassifizierung der Lipidzusammensetzung von Phagosomen und REV zu verschiedenen Zeitpunkten der Phagosomenreifung, auch im Hinblick auf unterschiedliche Wirte.

6.6 Schlussbemerkung

Die Wirkung von VapA auf Lipidmembranen hat sich als hochkomplex herausgestellt. Es besteht eine Sensitivität für den Ladungszustand der Membran, für den Phasenzusand, den Lateraldruck und nicht zuletzt für den pH-Wert. Zusammen mit der sehr dynamisch regulierten und dem Prozess der Phagosomenreifung unterworfenen Phagosomenmembran ergeben sich eine Vielzahl von Konsequenzen, aber mindestens ebenso viele ungeklärte oder bisher nur ansatzweise geklärte Zusammenhänge, die den Gegenstand zukünftiger Untersuchungen bilden müssen. Wie in Kapitel 3 ausgeführt wurde, bildet die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Wechselwirkung zwischen VapA und der Phagosomenmembran lediglich eine von mehreren Interaktionsmöglichkeiten für VapA und dieses nur ein Protein eines mit allen Umgebungsbedingungen und Angriffsmechanismen des Phagosoms wechselwirkenden Bakteriums und dieses wiederum nur einen einzelnen Krankheitserreger einer regelrechten Armada von pathogenen Mikroorganismen und Umwelteinflüssen, denen sich das Immunsystem des menschlichen Organismus unaufhörlich zur Wehr setzen muss. Trotzdem oder gerade deswegen ist es notwendig, sich mit dem Einzelnen auseinanderzusetzen, um das Verständnis des komplexen Ganzen weiter auszubauen.

Literaturverzeichnis

- [Abramson et al. 1964] ABRAMSON, Morris B. ; KATZMAN, Robert ; GREGOR, Harry P.: Aqueous dispersions of phosphatidylserine ionic properties. In: *Journal of Biological Chemistry* 239 (1964), Nr. 1, S. 70–76
- [Aderem 2003] ADEREM, Alan: Phagocytosis and the inflammatory response. In: *Journal of Infectious Diseases* 187 (2003), Nr. Supplement 2, S. S340–5
- [Adrian und Almers 1976] ADRIAN, RH ; ALMERS, W: The voltage dependence of membrane capacity. In: *The Journal of physiology* 254 (1976), Nr. 2, S. 317–338
- [Agirre et al. 2002] AGIRRE, Aitziber ; BARCO, Angel ; CARRASCO, Luis ; NIEVA, José L.: Viroporin-mediated Membrane Permeabilization pore formation by nonstructural poliovirus 2B protein. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002), Nr. 43, S. 40434–40441
- [Albrecht et al. 1978] ALBRECHT, O ; GRULER, H ; SACKMANN, E: Polymorphism of phospholipid monolayers. In: *Journal de Physique* 39 (1978), Nr. 3, S. 301–313
- [Almog und Mannella 1996] ALMOG, Rami ; MANNELLA, Carmen A.: Molecular packing of cord factor and its interaction with phosphatidylinositol in mixed monolayers. In: *Biophysical journal* 71 (1996), Nr. 6, S. 3311–3319
- [Alvarez und Latorre 1978] ALVAREZ, O ; LATORRE, R: Voltage-dependent capacitance in lipid bilayers made from monolayers. In: *Biophysical journal* 21 (1978), Nr. 1, S. 1
- [Anantharam et al. 2012] ANANTHARAM, Arun ; AXELROD, Daniel ; HOLZ, Ronald W.: Real-time imaging of plasma membrane deformations reveals pre-fusion membrane curvature changes and a role for dynamin in the regulation of fusion pore expansion. In: *Journal of neurochemistry* 122 (2012), Nr. 4, S. 661–671
- [Anderluh und Lakey 2008] ANDERLUH, Gregor ; LAKEY, Jeremy H.: Disparate proteins use similar architectures to damage membranes. In: *Trends in biochemical sciences* 33 (2008), Nr. 10, S. 482–490
- [Ando 2012] ANDO, Toshio: High-speed atomic force microscopy coming of age. In: *Nanotechnology* 23 (2012), Nr. 6, S. 062001
- [Andrä et al. 2008] ANDRÄ, Jörg ; BÖHLING, Arne ; GRONEWOLD, Thomas M. ; SCHLECHT, Ulrich ; PERPEET, Markus ; GUTSMANN, Thomas: Surface acoustic wave biosensor as a tool to study the interaction of antimicrobial peptides with phospholipid and lipopolysaccharide model membranes. In: *Langmuir* 24 (2008), Nr. 16, S. 9148–9153
- [Andre et al. 2011] ANDRE, Guillaume ; DEGHOAIN, Marie ; BRON, Peter A. ; SWAM, Iris I. ; KLEEREBEZEM, Michiel ; HOLS, Pascal ; DUFRÊNE, Yves F.: Fluorescence and atomic force microscopy imaging of wall teichoic acids in *Lactobacillus plantarum*. In: *ACS chemical biology* 6 (2011), Nr. 4, S. 366–376

- [Antonietti und Förster 2003] ANTONIETTI, Markus ; FÖRSTER, Stephan: Vesicles and liposomes: a self-assembly principle beyond lipids. In: *Advanced Materials* 15 (2003), Nr. 16, S. 1323–1333
- [Arнау 2008] ARNAU, Antonio: *Piezoelectric transducers and applications*. Springer, 2008. – ISBN 3540775072
- [Axelrod et al. 2008] AXELROD, S. ; OSCHKINAT, H. ; ENDERS, J. ; SCHLEGEL, B. ; BRINKMANN, V. ; KAUFMANN, S. H. ; HAAS, A. ; SCHAIBLE, U. E.: Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. In: *Cell Microbiol* 10 (2008), Nr. 7, 1530-45
- [Bajno et al. 2000] BAJNO, Lydia ; PENG, Xiao-Rong ; SCHREIBER, Alan D. ; MOORE, Hsiao-Ping ; TRIMBLE, William S. ; GRINSTEIN, Sergio: Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation. In: *The Journal of cell biology* 149 (2000), Nr. 3, S. 697–706
- [Ball und Rice 1992] BALL, Frank G. ; RICE, John A.: Stochastic models for ion channels: introduction and bibliography. In: *Mathematical biosciences* 112 (1992), Nr. 2, S. 189–206
- [Bangham et al. 1965] BANGHAM, AD ; STANDISH, Malcolm M. ; WATKINS, JC: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. In: *Journal of molecular biology* 13 (1965), Nr. 1, S. 238–IN27
- [von Bargaen 2010] BARGEN, K. von: *Virulence Mechanisms of the Intracellular Pathogen Rhodococcus equi and its Interaction with Activated Macrophages*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Thesis, 2010
- [von Bargaen und Haas 2009] BARGEN, K. von ; HAAS, A.: Molecular and infection biology of the horse pathogen Rhodococcus equi. In: *FEMS Microbiol Rev* 33 (2009), Nr. 5, 870-91
- [von Bargaen et al. 2009] BARGEN, K. von ; POLIDORI, M. ; BECKEN, U. ; HUTH, G. ; PRESCOTT, J. F. ; HAAS, A.: Rhodococcus equi virulence-associated protein A is required for diversion of phagosome biogenesis but not for cytotoxicity. In: *Infect Immun* 77 (2009), Nr. 12, 5676-81
- [von Bargaen et al. 2011] BARGEN, Kristine von ; WOHLMANN, Jens ; TAYLOR, Gregory A. ; UTERMÖHLEN, Olaf ; HAAS, Albert: Nitric oxide-mediated intracellular growth restriction of pathogenic Rhodococcus equi can be prevented by iron. In: *Infection and immunity* 79 (2011), Nr. 5, S. 2098–2111
- [Baumgart et al. 2007] BAUMGART, Tobias ; HUNT, Geoff ; FARKAS, Elaine R. ; WEBB, Watt W. ; FEIGENSON, Gerald W.: Fluorescence probe partitioning between L_o/L_d phases in lipid membranes. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1768 (2007), Nr. 9, S. 2182–2194
- [Becken et al. 2010] BECKEN, Ulrike ; JESCHKE, Andreas ; VELTMAN, Katharina ; HAAS, Albert: Cell-free fusion of bacteria-containing phagosomes with endocytic compartments. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (2010), Nr. 48, S. 20726–20731

- [Beerlink et al. 2009] BEERLINK, A ; MELL, M ; TOLKIEHN, M ; SALDITT, T: Hard x-ray phase contrast imaging of black lipid membranes. In: *Applied Physics Letters* 95 (2009), Nr. 20, S. 203703
- [Beerlink et al. 2008] BEERLINK, André ; WILBRANDT, P-J ; ZIEGLER, E ; CARBONE, D ; METZGER, TH ; SALDITT, Tim: X-ray structure analysis of free-standing lipid membranes facilitated by micromachined apertures. In: *Langmuir* 24 (2008), Nr. 9, S. 4952–4958
- [Behlke et al. 2005] BEHLKE, Mark A. ; HUANG, Lingyan ; BOGH, Lisa ; ROSE, Scott ; DEVOR, Eric J.: Fluorescence and fluorescence applications. In: *Integrated DNA Technologies* (2005), S. 1–13
- [Benoit et al. 2002] BENOIT, S. ; BENACHOUR, A. ; TAOUJI, S. ; AUFRAY, Y. ; HARTKE, A.: H₂O₂, Which Causes Macrophage-Related Stress, Triggers Induction of Expression of Virulence-Associated Plasmid Determinants in *Rhodococcus equi*. In: *Infection and Immunity* 70 (2002), Nr. 7, S. 3768–3776
- [Benoit et al. 2001] BENOIT, Stéphanie ; BENACHOUR, Abdellah ; TAOUJI, Said ; AUFRAY, Yanick ; HARTKE, Axel: Induction of vap genes encoded by the virulence plasmid of *Rhodococcus equi* during acid tolerance response. In: *Research in microbiology* 152 (2001), Nr. 5, S. 439–449
- [Benoit et al. 2000] BENOIT, Stéphanie ; TAOUJI, Said ; BENACHOUR, Abdellah ; HARTKE, Axel: Resistance of *Rhodococcus equi* to acid pH. In: *International journal of food microbiology* 55 (2000), Nr. 1, S. 295–298
- [Benz et al. 1978] BENZ, R ; JANKO, K ; BOOS, W ; LÄUGER, P: Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 511 (1978), Nr. 3, S. 305–319
- [Beutler 2004] BEUTLER, Bruce: Innate immunity: an overview. In: *Molecular immunology* 40 (2004), Nr. 12, S. 845–859
- [Beyenbach und Wieczorek 2006] BEYENBACH, Klaus W. ; WIECZOREK, Helmut: The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. In: *Journal of Experimental Biology* 209 (2006), Nr. 4, S. 577–589
- [Binnig et al. 1986] BINNIG, Gerd ; QUATE, Calvin F. ; GERBER, Ch: Atomic force microscope. In: *Physical review letters* 56 (1986), Nr. 9, S. 930
- [Binnig et al. 1982] BINNIG, Gerd ; ROHRER, Heinrich ; GERBER, Ch ; WEIBEL, E: Surface studies by scanning tunneling microscopy. In: *Physical review letters* 49 (1982), Nr. 1, S. 57
- [Blander und Medzhitov 2006] BLANDER, J M. ; MEDZHITOV, Ruslan: On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. In: *Nature immunology* 7 (2006), Nr. 10, S. 1029–1035
- [Blodgett 1934] BLODGETT, Katharine B.: Monomolecular films of fatty acids on glass. In: *Journal of the American Chemical Society* 56 (1934), Nr. 2, S. 495–495

- [Blume 1979] BLUME, Alfred: A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 557 (1979), Nr. 1, S. 32–44
- [Blumenthal et al. 1970] BLUMENTHAL, Robert ; CHANGEUX, Jean-Pierre ; LEFEVER, René: Membrane excitability and dissipative instabilities. In: *The Journal of Membrane Biology* 2 (1970), Nr. 1, S. 351–374
- [Bohdanowicz und Grinstein 2013] BOHDANOWICZ, Michal ; GRINSTEIN, Sergio: Role of phospholipids in endocytosis, phagocytosis, and macropinocytosis. In: *Physiological reviews* 93 (2013), Nr. 1, S. 69–106
- [Bonifacino und Glick 2004] BONIFACINO, Juan S. ; GLICK, Benjamin S.: The mechanisms of vesicle budding and fusion. In: *Cell* 116 (2004), Nr. 2, S. 153–166
- [Boon und Smith 2002] BOON, J. M. ; SMITH, B. D.: Chemical control of phospholipid distribution across bilayer membranes. In: *Med Res Rev* 22 (2002), Nr. 3, 251–81
- [Born 1920] BORN, Max: Volumen und hydrationswärme der ionen. In: *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei* 1 (1920), Nr. 1, S. 45–48
- [Borner et al. 1994] BORNER, Christoph ; MARTINO, Isabelle ; MATTMANN, Chantal ; IRMLER, Martin ; SCHAERER, Esther ; MARTINO, Jean-Claude ; TSCHOPP, Jörg: The protein bcl-2 alpha does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis. In: *The Journal of Cell Biology* 126 (1994), Nr. 4, S. 1059–1068
- [Botelho und Grinstein 2011] BOTELHO, Roberto J. ; GRINSTEIN, Sergio: Phagocytosis. In: *Current Biology* 21 (2011), Nr. 14, S. R533–R538
- [Bovill 2000] BOVILL, James G.: Mechanisms of anaesthesia: Time to say farewell to the meyer-overton rule. In: *Current Opinion in Anesthesiology* 13 (2000), Nr. 4, S. 433–436
- [Brady 1949] BRADY, AP: Surface films of soluble detergents. In: *Journal of colloid science* 4 (1949), Nr. 4, S. 417–424
- [Brennan und Nikaido 1995] BRENNAN, Patrick J. ; NIKAIDO, Hiroshi: The envelope of mycobacteria. In: *Annual review of biochemistry* 64 (1995), Nr. 1, S. 29–63
- [Brian und McConnell 1984] BRIAN, Adrienne A. ; MCCONNELL, Harden M.: Allogeneic stimulation of cytotoxic T cells by supported planar membranes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81 (1984), Nr. 19, S. 6159–6163
- [Brinkmann et al. 2004] BRINKMANN, Volker ; REICHARD, Ulrike ; GOOSMANN, Christian ; FAULER, Beatrix ; UHLEMANN, Yvonne ; WEISS, David S. ; WEINRAUCH, Yvette ; ZYCHLINSKY, Arturo: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. In: *science* 303 (2004), Nr. 5663, S. 1532–1535
- [Brogden 2005] BROGDEN, K. A.: Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? In: *Nat Rev Microbiol* 3 (2005), Nr. 3, 238–50
- [Bromley et al. 2001] BROMLEY, Shannon K. ; BURACK, W R. ; JOHNSON, Kenneth G. ; SOMERSALO, Kristina ; SIMS, Tasha N. ; SUMEN, Cenk ; DAVIS, Mark M. ; SHAW, Andrey S. ; ALLEN, Paul M. ; DUSTIN, Michael L.: The immunological synapse. In: *Annual review of immunology* 19 (2001), Nr. 1, S. 375–396

- [Brown und London 1998] BROWN, DA ; LONDON, E: Functions of lipid rafts in biological membranes. In: *Annual review of cell and developmental biology* 14 (1998), Nr. 1, S. 111–136
- [Butterfield und Lashuel 2010] BUTTERFIELD, Sara M. ; LASHUEL, Hilal A.: Amyloidogenic protein–membrane interactions: mechanistic insight from model systems. In: *Angewandte Chemie International Edition* 49 (2010), Nr. 33, S. 5628–5654
- [Byrne et al. 2001] BYRNE, Barbara A. ; PRESCOTT, John F. ; PALMER, Guy H. ; TAKAI, Shinji ; NICHOLSON, Vivian M. ; ALPERIN, Debra C. ; HINES, Stephen A.: Virulence Plasmid of *Rhodococcus equi* Contains Inducible Gene Family Encoding Secreted Proteins. In: *Infection and immunity* 69 (2001), Nr. 2, S. 650–656
- [Cantor 1997] CANTOR, Robert S.: Lateral pressures in cell membranes: a mechanism for modulation of protein function. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 101 (1997), Nr. 10, S. 1723–1725
- [Catalão et al. 2013] CATALÃO, Maria J. ; GIL, Filipa ; MONIZ-PEREIRA, Jose ; SAO-JOSE, Carlos ; PIMENTEL, Madalena: Diversity in bacterial lysis systems: bacteriophages show the way. In: *FEMS microbiology reviews* 37 (2013), Nr. 4, S. 554–571
- [Cevc 1990] CEVC, Gregor: Membrane electrostatics. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 1031 (1990), Nr. 3, S. 311–382
- [Cevc und Richardsen 1999] CEVC, Gregor ; RICHARDSEN, Holger: Lipid vesicles and membrane fusion. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 38 (1999), Nr. 3, S. 207–232
- [Chan und Boxer 2007] CHAN, Yee-Hung M. ; BOXER, Steven G.: Model membrane systems and their applications. In: *Current opinion in chemical biology* 11 (2007), Nr. 6, S. 581–587
- [Chanturiya et al. 1997] CHANTURIYA, Alexandr ; CHERNOMORDIK, Leonid V. ; ZIMMERBERG, Joshua: Flickering fusion pores comparable with initial exocytotic pores occur in protein-free phospholipid bilayers. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (1997), Nr. 26, S. 14423–14428
- [Chen et al. 2003] CHEN, Fang-Yu ; LEE, Ming-Tao ; HUANG, Huey W.: Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. In: *Biophysical journal* 84 (2003), Nr. 6, S. 3751–3758
- [Chen et al. 2007] CHEN, L. ; YU, Z. ; QUINN, P. J.: The partition of cholesterol between ordered and fluid bilayers of phosphatidylcholine: a synchrotron X-ray diffraction study. In: *Biochim Biophys Acta* 1768 (2007), Nr. 11, 2873–81
- [Cheng und London 2009] CHENG, Hui-Ting ; LONDON, Erwin: Preparation and properties of asymmetric vesicles that mimic cell membranes effect upon lipid raft formation and transmembrane helix orientation. In: *Journal of Biological Chemistry* 284 (2009), Nr. 10, S. 6079–6092
- [Chernomordik und Kozlov 2008] CHERNOMORDIK, Leonid V. ; KOZLOV, Michael M.: Mechanics of membrane fusion. In: *Nature structural & molecular biology* 15 (2008), Nr. 7, S. 675–683

- [Cherry 1979] CHERRY, Richard J.: Rotational and lateral diffusion of membrane proteins. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 559 (1979), Nr. 4, S. 289–327
- [Chipuk und Green 2008] CHIPUK, Jerry E. ; GREEN, Douglas R.: How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? In: *Trends in cell biology* 18 (2008), Nr. 4, S. 157–164
- [Cho und Stahelin 2005] CHO, Wonhwa ; STAHELIN, Robert V.: Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. In: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34 (2005), S. 119–151
- [Claus et al. 1998] CLAUS, Volker ; JAHRAUS, Andrea ; TJELLE, Torunn ; BERG, Trond ; KIRSCHKE, Heidrun ; FAULSTICH, Heinz ; GRIFFITHS, Gareth: Lysosomal Enzyme Trafficking between Phagosomes, Endosomes, and Lysosomes in J774 Macrophages - Enrichment of Cathepsin H in early Endosomes. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998), Nr. 16, S. 9842–9851
- [Clegg 1995] CLEGG, Robert M.: Fluorescence resonance energy transfer. In: *Current opinion in biotechnology* 6 (1995), Nr. 1, S. 103–110
- [Clemens und Horwitz 1995] CLEMENS, Daniel L. ; HORWITZ, Marcus A.: Characterization of the Mycobacterium tuberculosis phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. In: *The Journal of experimental medicine* 181 (1995), Nr. 1, S. 257–270
- [Colom et al. 2013] COLOM, Adai ; CASUSO, Ignacio ; RICO, Felix ; SCHEURING, Simon: A hybrid high-speed atomic force–optical microscope for visualizing single membrane proteins on eukaryotic cells. In: *Nature communications* 4 (2013)
- [Contreras et al. 2010] CONTRERAS, F-Xabier ; SÁNCHEZ-MAGRANER, Lissete ; ALONSO, Alicia ; GOÑI, Félix M.: Transbilayer (flip-flop) lipid motion and lipid scrambling in membranes. In: *FEBS letters* 584 (2010), Nr. 9, S. 1779–1786
- [Cowland et al. 1995] COWLAND, Jack B. ; JOHNSEN, Anders H. ; BORREGAARD, Niels: hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. In: *FEBS letters* 368 (1995), Nr. 1, S. 173–176
- [Cracraft 2002] CRACRAFT, Joel: The seven great questions of systematic biology: an essential foundation for conservation and the sustainable use of biodiversity. In: *Annals of the Missouri Botanical Garden* (2002), S. 127–144
- [Cuellar-Mata et al. 2002] CUELLAR-MATA, Patricia ; JABADO, Nada ; LIU, Jun ; FURUYA, Wendy ; FINLAY, B B. ; GROS, Philippe ; GRINSTEIN, Sergio: Nramp1 modifies the fusion of Salmonella typhimurium-containing vacuoles with cellular endomembranes in macrophages. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002), Nr. 3, S. 2258–2265
- [Damiani et al. 2004] DAMIANI, María T. ; PAVAROTTI, Martín ; LEIVA, Natalia ; LINDSAY, Andrew J. ; MCCAFFREY, Mary W. ; COLOMBO, Maria I.: Rab coupling protein associates with phagosomes and regulates recycling from the phagosomal compartment. In: *Traffic* 5 (2004), Nr. 10, S. 785–797

- [Danielli und Davson 1935] DANIELLI, James F. ; DAVSON, Hugh: A contribution to the theory of permeability of thin films. In: *Journal of cellular and comparative physiology* 5 (1935), Nr. 4, S. 495–508
- [Darrah et al. 2000] DARRAH, Patricia A. ; HONDALUS, Mary K. ; CHEN, Quiping ; ISCHIROPOULOS, Harry ; MOSSER, David M.: Cooperation between reactive oxygen and nitrogen intermediates in killing of *Rhodococcus equi* by activated macrophages. In: *Infection and immunity* 68 (2000), Nr. 6, S. 3587–3593
- [De Almeida et al. 2003] DE ALMEIDA, Rodrigo F. ; FEDOROV, Aleksandre ; PRIETO, Manuel: Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. In: *Biophysical journal* 85 (2003), Nr. 4, S. 2406–2416
- [De Gier 1992] DE GIER, J: Permeability barriers formed by membrane lipids. In: *Bioelectrochemistry and bioenergetics* 27 (1992), Nr. 1, S. 1–10
- [Deamer und Bramhall 1986] DEAMER, David W. ; BRAMHALL, John: Permeability of lipid bilayers to water and ionic solutes. In: *Chemistry and physics of lipids* 40 (1986), Nr. 2, S. 167–188
- [Demel et al. 1975] DEMEL, RA ; VAN KESSEL, WSM G. ; ZWAAL, RFA ; ROELOFSEN, B ; VAN DEENEN, LLM: Relation between various phospholipase actions on human red cell membranes and the interfacial phospholipid pressure in monolayers. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 406 (1975), Nr. 1, S. 97–107
- [Desjardins 1995] DESJARDINS, M.: Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. In: *Trends Cell Biol* 5 (1995), Nr. 5, S. 183–186
- [Desjardins 2003] DESJARDINS, Michel: ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. In: *Nature Reviews Immunology* 3 (2003), Nr. 4, S. 280–291
- [Desjardins et al. 1994a] DESJARDINS, Michel ; CELIS, Julio E. ; VAN MEER, G ; DIEPLINGER, Hans ; JAHRAUS, Andrea ; GRIFFITHS, Gareth ; HUBER, Lukas A.: Molecular characterization of phagosomes. In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994), Nr. 51, S. 32194–32200
- [Desjardins et al. 1994b] DESJARDINS, Michel ; HUBER, Lukas A. ; PARTON, Robert G. ; GRIFFITHS, Gareth: Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. In: *The Journal of cell biology* 124 (1994), Nr. 5, S. 677–688
- [Desjardins et al. 1997] DESJARDINS, Michel ; NZALA, Nsumu N. ; CORSINI, Rachel ; RONDEAU, Christiane: Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. In: *Journal of cell science* 110 (1997), Nr. 18, S. 2303–2314
- [Devaux et al. 2008] DEVAUX, Philippe F. ; HERRMANN, Andreas ; OHLWEIN, Nina ; KOZLOV, Michael M.: How lipid flippases can modulate membrane structure. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1778 (2008), Nr. 7, S. 1591–1600
- [Devaux und Morris 2004] DEVAUX, Philippe F. ; MORRIS, Roger: Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. In: *Traffic* 5 (2004), Nr. 4, S. 241–246

- [Di Paolo und De Camilli 2006] DI PAOLO, Gilbert ; DE CAMILLI, Pietro: Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. In: *Nature* 443 (2006), Nr. 7112, S. 651–657
- [Dietrich et al. 2001] DIETRICH, C ; BAGATOLLI, LA ; VOLOVYK, ZN ; THOMPSON, NL ; LEVI, M ; JACOBSON, K ; GRATTON, E: Lipid rafts reconstituted in model membranes. In: *Biophysical journal* 80 (2001), Nr. 3, S. 1417–1428
- [Diz-Muñoz et al. 2013] DIZ-MUÑOZ, Alba ; FLETCHER, Daniel A. ; WEINER, Orion D.: Use the force: membrane tension as an organizer of cell shape and motility. In: *Trends in cell biology* 23 (2013), Nr. 2, S. 47–53
- [Doherty und McMahon 2008] DOHERTY, Gary J. ; MCMAHON, Harvey T.: Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions. In: *Annu. Rev. Biophys.* 37 (2008), S. 65–95
- [Doherty und McMahon 2009] DOHERTY, Gary J. ; MCMAHON, Harvey T.: Mechanisms of endocytosis. In: *Annual review of biochemistry* 78 (2009), S. 857–902
- [Domanska et al. 2010] DOMANSKA, Marta K. ; KIESSLING, Volker ; TAMM, Lukas K.: Docking and fast fusion of synaptobrevin vesicles depends on the lipid compositions of the vesicle and the acceptor SNARE complex-containing target membrane. In: *Biophysical journal* 99 (2010), Nr. 9, S. 2936–2946
- [Domingues et al. 2009] DOMINGUES, Marco M. ; CASTANHO, Miguel A. ; SANTOS, Nuno C.: rBPI21 promotes lipopolysaccharide aggregation and exerts its antimicrobial effects by (hemi) fusion of PG-containing membranes. In: *PLoS One* 4 (2009), Nr. 12, S. e8385
- [Dowhan 1997] DOWHAN, W: Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? In: *Annual review of biochemistry* 66 (1997), Nr. 1, S. 199–232
- [Eckert und Kim 2001] ECKERT, Debra M. ; KIM, Peter S.: Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. In: *Annual review of biochemistry* 70 (2001), Nr. 1, S. 777–810
- [Edelman 1973] EDELMAN, Gerald M.: Antibody structure and molecular immunology. In: *Science* 180 (1973), Nr. 88, S. 830–840
- [Edidin 1974] EDIDIN, M: Rotational and translational diffusion in membranes. In: *Annual review of biophysics and bioengineering* 3 (1974), Nr. 1, S. 179–201
- [Edidin 2003] EDIDIN, M.: The state of lipid rafts: from model membranes to cells. In: *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32 (2003), 257–83
- [Eeman und Deleu 2010] EEMAN, Marc ; DELEU, Magali: From biological membranes to biomimetic model membranes. In: *Base* (2010)
- [Eftink und Ghiron 1981] EFTINK, Maurice R. ; GHIRON, Camillo A.: Fluorescence quenching studies with proteins. In: *Analytical biochemistry* 114 (1981), Nr. 2, S. 199–227
- [Elani et al. 2015] ELANI, Yuval ; PURUSHOTHAMAN, Sowmya ; BOOTH, Paula J. ; SEDDON, John M. ; BROOKS, Nicholas J. ; LAW, Robert V. ; CES, Oscar: Measurements of the effect of membrane asymmetry on the mechanical properties of lipid bilayers. In: *Chemical Communications* 51 (2015), Nr. 32, S. 6976–6979

- [Ellson et al. 2001] ELLSON, CD ; ANDERSON, KE ; MORGAN, G ; CHILVERS, ER ; LIPP, P ; STEPHENS, LR ; HAWKINS, PT: Phosphatidylinositol 3-phosphate is generated in phagosomal membranes. In: *Current Biology* 11 (2001), Nr. 20, S. 1631–1635
- [Epanand 2004] EPAND, R. M.: Do proteins facilitate the formation of cholesterol-rich domains? In: *Biochim Biophys Acta* 1666 (2004), Nr. 1-2, 227-38
- [Epanand 2003] EPAND, Richard M.: Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1614 (2003), Nr. 1, S. 116–121
- [Epanand und Epanand 2000] EPAND, Richard M. ; EPAND, Raquel F.: Modulation of membrane curvature by peptides. In: *Peptide Science* 55 (2000), Nr. 5, S. 358–363
- [Epanand und Epanand 2009] EPAND, Richard M. ; EPAND, Raquel F.: Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1788 (2009), Nr. 1, S. 289–294
- [Evans und Ninham 1986] EVANS, D F. ; NINHAM, BW: Molecular forces in the self-organization of amphiphiles. In: *The Journal of Physical Chemistry* 90 (1986), Nr. 2, S. 226–234
- [Evans und Waugh 1977] EVANS, EA ; WAUGH, R: Mechano-chemistry of closed, vesicular membrane systems. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 60 (1977), Nr. 2, S. 286–298
- [Fahy et al. 2005] FAHY, Eoin ; SUBRAMANIAM, Shankar ; BROWN, H A. ; GLASS, Christopher K. ; MERRILL, Alfred H. ; MURPHY, Robert C. ; RAETZ, Christian R. ; RUSSELL, David W. ; SEYAMA, Yousuke ; SHAW, Walter: A comprehensive classification system for lipids. In: *Journal of lipid research* 46 (2005), Nr. 5, S. 839–862
- [Fantini et al. 2002] FANTINI, Jacques ; GARMY, Nicolas ; MAHFOUD, Radhia ; YAHY, Nouara: Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer’s and prion diseases. In: *Expert reviews in molecular medicine* 4 (2002), Nr. 27, S. 1–22
- [Fernandez-Mora et al. 2005] FERNANDEZ-MORA, Eugenia ; POLIDORI, Marco ; LÜHRMANN, Anja ; SCHAIBLE, Ulrich E. ; HAAS, Albert: Maturation of Rhodococcus equi-Containing Vacuoles is Arrested After Completion of the Early Endosome Stage. In: *Traffic* 6 (2005), Nr. 8, S. 635–653
- [Fettiplace et al. 1971] FETTIPLACE, R ; ANDREWS, DM ; HAYDON, DA: The thickness, composition and structure of some lipid bilayers and natural membranes. In: *The Journal of membrane biology* 5 (1971), Nr. 3, S. 277–296
- [Flajnik und Du Pasquier 2004] FLAJNIK, Martin F. ; DU PASQUIER, Louis: Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? In: *Trends in immunology* 25 (2004), Nr. 12, S. 640–644
- [Flannagan et al. 2009] FLANNAGAN, R. S. ; COSIO, G. ; GRINSTEIN, S.: Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. In: *Nat Rev Microbiol* 7 (2009), Nr. 5, 355-66
- [Flannagan et al. 2012] FLANNAGAN, R. S. ; JAUMOUILLE, V. ; GRINSTEIN, S.: The cell biology of phagocytosis. In: *Annu Rev Pathol* 7 (2012), 61-98

- [Fleischer 2008] FLEISCHER, Lutz-Günther: Reflexionen zur Triade Energie-Entropie-Exergie–einer universellen Qualität der Energie. In: *LIFIS-ONLINE*, www.leibniz-institut.de/archiv/fleischer_21_10_08 (2008)
- [Flewelling und Hubbell 1986] FLEWELLING, Ross F. ; HUBBELL, Wayne L.: The membrane dipole potential in a total membrane potential model. Applications to hydrophobic ion interactions with membranes. In: *Biophysical journal* 49 (1986), Nr. 2, S. 541
- [Fratti et al. 2003] FRATTI, Rutilio A. ; CHUA, Jennifer ; VERGNE, Isabelle ; DERETIC, Vojo: Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (2003), Nr. 9, S. 5437–5442
- [Förster 1948] FÖRSTER, Th: Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. In: *Annalen der Physik* 437 (1948), Nr. 1-2, S. 55–75
- [Garab et al. 2000] GARAB, Győző ; LOHNER, Karl ; LAGGNER, Peter ; FARKAS, Tibor: Self-regulation of the lipid content of membranes by non-bilayer lipids: a hypothesis. In: *Trends in plant science* 5 (2000), Nr. 11, S. 489–494
- [García-Sáez et al. 2007] GARCÍA-SÁEZ, Ana J. ; CHIANTIA, Salvatore ; SCHWILLE, Petra: Effect of line tension on the lateral organization of lipid membranes. In: *Journal of Biological Chemistry* 282 (2007), Nr. 46, S. 33537–33544
- [García und Pérez 2002] GARCÍA, Ricardo ; PÉREZ, Rubén: Dynamic atomic force microscopy methods. In: *Surface science reports* 47 (2002), Nr. 6, S. 197–301
- [Geerds et al. 2014] GEERDS, C. ; WOHLMANN, J. ; HAAS, A. ; NIEMANN, H. H.: Structure of Rhodococcus equi virulence-associated protein B (VapB) reveals an eight-stranded antiparallel beta-barrel consisting of two Greek-key motifs. In: *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 70 (2014), Nr. Pt 7, 866-71
- [Giguère et al. 1999] GIGUÈRE, Steeve ; HONDALUS, Mary K. ; YAGER, Julie A. ; DARRAH, Patricia ; MOSSER, David M. ; PRESCOTT, John F.: Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in intracellular survival and virulence of Rhodococcus equi. In: *Infection and immunity* 67 (1999), Nr. 7, S. 3548–3557
- [Giles et al. 2014] GILES, C. ; VANNIASINKAM, T. ; NDI, S. ; BARTON, M. D.: Rhodococcus equi (Prescottella equi) vaccines; the future of vaccine development. In: *Equine Vet J* (2014)
- [Gleisner et al. 2014] GLEISNER, Martin ; MEY, Ingo ; BARBOT, Mariam ; DREKER, Christina ; MEINECKE, Michael ; STEINEM, Claudia: Driving a planar model system into the 3 rd dimension: generation and control of curved pore-spanning membrane arrays. In: *Soft matter* 10 (2014), Nr. 33, S. 6228–6236
- [Goodfellow und Alderson 1977] GOODFELLOW, M ; ALDERSON, G: The actinomycete-genus Rhodococcus: a home for the ‘rhodochrous’ complex. In: *Journal of General Microbiology* 100 (1977), Nr. 1, S. 99–122
- [Gordon et al. 1998] GORDON, Gerald W. ; BERRY, Gail ; LIANG, Xiao H. ; LEVINE, Beth ; HERMAN, Brian: Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. In: *Biophysical journal* 74 (1998), Nr. 5, S. 2702–2713

- [Gorter und Grendel 1925] GORTER, Evert ; GREDEL, FJEM: On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. In: *The Journal of experimental medicine* 41 (1925), Nr. 4, S. 439–443
- [Gougeon 2003] GOUGEON, Marie-Lise: Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. In: *Nature Reviews Immunology* 3 (2003), Nr. 5, S. 392–404
- [Grabe und Oster 2001] GRABE, Michael ; OSTER, George: Regulation of organelle acidity. In: *The Journal of general physiology* 117 (2001), Nr. 4, S. 329–344
- [Grandbois et al. 1998] GRANDBOIS, Michel ; CLAUSEN-SCHAUMANN, Hauke ; GAUB, Hermann: Atomic force microscope imaging of phospholipid bilayer degradation by phospholipase A 2. In: *Biophysical journal* 74 (1998), Nr. 5, S. 2398–2404
- [Greenberg und Grinstein 2002] GREENBERG, Steven ; GRINSTEIN, Sergio: Phagocytosis and innate immunity. In: *Current opinion in immunology* 14 (2002), Nr. 1, S. 136–145
- [Griffiths 2007] GRIFFITHS, Gareth: Cell evolution and the problem of membrane topology. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (2007), Nr. 12, S. 1018–1024
- [Gronewold 2007] GRONEWOLD, T. M.: Surface acoustic wave sensors in the bioanalytical field: recent trends and challenges. In: *Anal Chim Acta* 603 (2007), Nr. 2, 119–28
- [Gruner 1985] GRUNER, Sol M.: Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82 (1985), Nr. 11, S. 3665–3669
- [Gutsmann et al. 2000] GUTSMANN, T. ; FIX, M. ; LARRICK, J. W. ; WIESE, A.: Mechanisms of action of rabbit CAP18 on monolayers and liposomes made from endotoxins or phospholipids. In: *J Membr Biol* 176 (2000), Nr. 3, 223–36
- [Gutsmann et al. 2001a] GUTSMANN, Thomas ; HAGGE, Sven O. ; LARRICK, James W. ; SEYDEL, Ulrich ; WIESE, Andre: Interaction of CAP18-derived peptides with membranes made from endotoxins or phospholipids. In: *Biophysical Journal* 80 (2001), Nr. 6, S. 2935–2945
- [Gutsmann et al. 2015] GUTSMANN, Thomas ; HEIMBURG, Thomas ; KEYSER, Ulrich ; MAHENDRAN, Kozhinjampara R. ; WINTERHALTER, Mathias: Protein reconstitution into freestanding planar lipid membranes for electrophysiological characterization. In: *Nature protocols* 10 (2015), Nr. 1, S. 188–198
- [Gutsmann et al. 1999] GUTSMANN, Thomas ; LARRICK, James W. ; SEYDEL, Ulrich ; WIESE, Andre: Molecular mechanisms of interaction of rabbit CAP18 with outer membranes of Gram-negative bacteria. In: *Biochemistry* 38 (1999), Nr. 41, S. 13643–13653
- [Gutsmann et al. 2001b] GUTSMANN, Thomas ; MÜLLER, Mareike ; CARROLL, Stephen F. ; MACKENZIE, Roger C. ; WIESE, Andre ; SEYDEL, Ulrich: Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. In: *Infection and immunity* 69 (2001), Nr. 11, S. 6942–6950

- [Haas 2002] HAAS, A: Wenn Fresszellen Verdauungsstörungen haben-ungewöhnliche Phagosomenbiogenese in Makrophagen. In: *BIOspektrum-Heidelberg* 8 (2002), Nr. 3, S. 243–247
- [Haas 2007] HAAS, A.: The phagosome: compartment with a license to kill. In: *Traffic* 8 (2007), Nr. 4, 311-30
- [Hackam et al. 1997] HACKAM, David J. ; ROTSTEIN, Ori D. ; ZHANG, Wei-Jian ; DE-MAUREX, Nicolas ; WOODSIDE, Michael ; TSAI, Olivia ; GRINSTEIN, Sergio: Regulation of Phagosomal Acidification - Differential Targeting of Na⁺/H⁺ Exchangers, Na⁺/K⁺-ATPases, and Vacuolar-Type H⁺-ATPases. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997), Nr. 47, S. 29810–29820
- [Hackstadt et al. 1996] HACKSTADT, T ; ROCKEY, DD ; HEINZEN, RA ; SCIDMORE, MA: Chlamydia trachomatis interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. In: *The EMBO journal* 15 (1996), Nr. 5, S. 964
- [Hackstadt und Williams 1981] HACKSTADT, Ted ; WILLIAMS, Jim C.: Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78 (1981), Nr. 5, S. 3240–3244
- [Hagge et al. 2004] HAGGE, Sven O. ; WIESE, Andre ; SEYDEL, Ulrich ; GUTSMANN, Thomas: Inner field compensation as a tool for the characterization of asymmetric membranes and peptide-membrane interactions. In: *Biophysical journal* 86 (2004), Nr. 2, S. 913–922
- [Hamill et al. 1981] HAMILL, Owen P. ; MARTY, A ; NEHER, Erwin ; SAKMANN, Bert ; SIGWORTH, FJ: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. In: *Pflügers Archiv* 391 (1981), Nr. 2, S. 85–100
- [Hampton et al. 1998] HAMPTON, Mark B. ; KETTLE, Anthony J. ; WINTERBOURN, Christine C.: Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. In: *Blood* 92 (1998), Nr. 9, S. 3007–3017
- [Hancock und Rozek 2002] HANCOCK, Robert E. ; ROZEK, Annett: Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. In: *FEMS microbiology letters* 206 (2002), Nr. 2, S. 143–149
- [Hansma und Hoh 1994] HANSMA, Helen G. ; HOH, Jan H.: Biomolecular imaging with the atomic force microscope. In: *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 23 (1994), Nr. 1, S. 115–140
- [Heimburg 2000] HEIMBURG, Thomas: A model for the lipid pretransition: coupling of ripple formation with the chain-melting transition. In: *Biophysical journal* 78 (2000), Nr. 3, S. 1154–1165
- [Helfrich und Servuss 1984] HELFRICH, WSRM ; SERVUSS, R-M: Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes. In: *Il Nuovo Cimento D* 3 (1984), Nr. 1, S. 137–151

- [Henneberry et al. 2002] HENNEBERRY, Annette L. ; WRIGHT, Marcia M. ; MCMMASTER, Christopher R.: The major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of fatty acid and lipid head group specificity. In: *Molecular biology of the cell* 13 (2002), Nr. 9, S. 3148–3161
- [Henzler Wildman et al. 2003] HENZLER WILDMAN, Katherine A. ; LEE, Dong-Kuk ; RAMAMOORTHY, A: Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. In: *Biochemistry* 42 (2003), Nr. 21, S. 6545–6558
- [Henzler-Wildman et al. 2004] HENZLER-WILDMAN, Katherine A. ; MARTINEZ, Gary V. ; BROWN, Michael F. ; RAMAMOORTHY, A: Perturbation of the hydrophobic core of lipid bilayers by the human antimicrobial peptide LL-37. In: *Biochemistry* 43 (2004), Nr. 26, S. 8459–8469
- [High et al. 1992] HIGH, Nicola ; MOUNIER, Joelle ; PREVOST, Marie C. ; SANSONETTI, Philippe J.: IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. In: *The EMBO Journal* 11 (1992), Nr. 5, S. 1991
- [Hissa et al. 2013] HISSA, Barbara ; PONTES, Bruno ; ROMA, Paula Magda S. ; ALVES, Ana P. ; ROCHA, Carolina D. ; VALVERDE, Thalita M. ; AGUIAR, Pedro Henrique N. ; ALMEIDA, Fernando P. ; GUIMARÃES, Allan J. ; GUATIMOSIM, Cristina: Membrane Cholesterol Removal Changes Mechanical Properties of Cells and Induces Secretion of a Specific Pool of Lysosomes. In: *PLoS one* 8 (2013), Nr. 12, S. e82988
- [Hissa et al. 2012] HISSA, Bárbara ; DUARTE, Jacqueline G. ; KELLES, Ludmila F. ; SANTOS, Fabio P. ; HELEN, L ; GAZZINELLI-GUIMARÃES, Pedro H. ; DE PAULA, Ana M. ; AGERO, Ubirajara ; MESQUITA, Oscar N. ; GUATIMOSIM, Cristina: Membrane cholesterol regulates lysosome-plasma membrane fusion events and modulates *Trypanosoma cruzi* invasion of host cells. In: *PLoS neglected tropical diseases* 6 (2012), Nr. 3, S. e1583
- [Ho et al. 1986] HO, Chu N. ; PATONAY, Gabor ; WARNER, Isiah M.: Bioanalytical applications of fluorescence quenching. In: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 5 (1986), Nr. 2, S. 37–43
- [Hoffmann et al. 1999] HOFFMANN, Jules A. ; KAFATOS, Fotis C. ; JANEWAY, Charles A. ; EZEKOWITZ, RAB: Phylogenetic perspectives in innate immunity. In: *Science* 284 (1999), Nr. 5418, S. 1313–1318
- [Hondalus 1997] HONDALUS, Mary K.: Pathogenesis and virulence of *Rhodococcus equi*. In: *Veterinary microbiology* 56 (1997), Nr. 3, S. 257–268
- [Hondalus und Mosser 1994] HONDALUS, Mary K. ; MOSSER, David M.: Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages. In: *Infection and immunity* 62 (1994), Nr. 10, S. 4167–4175
- [Houlsby und Puzrin 2000] HOULSBY, G. T. ; PUZRIN, A. M.: A thermomechanical framework for constitutive models for rate-independent dissipative materials. In: *International Journal of Plasticity* 16 (2000), Nr. 9, S. 1017–1047
- [Huang 1969] HUANG, Ching-Hsien: Phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. In: *Biochemistry* 8 (1969), Nr. 1, S. 344–352

- [Huang 2000] HUANG, Huey W.: Action of antimicrobial peptides: two-state model. In: *Biochemistry* 39 (2000), Nr. 29, S. 8347–8352
- [Huang et al. 2004] HUANG, Huey W. ; CHEN, Fang-Yu ; LEE, Ming-Tao: Molecular Mechanism of Peptide-Induced Pores in Membranes. In: *Physical Review Letters* 92 (2004), Nr. 19
- [Huang und Feigenson 1999] HUANG, Juyang ; FEIGENSON, Gerald W.: A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers. In: *Biophysical Journal* 76 (1999), Nr. 4, S. 2142–2157
- [Huynh und Grinstein 2007] HUYNH, Cassidy K. ; GRINSTEIN, Sergio: Regulation of vacuolar pH and its modulation by some microbial species. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71 (2007), Nr. 3, S. 452–462
- [Huynh et al. 2007] HUYNH, Cassidy K. ; KAY, Jason G. ; STOW, Jennifer L. ; GRINSTEIN, Sergio: Fusion, fission, and secretion during phagocytosis. In: *Physiology* 22 (2007), Nr. 6, S. 366–372
- [Ipsen et al. 1987] IPSEN, J H. ; KARLSTRÖM, G ; MOURTISEN, OG ; WENNERSTRÖM, H ; ZUCKERMANN, MJ: Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 905 (1987), Nr. 1, S. 162–172
- [Israelachvili et al. 1976] ISRAELACHVILI, Jacob N. ; MITCHELL, D J. ; NINHAM, Barry W.: Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. In: *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* 72 (1976), S. 1525–1568
- [Israelachvili et al. 1980] ISRAELACHVILI, JN ; MARČELJA, S ; HORN, Roger G.: Physical principles of membrane organization. In: *Quarterly reviews of biophysics* 13 (1980), Nr. 02, S. 121–200
- [Iwasaki und Medzhitov 2010] IWASAKI, Akiko ; MEDZHITOV, Ruslan: Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. In: *science* 327 (2010), Nr. 5963, S. 291–295
- [Iyer et al. 1961] IYER, GYN ; ISLAM, MF ; QUASTEL, JH: Biochemical aspects of phagocytosis. (1961)
- [Jacobson et al. 1995] JACOBSON, Ken ; SHEETS, Erin D. ; SIMSON, Rudolf: Revisiting the fluid mosaic model of membranes. In: *Science (New York, NY)* 268 (1995), Nr. 5216, S. 1441
- [Jacotot et al. 2001] JACOTOT, Etienne ; FERRI, Karine F. ; EL HAMEL, Chahrazed ; BRENNER, Catherine ; DRUILLENNEC, Sabine ; HOEBEKE, Johan ; RUSTIN, Pierre ; MÉIVIER, Didier ; LENOIR, Christine ; GEUSKENS, Maurice: Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein R and Bcl-2. In: *The Journal of experimental medicine* 193 (2001), Nr. 4, S. 509–520
- [Jahn et al. 2003] JAHN, Reinhard ; LANG, Thorsten ; SÜDHOF, Thomas C.: Membrane fusion. In: *Cell* 112 (2003), Nr. 4, S. 519–533

- [Jahraus et al. 1998] JAHRAUS, Andrea ; TJELLE, Torunn E. ; BERG, Trond ; HABERMANN, Anja ; STORRIE, Brian ; ULLRICH, Oliver ; GRIFFITHS, Gareth: In vitro fusion of phagosomes with different endocytic organelles from J774 macrophages. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (1998), Nr. 46, S. 30379–30390
- [Jain et al. 2003] JAIN, Shruti ; BLOOM, Barry R. ; HONDALUS, Mary K.: Deletion of vapA encoding Virulence Associated Protein A attenuates the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. In: *Molecular Microbiology* 50 (2003), Nr. 1, S. 115–128
- [Janeway 1989] JANEWAY, Charles A.: Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. In: *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* Bd. 54, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – ISBN 0091-7451, S. 1–13
- [Janeway Jr und Medzhitov 2002] JANEWAY JR, Charles A. ; MEDZHITOV, Ruslan: Innate immune recognition. In: *Annual review of immunology* 20 (2002), Nr. 1, S. 197–216
- [Janiak et al. 1979] JANIAK, Martin J. ; SMALL, Donald M. ; SHIPLEY, G G.: Temperature and compositional dependence of the structure of hydrated dimyristoyl lecithin. In: *Journal of Biological Chemistry* 254 (1979), Nr. 13, S. 6068–6078
- [Janshoff et al. 2000] JANSHOFF, Andreas ; GALLA, Hans-Joachim ; STEINEM, Claudia: Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors - An Alternative to Optical Biosensors? In: *Angew. Chem. Int. Ed* 39 (2000), S. 4004–4032
- [Jaumouillé und Grinstein 2011] JAUMOUILLE, Valentin ; GRINSTEIN, Sergio: Receptor mobility, the cytoskeleton, and particle binding during phagocytosis. In: *Current opinion in cell biology* 23 (2011), Nr. 1, S. 22–29
- [Jensen et al. 2007] JENSEN, Mikkel H. ; MORRIS, Eliza J. ; SIMONSEN, Adam C.: Domain shapes, coarsening, and random patterns in ternary membranes. In: *Langmuir* 23 (2007), Nr. 15, S. 8135–8141
- [Jenssen et al. 2006] JENSSEN, Håvard ; HAMILL, Pamela ; HANCOCK, Robert E.: Peptide antimicrobial agents. In: *Clinical microbiology reviews* 19 (2006), Nr. 3, S. 491–511
- [Jeschke et al. 2015] JESCHKE, Andreas ; ZEHETHOFER, Nicole ; LINDNER, Buko ; KRUPP, Jessica ; SCHWUDKE, Dominik ; HANEBURGER, Ina ; JOVIC, Marko ; BACKER, Jonathan M. ; BALLA, Tamas ; HILBI, Hubert: Phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 3-phosphate regulate phagolysosome biogenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (2015), Nr. 15, S. 4636–4641
- [Joiner et al. 1984] JOINER, KA ; BROWN, EJ ; FRANK, MM: Complement and bacteria: chemistry and biology in host defense. In: *Annual review of immunology* 2 (1984), Nr. 1, S. 461–492
- [Jones 1950] JONES, Kenneth K.: A micromethod for fat analysis based on formation of monolayer films. In: *Quarterly Bulletin of the Northwestern University Medical School* 24 (1950), Nr. 4, S. 253
- [Jones et al. 1990] JONES, R ; TREGOLD, RH ; DAVIS, F ; HODGE, P: Free-standing polymeric Langmuir-Blodgett films deposited across 0.2 μm pores. In: *Thin solid films* 186 (1990), Nr. 2, S. L51–L54

- [Jutras und Desjardins 2005] JUTRAS, Isabelle ; DESJARDINS, Michel: Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. In: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21 (2005), S. 511–527
- [Kadurugamuwa et al. 1991] KADURUGAMUWA, JL ; ROHDE, M ; WEHLAND, J ; TIMMIS, KN: Intercellular spread of *Shigella flexneri* through a monolayer mediated by membranous protrusions and associated with reorganization of the cytoskeletal protein vinculin. In: *Infection and immunity* 59 (1991), Nr. 10, S. 3463–3471
- [Kagan und Roy 2002] KAGAN, Jonathan C. ; ROY, Craig R.: Legionella phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. In: *Nature cell biology* 4 (2002), Nr. 12, S. 945–954
- [Kahya et al. 2003] KAHYA, Nicoletta ; SCHERFELD, Dag ; BACIA, Kirsten ; POOLMAN, Bert ; SCHWILLE, Petra: Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), Nr. 30, S. 28109–28115
- [Kalb et al. 1992] KALB, Edwin ; FREY, Sammy ; TAMM, Lukas K.: Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1103 (1992), Nr. 2, S. 307–316
- [Kanazawa und Gordon 1985a] KANAZAWA, K K. ; GORDON, Joseph G.: Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid. In: *Analytical Chemistry* 57 (1985), Nr. 8, S. 1770–1771
- [Kanazawa und Gordon 1985b] KANAZAWA, K K. ; GORDON, Joseph G.: The oscillation frequency of a quartz resonator in contact with liquid. In: *Analytica Chimica Acta* 175 (1985), S. 99–105
- [Kasha 1950] KASHA, Michael: Characterization of electronic transitions in complex molecules. In: *Discussions of the Faraday society* 9 (1950), S. 14–19
- [Kedlaya et al. 2001] KEDLAYA, Indira ; ING, Michael B. ; WONG, Sammy S.: Rhodococcus equi infections in immunocompetent hosts: case report and review. In: *Clinical infectious diseases* 32 (2001), Nr. 3, S. e39–e46
- [Köhler et al. 1997] KÖHLER, Guido ; HERING, Ute ; ZSCHÖRNIG, Olaf ; ARNOLD, Klaus: Annexin V interaction with phosphatidylserine-containing vesicles at low and neutral pH. In: *Biochemistry* 36 (1997), Nr. 26, S. 8189–8194
- [Kinchen und Ravichandran 2008] KINCHEN, J. M. ; RAVICHANDRAN, K. S.: Phagosome maturation: going through the acid test. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (2008), Nr. 10, 781–95
- [Klauda et al. 2008] KLAUDA, Jeffery B. ; ROBERTS, Mary F. ; REDFIELD, Alfred G. ; BROOKS, Bernard R. ; PASTOR, Richard W.: Rotation of lipids in membranes: molecular dynamics simulation, 31 P spin-lattice relaxation, and rigid-body dynamics. In: *Biophysical journal* 94 (2008), Nr. 8, S. 3074–3083
- [Kocun et al. 2011] KOCUN, Marta ; LAZZARA, Thomas D. ; STEINEM, Claudia ; JANSHOFF, Andreas: Preparation of solvent-free, pore-spanning lipid bilayers: modeling the low tension of plasma membranes. In: *Langmuir* 27 (2011), Nr. 12, S. 7672–7680

- [Komorowski 2014] KOMOROWSKI, K.: *Biophysikalische Charakterisierung der Porenbildung durch VapA und VapB von Rhodococcus equi*, Fachhochschule Lübeck, Thesis, 2014
- [Kornberg und McConnell 1971] KORNBERG, Roger D. ; MCCONNELL, Harden M.: Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 68 (1971), Nr. 10, S. 2564–2568
- [Kozel und Gotschlich 1982] KOZEL, TR ; GOTSCHLICH, EC: The capsule of *Cryptococcus neoformans* passively inhibits phagocytosis of the yeast by macrophages. In: *The Journal of Immunology* 129 (1982), Nr. 4, S. 1675–1680
- [Kozlov und Markin 1982] KOZLOV, MM ; MARKIN, VS: Possible mechanism of membrane fusion. In: *Biofizika* 28 (1982), Nr. 2, S. 242–247
- [Kumar 1991] KUMAR, VV: Complementary molecular shapes and additivity of the packing parameter of lipids. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (1991), Nr. 2, S. 444–448
- [Lange et al. 2008] LANGE, K. ; RAPP, B. E. ; RAPP, M.: Surface acoustic wave biosensors: a review. In: *Anal Bioanal Chem* 391 (2008), Nr. 5, 1509–19
- [Langmuir 1917] LANGMUIR, Irving: The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. 1. In: *Journal of the American Chemical Society* 39 (1917), Nr. 9, S. 1848–1906
- [Larrick et al. 1995] LARRICK, James W. ; HIRATA, Michimasa ; BALINT, Robert F. ; LEE, Jaehag ; ZHONG, Jian ; WRIGHT, Susan C.: Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. In: *Infection and immunity* 63 (1995), Nr. 4, S. 1291–1297
- [Latimer und Rodebush 1920] LATIMER, Wendell M. ; RODEBUSH, Worth H.: Polarity and ionization from the standpoint of the Lewis theory of valence. In: *Journal of the American Chemical Society* 42 (1920), Nr. 7, S. 1419–1433
- [Lehrer et al. 1993] LEHRER, Robert I. ; LICHTENSTEIN, Alan K. ; GANZ, Tomas: Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. In: *Annual review of immunology* 11 (1993), Nr. 1, S. 105–128
- [Lennon-Duménil et al. 2002a] LENNON-DUMÉNIL, Ana-Maria ; BAKKER, Arnold H. ; MAEHR, René ; FIEBIGER, Edda ; OVERKLEEF, Herman S. ; ROSEMBLATT, Mario ; PLOEGH, Hidde L. ; LAGAUDRIÈRE-GESBERT, Cécile: Analysis of protease activity in live antigen-presenting cells shows regulation of the phagosomal proteolytic contents during dendritic cell activation. In: *The Journal of experimental medicine* 196 (2002), Nr. 4, S. 529–540
- [Lennon-Duménil et al. 2002b] LENNON-DUMÉNIL, Ana-Maria ; BAKKER, Arnold H. ; WOLF-BRYANT, Paula ; PLOEGH, Hidde L. ; LAGAUDRIÈRE-GESBERT, Cécile: A closer look at proteolysis and MHC-class-II-restricted antigen presentation. In: *Current opinion in immunology* 14 (2002), Nr. 1, S. 15–21

- [Lührmann et al. 2004] LÜHRMANN, Anja ; MAUDER, Norman ; SYDOR, Tobias ; FERNANDEZ-MORA, Eugenia ; SCHULZE-LUEHRMANN, Jan ; TAKAI, Shinji ; HAAS, Albert: Necrotic death of Rhodococcus equi-infected macrophages is regulated by virulence-associated plasmids. In: *Infection and immunity* 72 (2004), Nr. 2, S. 853–862
- [Lindner et al. 2013] LINDNER, Andreas U. ; PREHN, Jochen H. ; HUBER, Heinrich J.: The indirect activation model of mitochondrial outer membrane permeabilisation (MOMP) initiation requires a trade-off between robustness in the absence of and sensitivity in the presence of stress. In: *Molecular BioSystems* 9 (2013), Nr. 9, S. 2359–2369
- [Lipowsky 2002] LIPOWSKY, Reinhard: Domains and rafts in membranes—Hidden dimensions of selforganization. In: *Journal of biological physics* 28 (2002), Nr. 2, S. 195–210
- [Lipp et al. 1997] LIPP, Michael M. ; LEE, Ka Yee C. ; ZASADZINSKI, Joseph A. ; WARING, Alan J.: Design and performance of an integrated fluorescence, polarized fluorescence, and Brewster angle microscope/Langmuir trough assembly for the study of lung surfactant monolayers. In: *Review of scientific instruments* 68 (1997), Nr. 6, S. 2574–2582
- [London 2002] LONDON, Erwin: Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. In: *Current opinion in structural biology* 12 (2002), Nr. 4, S. 480–486
- [Läuger 1970] LÄUGER, P: Künstliche Lipidfilme als Modelle biologischer Membranen. In: *Naturwissenschaften* 57 (1970), Nr. 10, S. 474–480
- [Luzzati und Tardieu 1974] LUZZATI, V ; TARDIEU, A: Lipid phases: structure and structural transitions. In: *Annual Review of Physical Chemistry* 25 (1974), Nr. 1, S. 79–94
- [Macklem und Seely 2010] MACKLEM, Peter T. ; SEELY, Andrew: Towards a definition of life. In: *Perspectives in biology and medicine* 53 (2010), Nr. 3, S. 330–340
- [Malik et al. 2001] MALIK, Zulfiqar A. ; IYER, Shankar S. ; KUSNER, David J.: Mycobacterium tuberculosis phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages. In: *The Journal of Immunology* 166 (2001), Nr. 5, S. 3392–3401
- [Marčelja 1974] MARČELJA, S: Chain ordering in liquid crystals: II. Structure of bilayer membranes. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 367 (1974), Nr. 2, S. 165–176
- [Marques 2000] MARQUES, Eduardo F.: Size and stability of catanionic vesicles: effects of formation path, sonication, and aging. In: *Langmuir* 16 (2000), Nr. 11, S. 4798–4807
- [Marrink et al. 2009] MARRINK, Siewert J. ; VRIES, Alex H. ; TIELEMAN, D P.: Lipids on the move: simulations of membrane pores, domains, stalks and curves. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1788 (2009), Nr. 1, S. 149–168
- [Marsh 1996a] MARSH, Derek: Intrinsic curvature in normal and inverted lipid structures and in membranes. In: *Biophysical journal* 70 (1996), Nr. 5, S. 2248

- [Marsh 1996b] MARSH, Derek: Lateral pressure in membranes. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 1286 (1996), Nr. 3, S. 183–223
- [Marsh 2007] MARSH, Derek: Lateral pressure profile, spontaneous curvature frustration, and the incorporation and conformation of proteins in membranes. In: *Biophysical journal* 93 (2007), Nr. 11, S. 3884–3899
- [Marsh 2008] MARSH, Derek: Protein modulation of lipids, and vice-versa, in membranes. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1778 (2008), Nr. 7, S. 1545–1575
- [Marshansky und Futai 2008] MARSHANSKY, Vladimir ; FUTAI, Masamitsu: The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. In: *Current opinion in cell biology* 20 (2008), Nr. 4, S. 415–426
- [Martin et al. 1995] MARTIN, Seamus J ; REUTELINGSPERGER, CP ; MCGAHON, Anne J. ; RADER, James A. ; VAN SCHIE, RC ; LAFACE, Drake M. ; GREEN, Douglas R.: Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. In: *The Journal of experimental medicine* 182 (1995), Nr. 5, S. 1545–1556
- [Martin et al. 1987] MARTIN, Y ; WILLIAMS, CC ; WICKRAMASINGHE, H K.: Atomic force microscope–force mapping and profiling on a sub 100-Åscale. In: *Journal of Applied Physics* 61 (1987), Nr. 10, S. 4723–4729
- [Mason et al. 1972] MASON, Robert J. ; STOSSEL, Thomas P. ; VAUGHAN, Martha: Lipids of alveolar macrophages, polymorphonuclear leukocytes, and their phagocytic vesicles. In: *Journal of Clinical Investigation* 51 (1972), Nr. 9, S. 2399
- [Maulik und Shipley 1996] MAULIK, PR ; SHIPLEY, GG: Interactions of N-stearoyl sphingomyelin with cholesterol and dipalmitoylphosphatidylcholine in bilayer membranes. In: *Biophysical journal* 70 (1996), Nr. 5, S. 2256
- [McBride et al. 1999] MCBRIDE, Heidi M. ; RYBIN, Vladimir ; MURPHY, Carol ; GINER, Angelika ; TEASDALE, Rohan ; ZERIAL, Marino: Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. In: *Cell* 98 (1999), Nr. 3, S. 377–386
- [McClelland et al. 1987] Book Section 7. In: MCCLELLAND, Gary M. ; ERLANDSSON, Ragnar ; CHIANG, Shirley: *Atomic force microscopy: General principles and a new implementation*. Springer, 1987. – ISBN 1461290546, S. 1307–1314
- [McConnell und Vrljic 2003] MCCONNELL, Harden M. ; VRLJIC, Marija: Liquid-liquid immiscibility in membranes. In: *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 32 (2003), Nr. 1, S. 469–492
- [McConville et al. 2007] MCCONVILLE, Malcolm J. ; DE SOUZA, David ; SAUNDERS, Eleanor ; LIKIC, Vladimir A. ; NADERER, Thomas: Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania amastigotes*. In: *Trends in parasitology* 23 (2007), Nr. 8, S. 368–375
- [McHale et al. 2002] MCHALE, G. ; NEWTON, M. I. ; MARTIN, F.: Theoretical mass sensitivity of Love wave and layer guided acoustic plate mode sensors. In: *Journal of Applied Physics* 91 (2002), Nr. 12, S. 9701

- [McIntosh 1980] MCINTOSH, TJ: Differences in hydrocarbon chain tilt between hydrated phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine bilayers. A molecular packing model. In: *Biophysical journal* 29 (1980), Nr. 2, S. 237
- [McMahon und Gallop 2005] MCMAHON, Harvey T. ; GALLOP, Jennifer L.: Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. In: *Nature* 438 (2005), Nr. 7068, S. 590–596
- [Meader und Criddle 1953] MEADER, Arthur L. ; CRIDDLE, Dean W.: Force-area curves of surface films of soluble surface-active agents. In: *Journal of Colloid Science* 8 (1953), Nr. 1, S. 170–178
- [Medzhitov und Janeway 1997a] MEDZHITOV, Ruslan ; JANEWAY, Charles A.: Innate immunity: impact on the adaptive immune response. In: *Current opinion in immunology* 9 (1997), Nr. 1, S. 4–9
- [Medzhitov und Janeway 1997b] MEDZHITOV, Ruslan ; JANEWAY, Charles A.: Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. In: *Cell* 91 (1997), Nr. 3, S. 295–298
- [van Meer et al. 2008] MEER, G. van ; VOELKER, D. R. ; FEIGENSON, G. W.: Membrane lipids: where they are and how they behave. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (2008), Nr. 2, 112-24
- [van Meer 2005] MEER, Gerrit van: Cellular lipidomics. In: *The EMBO journal* 24 (2005), Nr. 18, S. 3159–3165
- [Metschnikoff 1884] METSCHNIKOFF, Elias: Ueber die Beziehung der Phagocyten zu Milzbrandbacillen. In: *Virchows Archiv* 97 (1884), Nr. 3, S. 502–526
- [Meyer 1992] MEYER, E: Atomic force microscopy. In: *Progress in surface science* 41 (1992), Nr. 1, S. 3–49
- [Meyer und Amer 1988] MEYER, Gerhard ; AMER, Nabil M.: Novel optical approach to atomic force microscopy. In: *Applied physics letters* 53 (1988), Nr. 12, S. 1045–1047
- [Meyer 1901] MEYER, Hans: Zur theorie der alkoholnarkose. In: *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 46 (1901), Nr. 5-6, S. 338–346
- [Michalet et al. 2003] MICHALET, Xavier ; KAPANIDIS, Achillefs N. ; LAURENCE, Ted ; PINAUD, Fabien ; DOOSE, Soeren ; PFLUGHOEFFT, Malte ; WEISS, Shimon: The power and prospects of fluorescence microscopies and spectroscopies. In: *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 32 (2003), Nr. 1, S. 161–182
- [Mills et al. 2008] MILLS, T. T. ; TRISTRAM-NAGLE, S. ; HEBERLE, F. A. ; MORALES, N. F. ; ZHAO, J. ; WU, J. ; TOOMBES, G. E. ; NAGLE, J. F. ; FEIGENSON, G. W.: Liquid-liquid domains in bilayers detected by wide angle X-ray scattering. In: *Biophys J* 95 (2008), Nr. 2, 682-90
- [Müller und Dufrêne 2011] MÜLLER, Daniel J. ; DUFRÊNE, Yves F.: Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. In: *Trends in cell biology* 21 (2011), Nr. 8, S. 461–469

- [Müller und Herrmann 2002] MÜLLER, Peter ; HERRMANN, Andreas: Rapid transbilayer movement of spin-labeled steroids in human erythrocytes and in liposomes. In: *Biophysical journal* 82 (2002), Nr. 3, S. 1418–1428
- [Moll et al. 2007] MOLL, N. ; PASCAL, E. ; DINH, D. H. ; PILLOT, J. P. ; BENNETAU, B. ; REBIERE, D. ; MOYNET, D. ; MAS, Y. ; MOSSALAYI, D. ; PISTRE, J. ; DEJOURS, C.: A Love wave immunosensor for whole E. coli bacteria detection using an innovative two-step immobilisation approach. In: *Biosens Bioelectron* 22 (2007), Nr. 9-10, 2145-50
- [Molloy und Winterbourn 1990] MOLLOY, Annemarie L. ; WINTERBOURN, Christine C.: Release of iron from phagocytosed Escherichia coli and uptake by neutrophil lactoferrin. In: *Blood* 75 (1990), Nr. 4, S. 984–989
- [Montal und Mueller 1972] MONTAL, M ; MUELLER, P: Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69 (1972), Nr. 12, S. 3561–3566
- [Mosier 2000] MOSIER, Donald E.: Virus and target cell evolution in human immunodeficiency virus type 1 infection. In: *Immunologic research* 21 (2000), Nr. 2-3, S. 253–258
- [Mouritsen 2011a] MOURITSEN, Ole G.: Lipidology and lipidomics—quo vadis? A new era for the physical chemistry of lipids. In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 13 (2011), Nr. 43, S. 19195–19205
- [Mouritsen 2011b] MOURITSEN, Ole G.: Model answers to lipid membrane questions. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (2011), Nr. 9, S. a004622
- [Mouritsen und Bloom 1984] MOURITSEN, Ole G. ; BLOOM, Myer: Mattress model of lipid-protein interactions in membranes. In: *Biophysical journal* 46 (1984), Nr. 2, S. 141–153
- [Mueller et al. 1962] MUELLER, Paul ; RUDIN, Donald O. ; TI TIEN, H ; WESCOTT, William C.: Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. In: *Nature* 194 (1962), S. 979–980
- [Mukherjee und Maxfield 2004] MUKHERJEE, Sushmita ; MAXFIELD, Frederick R.: Membrane domains. In: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20 (2004), S. 839–866
- [Murphy und DeCoursey 2006] MURPHY, R. ; DECOURSEY, T. E.: Charge compensation during the phagocyte respiratory burst. In: *Biochim Biophys Acta* 1757 (2006), Nr. 8, 996-1011
- [Nathan und Shiloh 2000] NATHAN, Carl ; SHILOH, Michael U.: Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (2000), Nr. 16, S. 8841–8848
- [Nehls 2011] NEHLS, C.: *Biophysikalische Charakterisierung der Bindung von antimikrobiellen Peptiden an Membranen und der Beeinflussung ihrer mechanischen Eigenschaften*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Thesis, 2011

- [Neubauer et al. 1990] NEUBAUER, Gabi ; COHEN, Sidney R. ; MCCLELLAND, Gary M. ; HORNE, Don ; MATE, C M.: Force microscopy with a bidirectional capacitance sensor. In: *Review of Scientific Instruments* 61 (1990), Nr. 9, S. 2296–2308
- [Newton und Dixit 2012] NEWTON, Kim ; DIXIT, Vishva M.: Signaling in innate immunity and inflammation. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4 (2012), Nr. 3, S. a006049
- [Nicolini et al. 2006] NICOLINI, Chiara ; BARANSKI, Jörg ; SCHLUMMER, Stefanie ; PALOMO, José ; LUMBIERRES-BURGUES, Maria ; KAHMS, Martin ; KUHLMANN, Jürgen ; SANCHEZ, Susana ; GRATTON, Enrico ; WALDMANN, Herbert: Visualizing association of N-Ras in lipid microdomains: influence of domain structure and interfacial adsorption. In: *Journal of the American Chemical Society* 128 (2006), Nr. 1, S. 192–201
- [Nicolson 2014] NICOLSON, Garth L.: The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40years. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1838 (2014), Nr. 6, S. 1451–1466
- [Nightingale Jr 1959] NIGHTINGALE JR, ER: Phenomenological theory of ion solvation. Effective radii of hydrated ions. In: *The Journal of Physical Chemistry* 63 (1959), Nr. 9, S. 1381–1387
- [Nylandsted et al. 2004] NYLANDSTED, Jesper ; GYRD-HANSEN, Mads ; DANIELEWICZ, Agnieszka ; FEHRENBACHER, Nicole ; LADEMANN, Ulrik ; HANSEN, Maria Hø y. ; WEBER, Ekkehard ; MULTHOFF, Gabriele ; ROHDE, Mikkel ; JÄÄTTELÄ, Marja: Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. In: *The Journal of experimental medicine* 200 (2004), Nr. 4, S. 425–435
- [Ocampo-Sosa et al. 2007] OCAMPO-SOSA, Alain A. ; LEWIS, Deborah A. ; NAVAS, Jesús ; QUIGLEY, Frances ; CALLEJO, Raquel ; SCORTTI, Mariela ; LEADON, Desmond P. ; FOGARTY, Ursula ; VÁZQUEZ-BOLAND, José A.: Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* based on traA, vapA, and vapB virulence plasmid markers. In: *Journal of Infectious Diseases* 196 (2007), Nr. 5, S. 763–769
- [Olson et al. 1985] OLSON, Eric N. ; TOWLER, DA ; GLASER, L: Specificity of fatty acid acylation of cellular proteins. In: *Journal of Biological Chemistry* 260 (1985), Nr. 6, S. 3784–3790
- [Overton 1896] OVERTON, Ernst: Ueber die osmotischen eigenschaften der zelle in ihrer bedeutung fur die toxikologie und pharmakologie. In: *Z. phys. Chem* 22 (1896), S. 189–209
- [Papahadjopoulos et al. 1977] PAPAHAJDOPOULOS, D ; VAIL, WJ ; NEWTON, C ; NIR, S ; JACOBSON, K ; POSTE, G ; LAZO, R: Studies on membrane fusion. III. The role of calcium-induced phase changes. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 465 (1977), Nr. 3, S. 579–598
- [Papahadjopoulos et al. 1976] PAPAHAJDOPOULOS, D ; VAIL, WJ ; PANGBORN, WA ; POSTE, G: Studies on membrane fusion. II. Induction of fusion in pure phospholipid membranes by calcium ions and other divalent metals. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 448 (1976), Nr. 2, S. 265–283

- [Pasandideh-Fard et al. 1996] PASANDIDEH-FARD, M ; QIAO, YM ; CHANDRA, S ; MOSTAGHIMI, J: Capillary effects during droplet impact on a solid surface. In: *Physics of Fluids* 8 (1996), Nr. 3, S. 650–659
- [Pautot et al. 2003] PAUTOT, Sophie ; FRISKEN, Barbara J. ; WEITZ, DA: Engineering asymmetric vesicles. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (2003), Nr. 19, S. 10718–10721
- [Peiser et al. 2000] PEISER, Leanne ; GOUGH, Peter J. ; KODAMA, Tatsuhiko ; GORDON, Siamon: Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of *Escherichia coli*: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro. In: *Infection and immunity* 68 (2000), Nr. 4, S. 1953–1963
- [Peri und Nüsslein-Volhard 2008] PERI, Francesca ; NÜSSLEIN-VOLHARD, Christiane: Live imaging of neuronal degradation by microglia reveals a role for v0-ATPase a1 in phagosomal fusion in vivo. In: *Cell* 133 (2008), Nr. 5, S. 916–927
- [Perozo et al. 2002] PEROZO, Eduardo ; KLODA, Anna ; CORTES, D M. ; MARTINAC, Boris: Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 9 (2002), Nr. 9, S. 696–703
- [Peterson et al. 2002] PETERSON, Uwe ; MANNOCK, David A. ; LEWIS, Ruthven N. ; POHL, Peter ; MCELHANEY, Ronald N. ; POHL, Elena E.: Origin of membrane dipole potential: Contribution of the phospholipid fatty acid chains. In: *Chemistry and physics of lipids* 117 (2002), Nr. 1, S. 19–27
- [Pike 2009] PIKE, L. J.: The challenge of lipid rafts. In: *J Lipid Res* 50 Suppl (2009), S323-8
- [Planck 1922] PLANCK, Max: *Vorlesungen über Thermodynamik*. Berlin, Leipzig : Walter De Gruyter & Co., 1922
- [Pokorny und Almeida 2004] POKORNY, Antje ; ALMEIDA, Paulo F.: Kinetics of dye efflux and lipid flip-flop induced by δ -lysine in phosphatidylcholine vesicles and the mechanism of graded release by amphipathic, α -helical peptides. In: *Biochemistry* 43 (2004), Nr. 27, S. 8846–8857
- [Pokorny et al. 2002] POKORNY, Antje ; BIRKBECK, T H. ; ALMEIDA, Paulo F.: Mechanism and kinetics of δ -lysine interaction with phospholipid vesicles. In: *Biochemistry* 41 (2002), Nr. 36, S. 11044–11056
- [Poland et al. 2015] POLAND, Simon P. ; KRSTAJIĆ, Nikola ; MONYPENNY, James ; COELHO, Simao ; TYNDALL, David ; WALKER, Richard J. ; DEVAUGES, Viviane ; RICHARDSON, Justin ; DUTTON, Neale ; BARBER, Paul: A high speed multifocal multiphoton fluorescence lifetime imaging microscope for live-cell FRET imaging. In: *Biomedical optics express* 6 (2015), Nr. 2, S. 277–296
- [Pomorski und Menon 2006] POMORSKI, T ; MENON, AK: Lipid flippases and their biological functions. In: *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 63 (2006), Nr. 24, S. 2908–2921

- [Pontes et al. 2013] PONTES, Bruno ; AYALA, Yareni ; FONSECA, Anna Carolina C. ; ROMAO, Luciana F. ; AMARAL, Rackele F. ; SALGADO, Leonardo T. ; LIMA, Flavia R. ; FARINA, Marcos ; VIANA, Nathan B. ; MOURA-NETO, Vivaldo: Membrane elastic properties and cell function. In: *PloS one* 8 (2013), Nr. 7, S. e67708
- [Prescott 1991] PRESCOTT, John F.: Rhodococcus equi: an animal and human pathogen. In: *Clinical Microbiology Reviews* 4 (1991), Nr. 1, S. 20–34
- [Prigogine und Nicolis 1971] PRIGOGINE, I. ; NICOLIS, G.: Biological order, structure and instabilities. In: *Quarterly Reviews of Biophysics* 4 (1971), Nr. 2, 3, S. 107–148
- [Quehenberger et al. 2010] QUEHENBERGER, Oswald ; ARMANDO, Aaron M. ; BROWN, Alex H. ; MILNE, Stephen B. ; MYERS, David S. ; MERRILL, Alfred H. ; BANDYOPADHYAY, Sibali ; JONES, Kristin N. ; KELLY, Samuel ; SHANER, Rebecca L.: Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. In: *Journal of lipid research* 51 (2010), Nr. 11, S. 3299–3305
- [Rabinovitch 1995] RABINOVITCH, Michel: Professional and non-professional phagocytes: an introduction. In: *Trends in cell biology* 5 (1995), Nr. 3, S. 85–87
- [Ramachandra et al. 2001] RAMACHANDRA, Lakshmi ; NOSS, Erika ; BOOM, W H. ; HARDING, Clifford V.: Processing of Mycobacterium tuberculosis antigen 85B involves intraphagosomal formation of peptide–major histocompatibility complex II complexes and is inhibited by live bacilli that decrease phagosome maturation. In: *The Journal of experimental medicine* 194 (2001), Nr. 10, S. 1421–1432
- [Rame 1997] RAME, E: The interpretation of dynamic contact angles measured by the Wilhelmy plate method. In: *Journal of colloid and interface science* 185 (1997), Nr. 1, S. 245–251
- [Rausch et al. 2007] RAUSCH, Joshua M. ; MARKS, Jessica R. ; RATHINAKUMAR, Ramesh ; WIMLEY, William C.: β -sheet pore-forming peptides selected from a rational combinatorial library: mechanism of pore formation in lipid vesicles and activity in biological membranes. In: *Biochemistry* 46 (2007), Nr. 43, S. 12124–12139
- [Reimhult und Kumar 2008] REIMHULT, Erik ; KUMAR, Karthik: Membrane biosensor platforms using nano-and microporous supports. In: *Trends in biotechnology* 26 (2008), Nr. 2, S. 82–89
- [Ren und Prescott 2003] REN, Jun ; PRESCOTT, John F.: Analysis of virulence plasmid gene expression of intra-macrophage and in vitro grown Rhodococcus equi ATCC 33701. In: *Veterinary microbiology* 94 (2003), Nr. 2, S. 167–182
- [Richter et al. 2006] RICHTER, Ralf P. ; BÉRAT, Rémi ; BRISSE, Alain R.: Formation of solid-supported lipid bilayers: an integrated view. In: *Langmuir* 22 (2006), Nr. 8, S. 3497–3505
- [Richter und Brisson 2005] RICHTER, Ralf P. ; BRISSE, Alain R.: Following the formation of supported lipid bilayers on mica: a study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. In: *Biophysical journal* 88 (2005), Nr. 5, S. 3422–3433

- [Riegler und Spratte 1992] RIEGLER, Hans ; SPRATTE, Karl: Structural changes in lipid monolayers during the Langmuir-Blodgett transfer due to substrate/monolayer interactions. In: *Thin Solid Films* 210 (1992), S. 9–12
- [Rietschel et al. 1994] RIETSCHEL, Ernst T. ; KIRIKAE, Teruo ; SCHADE, F U. ; MAMAT, Uwe ; SCHMIDT, Gunter ; LOPPNOW, Haarald ; ULMER, Artur J. ; ZÄHRINGER, U ; SEYDEL, Ulrich ; DI PADOVA, F: Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. In: *The FASEB Journal* 8 (1994), Nr. 2, S. 217–225
- [Rinia und de Kruijff 2001] RINIA, Hilde A. ; KRUIJFF, Ben de: Imaging domains in model membranes with atomic force microscopy. In: *FEBS letters* 504 (2001), Nr. 3, S. 194–199
- [Robertson 1981] ROBERTSON, J D.: Membrane structure. In: *The Journal of cell biology* 91 (1981), Nr. 3, S. 189s–204s
- [Robertson 1958] ROBERTSON, JD: The cell membrane concept. In: *Journal of Physiology, London* Bd. 140, Cambridge Univ. Press, New York, 1958. – ISBN 0022–3751, S. 58–59
- [Rocha-Gaso et al. 2009] ROCHA-GASO, M. I. ; MARCH-IBORRA, C. ; MONTOYA-BAIDES, A. ; ARNAU-VIVES, A.: Surface generated acoustic wave biosensors for the detection of pathogens: a review. In: *Sensors (Basel)* 9 (2009), Nr. 7, 5740–69
- [Rodríguez-Muela et al. 2015] RODRÍGUEZ-MUELA, N ; HERNÁNDEZ-PINTO, AM ; SERRANO-PUEBLA, A ; GARCÍA-LEDO, L ; LATORRE, SH ; ROSA, EJ de l. ; BOYA, P: Lysosomal membrane permeabilization and autophagy blockade contribute to photoreceptor cell death in a mouse model of retinitis pigmentosa. In: *Cell Death & Differentiation* 22 (2015), Nr. 3, S. 476–487
- [Roes et al. 2006] ROES, Stefanie ; MUMM, Florian ; SEYDEL, Ulrich ; GUTSMANN, Thomas: Localization of the lipopolysaccharide-binding protein in phospholipid membranes by atomic force microscopy. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (2006), Nr. 5, S. 2757–2763
- [Roes et al. 2005] ROES, Stefanie ; SEYDEL, Ulrich ; GUTSMANN, Thomas: Probing the properties of lipopolysaccharide monolayers and their interaction with the antimicrobial peptide polymyxin B by atomic force microscopy. In: *Langmuir* 21 (2005), Nr. 15, S. 6970–6978
- [Rosin und Okusa 2011] ROSIN, Diane L. ; OKUSA, Mark D.: Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 22 (2011), Nr. 3, S. 416–425
- [Rossi und Chopineau 2007] ROSSI, Claire ; CHOPINEAU, Joël: Biomimetic tethered lipid membranes designed for membrane-protein interaction studies. In: *European Biophysics Journal* 36 (2007), Nr. 8, S. 955–965
- [Roy et al. 2008] ROY, Rahul ; HOHNG, Sungchul ; HA, Taekjip: A practical guide to single-molecule FRET. In: *Nature methods* 5 (2008), Nr. 6, S. 507–516
- [Sackmann und Tanaka 2000] SACKMANN, Erich ; TANAKA, Motomu: Supported membranes on soft polymer cushions: fabrication, characterization and applications. In: *Trends in biotechnology* 18 (2000), Nr. 2, S. 58–64

- [Saher et al. 2005] SAHER, Gesine ; BRÜGGER, Britta ; LAPPE-SIEFKE, Corinna ; MÖBIUS, Wiebke ; TOZAWA, Ryu-ichi ; WEHR, Michael C. ; WIELAND, Felix ; ISHIBASHI, Shun ; NAVE, Klaus-Armin: High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. In: *Nature neuroscience* 8 (2005), Nr. 4, S. 468–475
- [Salim et al. 1996] SALIM, Kamran ; BOTTOMLEY, Matthew J. ; QUERFURTH, E ; ZVELEBIL, MJ ; GOUT, I ; SCAIFE, R ; MARGOLIS, RL ; GIGG, R ; SMITH, CI ; DRISCOLL, PC: Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. In: *The EMBO journal* 15 (1996), Nr. 22, S. 6241
- [Sauerbrey 1959] SAUERBREY, Günter: Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. In: *Zeitschrift für physik* 155 (1959), Nr. 2, S. 206–222
- [Saunders et al. 1962] SAUNDERS, L ; PERRIN, J ; GAMMACK, D: Ultrasonic irradiation of some phospholipid sols. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 14 (1962), Nr. 1, S. 567–572
- [Schindler 1980] SCHINDLER, Hansgeorg: Formation of planar bilayers from artificial or native membrane vesicles. In: *FEBS letters* 122 (1980), Nr. 1, S. 77–79
- [Schneggenburger et al. 2011] SCHNEGGENBURGER, P. E. ; BEERLINK, A. ; WEINHAUSEN, B. ; SALDITT, T. ; DIEDERICHSEN, U.: Peptide model helices in lipid membranes: insertion, positioning, and lipid response on aggregation studied by X-ray scattering. In: *Eur Biophys J* 40 (2011), Nr. 4, 417-36
- [Schneider 1994] SCHNEIDER, E. D.: Life as a manifestation of the second law of thermodynamics. In: *Mathl. Comput. Modelling* 19 (1994), Nr. 6-8, S. 25–48
- [Schoch et al. 1979] SCHOCH, Peter ; SARGENT, David F. ; SCHWYZER, Robert: Capacitance and conductance as tools for the measurement of asymmetric surface potentials and energy barriers of lipid bilayer membranes. In: *The Journal of membrane biology* 46 (1979), Nr. 1, S. 71–89
- [Schrödinger 1944] SCHRÖDINGER, Erwin: *What is life?* London : Cambridge University Press, 1944
- [Schroit und Gallily 1979] SCHROIT, AJ ; GALLILY, R: Macrophage fatty acid composition and phagocytosis: effect of unsaturation on cellular phagocytic activity. In: *Immunology* 36 (1979), Nr. 2, S. 199
- [Schwartz 1997] SCHWARTZ, Daniel K.: Langmuir-Blodgett film structure. In: *Surface Science Reports* 27 (1997), Nr. 7, S. 245–334
- [Schwarz und Taylor 1995] SCHWARZ, Gerhard ; TAYLOR, Susanne E.: Thermodynamic analysis of the surface activity exhibited by a largely hydrophobic peptide. In: *Langmuir* 11 (1995), Nr. 11, S. 4341–4346
- [Scott et al. 2003] SCOTT, C. C. ; BOTELHO, R. J. ; GRINSTEIN, S.: Phagosome maturation: a few bugs in the system. In: *J Membr Biol* 193 (2003), Nr. 3, 137-52

- [Scott et al. 2013] SCOTT, Daniel J. ; KUMMER, Lutz ; TREMMEL, Dirk ; PLÜCKTHUN, Andreas: Stabilizing membrane proteins through protein engineering. In: *Current opinion in chemical biology* 17 (2013), Nr. 3, S. 427–435
- [Scott et al. 2012] SCOTT, Jordan L. ; MUSSELMAN, Catherine A. ; ADU-GYAMFI, Emmanuel ; KUTATELADZE, Tatiana G. ; STAHELIN, Robert V.: Emerging methodologies to investigate lipid–protein interactions. In: *Integrative Biology* 4 (2012), Nr. 3, S. 247–258
- [Sekar und Periasamy 2003] SEKAR, Rajesh B. ; PERIASAMY, Ammasi: Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. In: *The Journal of cell biology* 160 (2003), Nr. 5, S. 629–633
- [Seul und Sammon 1990] SEUL, M ; SAMMON, MJ: Preparation of surfactant multilayer films on solid substrates by deposition from organic solution. In: *Thin Solid Films* 185 (1990), Nr. 2, S. 287–305
- [Shai 2002] SHAI, Yechiel: Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. In: *Peptide Science* 66 (2002), Nr. 4, S. 236–248
- [Simon und McIntosh 1989] SIMON, SA ; MCINTOSH, TJ: Magnitude of the solvation pressure depends on dipole potential. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86 (1989), Nr. 23, S. 9263–9267
- [Simons und Ehehalt 2002] SIMONS, Kai ; EHEHALT, Robert: Cholesterol, lipid rafts, and disease. In: *The Journal of clinical investigation* 110 (2002), Nr. 110 (5), S. 597–603
- [Simons und Ikonen 1997] SIMONS, Kai ; IKONEN, Elina: Functional rafts in cell membranes. In: *Nature* 387 (1997), Nr. 6633, S. 569–572
- [Singer und Nicolson 1972] SINGER, SJ ; NICOLSON, Garth L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. In: *Day and Good Membranes and viruses in immunopathology* (1972), S. 7–47
- [Skaar 2010] SKAAR, Eric P.: The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. In: *PLoS Pathog* 6 (2010), Nr. 8, S. e1000949–e1000949
- [Skou 1965] SKOU, J C.: Enzymatic basis for active transport of Na⁺ and K⁺ across cell membrane. In: *Physiological Reviews* 45 (1965), Nr. 3, S. 596–618
- [Smith et al. 1995] SMITH, Greg A. ; MARQUIS, Helene ; JONES, Sian ; JOHNSTON, Norah C. ; PORTNOY, Daniel A. ; GOLDFINE, Howard: The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. In: *Infection and immunity* 63 (1995), Nr. 11, S. 4231–4237
- [Snell 1990] SNELL, WJ: Adhesion and signalling during fertilization in multicellular and unicellular organisms. In: *Current opinion in cell biology* 2 (1990), Nr. 5, S. 821–832
- [Spector und Yorek 1985] SPECTOR, Arthur A. ; YOREK, Mark A.: Membrane lipid composition and cellular function. In: *Journal of lipid research* 26 (1985), Nr. 9, S. 1015–1035
- [Stenmark 2009] STENMARK, Harald: Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. In: *Nature reviews Molecular cell biology* 10 (2009), Nr. 8, S. 513–525

- [Stokes 1852] STOKES, George G.: On the change of refrangibility of light. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* (1852), S. 463–562
- [Stout et al. 1996] STOUT, James G. ; SIMS, Peter J. ; WIEDMER, Therese: Isolation of an erythrocyte membrane protein that mediates Ca²⁺-dependent transbilayer movement of phospholipid. In: *Journal of Biological Chemistry* 271 (1996), Nr. 29, S. 17205–17210
- [Struck et al. 1981] STRUCK, Douglas K. ; HOEKSTRA, Dick ; PAGANO, Richard E.: Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. In: *Biochemistry* 20 (1981), Nr. 14, S. 4093–4099
- [Sturgill-Koszycki et al. 1996] STURGILL-KOSZYCKI, S ; SCHAIBLE, UE ; RUSSELL, DG: Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. In: *The EMBO journal* 15 (1996), Nr. 24, S. 6960
- [Sun et al. 2007] SUN, Mingzhai ; NORTHUP, Nathan ; MARGA, Françoise ; HUBER, Tamas ; BYFIELD, Fitzroy J. ; LEVITAN, Irena ; FORGACS, Gabor: The effect of cellular cholesterol on membrane-cytoskeleton adhesion. In: *Journal of cell science* 120 (2007), Nr. 13, S. 2223–2231
- [Sutcliffe 1998] SUTCLIFFE, Iain C.: Cell envelope composition and organisation in the genus *Rhodococcus*. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 74 (1998), Nr. 1-3, S. 49–58
- [Swanson und Baer 1995] SWANSON, Joel A. ; BAER, Stephen C.: Phagocytosis by zippers and triggers. In: *Trends in cell biology* 5 (1995), Nr. 3, S. 89–93
- [Szoka Jr und Papahadjopoulos 1980] SZOKA JR, Frank ; PAPAHAJDOPOULOS, Demetrios: Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). In: *Annual review of biophysics and bioengineering* 9 (1980), Nr. 1, S. 467–508
- [Taatjes et al. 2013] TAATJES, Douglas J. ; QUINN, Anthony S. ; RAND, Jacob H. ; JENA, Bhanu P.: Atomic force microscopy: high resolution dynamic imaging of cellular and molecular structure in health and disease. In: *Journal of cellular physiology* 228 (2013), Nr. 10, S. 1949–1955
- [Takai et al. 1993] TAKAI, S ; IIE, M ; KOBAYASHI, C ; MORISHITA, T ; NISHIO, T ; ISHIDA, T ; FUJIMURA, T ; SASAKI, Y ; TSUBAKI, S: Monoclonal antibody specific to virulence-associated 15-to 17-kilodalton antigens of *Rhodococcus equi*. In: *Journal of clinical microbiology* 31 (1993), Nr. 10, S. 2780–2782
- [Takai et al. 1992] TAKAI, S ; IIE, M ; WATANABE, Y ; TSUBAKI, S ; SEKIZAKI, T: Virulence-associated 15-to 17-kilodalton antigens in *Rhodococcus equi*: temperature-dependent expression and location of the antigens. In: *Infection and immunity* 60 (1992), Nr. 7, S. 2995–2997
- [Takai et al. 1991a] TAKAI, S ; KOIKE, K ; OHBUSHI, S ; IZUMI, C ; TSUBAKI, S: Identification of 15-to 17-kilodalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi*. In: *Journal of clinical microbiology* 29 (1991), Nr. 3, S. 439–443
- [Takai et al. 1991b] TAKAI, S ; SEKIZAKI, T ; OZAWA, T ; SUGAWARA, T ; WATANABE, Y ; TSUBAKI, S: Association between a large plasmid and 15-to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. In: *Infection and immunity* 59 (1991), Nr. 11, S. 4056–4060

- [Takai et al. 2000a] TAKAI, Shinji ; ANZAI, Toru ; FUJITA, Yosuke ; AKITA, Osamu ; SHODA, Masato ; TSUBAKI, Shiro ; WADA, Ryuichi: Pathogenicity of *Rhodococcus equi* expressing a virulence-associated 20 kDa protein (VapB) in foals. In: *Veterinary microbiology* 76 (2000), Nr. 1, S. 71–80
- [Takai et al. 2000b] TAKAI, Shinji ; HINES, Stephen A. ; SEKIZAKI, Tsutomu ; NICHOLSON, Vivian M. ; ALPERIN, Debra A. ; OSAKI, Makoto ; TAKAMATSU, Daisuke ; NAKAMURA, Mutsu ; SUZUKI, Kayo ; OGINO, Nobuko: DNA sequence and comparison of virulence plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. In: *Infection and immunity* 68 (2000), Nr. 12, S. 6840–6847
- [Takai et al. 1995] TAKAI, Shinji ; IMAI, Yumiko ; FUKUNAGA, Nariaki ; UCHIDA, Yoshiyuki ; KAMISAWA, Kei ; SASAKI, Yukako ; TSUBAKI, Shiro ; SEKIZAKI, Tsutomu: Identification of virulence-associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with AIDS. In: *Journal of Infectious Diseases* 172 (1995), Nr. 5, S. 1306–1311
- [Tamm und McConnell 1985] TAMM, Lukas K. ; MCCONNELL, Harden M.: Supported phospholipid bilayers. In: *Biophysical journal* 47 (1985), Nr. 1, S. 105
- [Tan et al. 1995] TAN, C ; PRESCOTT, JF ; PATTERSON, MC ; NICHOLSON, VM: Molecular characterization of a lipid-modified virulence-associated protein of *Rhodococcus equi* and its potential in protective immunity. In: *Canadian Journal of Veterinary Research* 59 (1995), Nr. 1, S. 51
- [Tanaka und Sackmann 2005] TANAKA, M. ; SACKMANN, E.: Polymer-supported membranes as models of the cell surface. In: *Nature* 437 (2005), Nr. 7059, S. 656–63
- [Tanford 1978] TANFORD, Charles: The hydrophobic effect and the organization of living matter. In: *Science* 200 (1978), Nr. 4345, S. 1012–1018
- [Tardieu et al. 1973] TARDIEU, A ; LUZZATI, Vittorio ; REMAN, FC: Structure and polymorphism of the hydrocarbon chains of lipids: a study of lecithin-water phases. In: *Journal of molecular biology* 75 (1973), Nr. 4, S. 711–733
- [Teitelbaum et al. 1999] TEITELBAUM, R ; CAMMER, M ; MAITLAND, ML ; FREITAG, NE ; CONDEELIS, J ; BLOOM, BR: Mycobacterial infection of macrophages results in membrane-permeable phagosomes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (1999), Nr. 26, S. 15190–15195
- [Teixeira 1993] TEIXEIRA, J: The physics of liquid water. In: *Le Journal de Physique IV* 3 (1993), Nr. C1, S. C1–163–C1–169
- [Thewalt und Bloom 1992] THEWALT, Jenifer L. ; BLOOM, Myer: Phosphatidylcholine: cholesterol phase diagrams. In: *Biophysical journal* 63 (1992), Nr. 4, S. 1176
- [Tjelle et al. 2000] TJELLE, Torunn E. ; LØVDAL, Torunn ; BERG, Trond: Phagosome dynamics and function. In: *Bioessays* 22 (2000), Nr. 3, S. 255–263
- [Tocanne et al. 1994] TOCANNE, Jean-François ; DUPOU-CÉZANNE, Laurence ; LOPEZ, André: Lateral diffusion of lipids in model and natural membranes. In: *Progress in lipid research* 33 (1994), Nr. 3, S. 203–237

- [Tocanne et al. 1989] TOCANNE, Jean-François ; DUPOU-CÉZANNE, Laurence ; LOPEZ, André ; TOURNIER, Jean-François: Lipid lateral diffusion and membrane organization. In: *FEBS letters* 257 (1989), Nr. 1, S. 10–16
- [Tocanne und Teissié 1990] TOCANNE, Jean-François ; TEISSIÉ, Justin: Ionization of phospholipids and phospholipid-supported interfacial lateral diffusion of protons in membrane model systems. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes* 1031 (1990), Nr. 1, S. 111–142
- [Todt et al. 1992] TODT, Jill C. ; ROCQUE, Warren J. ; MCGROARTY, Estelle J.: Effects of pH on bacterial porin function. In: *Biochemistry* 31 (1992), Nr. 43, S. 10471–10478
- [Tomita 1966] TOMITA, Tadao: Membrane capacity and resistance of mammalian smooth muscle. In: *Journal of theoretical biology* 12 (1966), Nr. 2, S. 216–227
- [Tosi 2005] TOSI, Michael F.: Innate immune responses to infection. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116 (2005), Nr. 2, S. 241–249
- [Toyooka et al. 2005] TOYOOKA, K. ; TAKAI, S. ; KIRIKAE, T.: Rhodococcus equi can survive a phagolysosomal environment in macrophages by suppressing acidification of the phagolysosome. In: *J Med Microbiol* 54 (2005), Nr. Pt 11, 1007-15
- [von Tschärner und McConnell 1981] TSCHARNER, Vinzenz von ; MCCONNELL, Harden M.: Physical properties of lipid monolayers on alkylated planar glass surfaces. In: *Biophysical journal* 36 (1981), Nr. 2, S. 421
- [Tucker und Casadevall 2002] TUCKER, Stephanie C. ; CASADEVALL, Arturo: Replication of Cryptococcus neoformans in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (2002), Nr. 5, S. 3165–3170
- [Uffink 2001] UFFINK, Jos: Bluff your way in the second law of thermodynamics. In: *Studies in History and Philosophy of Science Part B: Studies in History and Philosophy of Modern Physics* 32 (2001), Nr. 3, S. 305–394
- [Ulrich 2002] ULRICH, Anne S.: Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. In: *Bioscience reports* 22 (2002), Nr. 2, S. 129–150
- [Uttenthaler 2002] UTTENTHALER, Erich J.: *Hochempfindliche akustische Sensorelemente für die Flüssigkeits- und Biosensorik*. Herbert Utz Verlag, 2002. – ISBN 3831601321
- [Varma und Mayor 1998] VARMA, Rajat ; MAYOR, Satyajit: GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. In: *Nature* 394 (1998), Nr. 6695, S. 798–801
- [Vaz et al. 1984] VAZ, Winchil L. ; GOODSID-ZALDUONDO, Federico ; JACOBSON, Ken: Lateral diffusion of lipids and proteins in bilayer membranes. In: *FEBS letters* 174 (1984), Nr. 2, S. 199–207
- [Vazquez-Boland et al. 2013] VAZQUEZ-BOLAND, J. A. ; GIGUERE, S. ; HAPESHI, A. ; MACARTHUR, I. ; ANASTASI, E. ; VALERO-RELO, A.: Rhodococcus equi: the many facets of a pathogenic actinomycete. In: *Vet Microbiol* 167 (2013), Nr. 1-2, 9-33

- [Veatch et al. 2004] VEATCH, SL ; POLOZOV, IV ; GAWRISCH, K ; KELLER, SL: Liquid domains in vesicles investigated by NMR and fluorescence microscopy. In: *Biophysical journal* 86 (2004), Nr. 5, S. 2910–2922
- [Vereb et al. 2003] VEREB, G. ; SZOLLOSI, J. ; MATKO, J. ; NAGY, P. ; FARKAS, T. ; VIGH, L. ; MATYUS, L. ; WALDMANN, T. A. ; DAMJANOVICH, S.: Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), Nr. 14, 8053-8
- [Verkleij und Post 2000] VERKLEIJ, AJ ; POST, JA: Membrane phospholipid asymmetry and signal transduction. In: *Journal of Membrane Biology* 178 (2000), Nr. 1, S. 1–10
- [Via et al. 1997] VIA, Laura E. ; DERETIC, Dusanka ; ULMER, Roseann J. ; HIBLER, Nina S. ; HUBER, Lukas A. ; DERETIC, V: Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997), Nr. 20, S. 13326–13331
- [Vieira et al. 2002] VIEIRA, O ; BOTELHO, R ; GRINSTEIN, Sergio: Phagosome maturation: aging gracefully. In: *Biochem. j* 366 (2002), S. 689–704
- [Vist und Davis 1990] VIST, Margus R. ; DAVIS, James H.: Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: deuterium nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. In: *Biochemistry* 29 (1990), Nr. 2, S. 451–464
- [Walev et al. 2001] WALEV, Iwan ; BHAKDI, Sebastian C. ; HOFMANN, Fred ; DJONDER, Nabil ; VALEVA, Angela ; AKTORIES, Klaus ; BHAKDI, Sucharit: Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (2001), Nr. 6, S. 3185–3190
- [Wallace et al. 2006] WALLACE, Elizabeth J. ; HOOPER, Nigel M. ; OLMSTED, Peter D.: Effect of hydrophobic mismatch on phase behavior of lipid membranes. In: *Biophysical journal* 90 (2006), Nr. 11, S. 4104–4118
- [Wang et al. 2012] WANG, Honglei ; CHUNG, Tai-Shung ; TONG, Yen W. ; JEYASEELAN, Kandiah ; ARMUGAM, Arunmozhiarasi ; CHEN, Zaichun ; HONG, Minghui ; MEIER, Wolfgang: Highly Permeable and Selective Pore-Spanning Biomimetic Membrane Embedded with Aquaporin Z. In: *Small* 8 (2012), Nr. 8, S. 1185–1190
- [Weiß und Enderlein 2012] WEISS, Kerstin ; ENDERLEIN, Jörg: Lipid Diffusion within Black Lipid Membranes Measured with Dual-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *ChemPhysChem* 13 (2012), Nr. 4, S. 990–1000
- [Weiß et al. 2013] WEISS, Kerstin ; NEEF, Andreas ; VAN, Qui ; KRAMER, Stefanie ; GREGOR, Ingo ; ENDERLEIN, Jörg: Quantifying the diffusion of membrane proteins and peptides in black lipid membranes with 2-focus fluorescence correlation spectroscopy. In: *Biophysical journal* 105 (2013), Nr. 2, S. 455–462
- [Weinstock und Brown 2002] WEINSTOCK, David M. ; BROWN, Arthur E.: *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. In: *Clinical infectious diseases* 34 (2002), Nr. 10, S. 1379–1385

- [van der Wel et al. 2007] WEL, Nicole van d. ; HAVA, David ; HOUBEN, Diane ; FLUITSMA, Donna ; ZON, Maaike van ; PIERSON, Jason ; BRENNER, Michael ; PETERS, Peter J.: M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. In: *Cell* 129 (2007), Nr. 7, S. 1287–1298
- [te Welscher et al. 2012] WELSCHER, Yvonne M. ; LEEUWEN, Martin R. ; KRUIJFF, Ben de ; DIJKSTERHUIS, Jan ; BREUKINK, Eefjan: Polyene antibiotic that inhibits membrane transport proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (2012), Nr. 28, S. 11156–11159
- [Werb und Cohn 1972] WERB, Zena ; COHN, Zanvil A.: Plasma membrane synthesis in the macrophage following phagocytosis of polystyrene latex particles. In: *Journal of Biological Chemistry* 247 (1972), Nr. 8, S. 2439–2446
- [White und Voltmer 1965] WHITE, RM ; VOLTMER, FW: Direct piezoelectric coupling to surface elastic waves. In: *Applied physics letters* 7 (1965), Nr. 12, S. 314–316
- [Whittam und Wheeler 1970] WHITTAM, R ; WHEELER, KP: Transport across cell membranes. In: *Annual review of physiology* 32 (1970), Nr. 1, S. 21–60
- [Wiese et al. 1997] WIESE, Andre ; BRANDENBURG, Klaus ; LINDNER, Buko ; SCHROMM, Andra B. ; CARROLL, Stephen F. ; RIETSCHEL, Ernst T. ; SEYDEL, Ulrich: Mechanisms of action of the bactericidal/permeability-increasing protein BPI on endotoxin and phospholipid monolayers and aggregates. In: *Biochemistry* 36 (1997), Nr. 33, S. 10301–10310
- [Wiese et al. 2003] WIESE, Andre ; GUTSMANN, Thomas ; SEYDEL, Ulrich: Review: Towards antibacterial strategies: studies on the mechanisms of interaction between antibacterial peptides and model membranes. In: *Journal of endotoxin research* 9 (2003), Nr. 2, S. 67–84
- [Wittlich 2011] WITTLICH, M.: *Die Rolle des Virulenz-assoziierten Proteins VapA in der Rhodococcus equi-Infektion von Makrophagen*, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Thesis, 2011
- [Woese et al. 1990] WOESE, Carl R. ; KANDLER, Otto ; WHEELIS, Mark L.: Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (1990), Nr. 12, S. 4576–4579
- [Xie et al. 2002] XIE, Anne F. ; YAMADA, Ryo ; GEWIRTH, Andrew A. ; GRANICK, Steve: Materials science of the gel to fluid phase transition in a supported phospholipid bilayer. In: *Physical review letters* 89 (2002), Nr. 24, S. 246103
- [Yandrapalli et al. 2014] YANDRAPALLI, Naresh ; MURIAUX, Delphine ; FAVARD, Cyril: Lipid domains in HIV-1 assembly. In: *Frontiers in microbiology* 5 (2014)
- [Yates et al. 2005] YATES, R. M. ; HERMETTER, A. ; RUSSELL, D. G.: The kinetics of phagosome maturation as a function of phagosome/lysosome fusion and acquisition of hydrolytic activity. In: *Traffic* 6 (2005), Nr. 5, 413–20
- [Yetukuri et al. 2008] YETUKURI, Laxman ; EKROOS, Kim ; VIDAL-PUIG, Antonio ; OREŠIČ, Matej: Informatics and computational strategies for the study of lipids. In: *Molecular BioSystems* 4 (2008), Nr. 2, S. 121–127

- [Yuan et al. 2002] YUAN, Chunbo ; FURLONG, Jennifer ; BURGOS, Pierre ; JOHNSTON, Linda J.: The size of lipid rafts: an atomic force microscopy study of ganglioside GM1 domains in sphingomyelin/DOPC/cholesterol membranes. In: *Biophysical journal* 82 (2002), Nr. 5, S. 2526–2535
- [Zanetti 2005] ZANETTI, Margherita: The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. In: *Current issues in molecular biology* 7 (2005), Nr. 2, S. 179–196
- [Zanetti et al. 1995] ZANETTI, Margherita ; GENNARO, Renato ; ROMEO, Domenico: Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. In: *FEBS letters* 374 (1995), Nr. 1, S. 1–5
- [Zasloff 1992] ZASLOFF, Michael: Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. In: *Current opinion in immunology* 4 (1992), Nr. 1, S. 3–7
- [Zhao et al. 2007] ZHAO, J. ; WU, J. ; HEBERLE, F. A. ; MILLS, T. T. ; KLAWITTER, P. ; HUANG, G. ; COSTANZA, G. ; FEIGENSON, G. W.: Phase studies of model biomembranes: complex behavior of DSPC/DOPC/cholesterol. In: *Biochim Biophys Acta* 1768 (2007), Nr. 11, 2764–76
- [Zheng und Vanderkooi 1992] ZHENG, Chong ; VANDERKOOI, Garret: Molecular origin of the internal dipole potential in lipid bilayers: calculation of the electrostatic potential. In: *Biophysical journal* 63 (1992), Nr. 4, S. 935

Abbildungsverzeichnis

2.1	Strukturen gängiger Membranlipide eukaryotischer Zellen im Kalottenmodell	6
2.2	Modelle für den Aufbau biologischer Membranen: Fluid-Mosaik-Modell nach Singer und Nicolson und modernes Modell aus Monte-Carlo Simulation.	9
2.3	Strukturen von Lipidaggregaten in Abhängigkeit des Strukturfaktors. . . .	10
2.4	Lateraldruckprofil einer Doppelschichtmembran.	12
2.5	Schema der elektrostatischen Umstände und Ionendichteprofil an einer biologischen Membran.	14
2.6	Elektrisches Ersatzschaltbild einer Membran zwischen zwei wässrigen Medien.	15
2.7	Zusammensetzung des inneren Membranpotentials.	16
2.8	Mögliche Phasenzustände von Membranlipiden.	19
2.9	Der Separation von L_{α} - und L_{σ} -Phase zugrundeliegende Lipidgeometrie. .	20
2.10	<i>Stalk</i> -Modell für die Fusion zweier Lipidbilayer.	22
2.11	Schematischer Vergleich der bakterieller Zellhüllen.	24
2.12	Intrazelluläre Lipidsynthese und Lipidzusammensetzung von Zell- und Zellorganellmembranen.	26
2.13	Schematische Übersicht unterschiedlicher Membranrekonstitutionssysteme.	27
3.1	Zusammenhänge des angeborenen Immunsystems nach dem <i>Danger</i> - und <i>Stranger</i> -Modell.	33
3.2	Modell für den Phagozytoseprozess und beteiligte intrazelluläre Membranen.	35
3.3	Die Reifung eines Phagosoms zum Phagolysosom im Überblick.	37
3.4	Häufige Strategien zum Überleben intrazellulärer Pathogene im Phagosom.	41
3.5	Verlauf der Phagosomenreifung für virulente und avirulente <i>R. equi</i> Bakterien.	44
3.6	Die kürzlich aufgeklärte Proteinstruktur des virulenz-assoziierten Proteins B im Bändermodell.	46
4.1	Schematische Übersicht der verwendeten Methoden.	48
4.2	Coomassie-Färbung des aufgereinigten Proteins VapA und der prozessierten Form VapA p12.	53
4.3	Schematische Darstellung der Fusion von Lipidvesikeln auf einem Substrat sowie verschiedene zur Vesikelspreitung führende Defektmechanismen. . .	56
4.4	Funktionalisierung des für Biosensormessungen verwendeten Sensorchips.	59
4.5	Geometrie eines Sensorkanals des Biosensorchips und der Fluidzelle. . . .	60
4.6	Beispiel für Phasen- und Amplitudensignal der Liposomen- und VapA-Injektion einer Biosensormessung.	62
4.7	Jablonski-Diagramm für FRET- <i>Quenching</i> zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor.	64
4.8	Versuchsdesigns für fluoreszenzspektroskopische Messungen zur Interkalation von Proteinen in Lipidliposomen und zur Induzierung von Fusionsereignissen.	66

4.9	Allgemeiner Verlauf einer Druck-Flächen-Isotherme für die Kompression eines Lipidmonolayers.	68
4.10	Schematischer Aufbau einer Filmwaage.	69
4.11	Prinzipielle Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops mit Laserablenkung.	71
4.12	Komponenten des verwendeten AFM MFP-3D.	74
4.13	Schematische Darstellung der Rekonstitution freistehender, planarer Membranen nach der Montal-Mueller Methode.	76
4.14	Versuchsaufbau für die Membranrekonstitution nach der Montal-Mueller Methode.	78
4.15	Prinzip der Bestimmung der Membrankapazität mit der Spannungssprungmethode.	79
5.1	Abhängigkeit des Effekts von VapA auf immobilisierte Membranen vom Ladungszustand der Lipide.	83
5.2	Abhängigkeit des Effekts von VapA auf immobilisierte Membranen vom pH-Wert (pH 6,5).	85
5.3	Abhängigkeit des Effekts von VapA auf immobilisierte Membranen vom pH-Wert (pH 4,5).	86
5.4	Vergleich der Interkalation von VapA und LL-32 in geladene und ungeladene Vesikel bei verschiedenen pH-Werten.	87
5.5	Vergleich der durch VapA und LL-32 vermittelten Fusion von geladenen und ungeladenen Vesikeln bei verschiedenen pH-Werten.	88
5.6	Einbau von VapA in Monolayer in Abhängigkeit vom Lateraldruck.	89
5.7	Effekt von VapA auf ungeladene Monolayer bei 10 mN/m.	93
5.8	Effekt von VapA auf ungeladene Monolayer bei 20 mN/m.	94
5.9	Effekt von VapA auf ungeladene Monolayer bei unterschiedlichen Inkubationszeiten.	96
5.10	Effekt von VapA in niedriger Konzentration auf ungeladene Monolayer.	98
5.11	Effekt von VapA auf geladene Monolayer bei 20 mN/m.	99
5.12	Zeitverlauf des Effekts von VapA auf ungeladene Bilayer in Flüssigkeit bei pH 6,5.	102
5.13	Zeitverlauf des Effekts von VapA auf ungeladene Bilayer in Flüssigkeit bei pH 4,5.	104
5.14	Kapazitätsänderung freistehender DOPC:SM:Chol-Membranen durch VapA.	106
5.15	Permeabilisierung einer DOPC:SM:Chol-Membran durch VapA beim pH-Wert 5,5.	107
5.16	Stufenförmige Permeabilisierung einer DOPC:SM:Chol-Membran durch VapA beim pH-Wert 5,5.	109
5.17	Permeabilisierung einer DOPC:SM:Chol-Membran durch VapA beim pH-Wert 6,5.	111
5.18	Permeabilisierung einer DOPC:SM:Chol-Membran durch VapA beim pH-Wert 4,5.	112
5.19	Permeabilisierung einer DOPC:SM:Chol-Membran durch VapA p12 beim pH-Wert 6,5.	114
5.20	Permeabilisierung einer DOPC:SM:Chol-Membran durch VapA p12 beim pH-Wert 5,5.	115

5.21	Permeabilisierung einer DOPC:SM:Chol-Membran durch VapB beim pH-Wert 6,5.	116
5.22	Permeabilisierung einer DOPC:SM:Chol-Membran durch VapB beim pH-Wert 5,5.	117
5.23	Bestimmung der Porengrößen beispielhafter Permeabilisierungen durch VapA.	119
5.24	Vergleich der Porengrößen für VapA bei verschiedenen pH-Werten und für VapA p12 und VapB bei pH 5,5 und Abhängigkeit der Porengrößen für VapA von der Inkubationszeit.	120
6.1	Bindung von Proteinen an der Membranoberfläche.	122
6.2	Beziehung von Phasensignal und Amplitudensignal für die Biosensormessung an geladenen und ungeladenen Membranen.	123
6.3	Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide.	126
6.4	Das <i>Sinking-Raft</i> -Modell für porenbildende Peptide.	136
6.5	Stromspuren unterschiedlicher Mechanismen der Membranpermeabilisierung.	143
6.6	Für die Wechselwirkung von VapA mit der Phagosomenmembran vorgeschlagener Wirkmechanismus.	147

Tabellenverzeichnis

4.1	Zur Membranrekonstitution verwendete Lipide.	50
4.2	Aminosäuresequenzen der verwendeten Proteine VapA, VapA p12 und VapB.	51
4.3	Eigenschaften der verschiedenen Vap-Proteine.	52
4.4	Eigenschaften der verschiedenen <i>Cantilever</i>	74

Abkürzungen

AFM	Rasterkraftmikroskop(ie), von engl. <i>atomic force microscope</i> oder <i>-microscopy</i>
AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom, von engl. <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AMP	antimikrobielles Peptid
APZ	Antigen präsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BLM	Schwarze Lipidmembran, von engl. <i>black lipid membrane</i>
CaCl₂x2H₂O	Calciumchlorid-Dihydrat
Chol	Cholesterol
CHCl₃	Chloroform
CL	Cardiolipin
CMC	kritische Mizellenbildungskonzentration, von engl. <i>critical micelle concentration</i>
DAMP	Schädigungs-assoziierte molekulare Strukturen, von engl. <i>damage associated molecular patterns</i>
DOPC	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
DSPC	1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
EP	Elutionspuffer für VapA-Aufreinigung
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>E. coli</i>	<i>Echerichia coli</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GMVs	riesige multilamellare Vesikel, von engl. <i>giant multilamellar vesicle</i>
GUVs	riesige unilamellare Vesikel, von engl. <i>giant unilamellar vesicle</i>
hCAP18	Cathelicidin des menschlichen Immunsystems, von engl. <i>human cationic antibacterial protein (18 kDa)</i>

Abkürzungen

HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
His-Tag	Polyhistidin-Tag
HIV	Humaner Immundefizienz-Virus, auch HI-Virus
IDT	Interdigitaltransducer
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
L_o	flüssig geordnete Phase
L_{α}	flüssig kristalline Phase
L_{β}	Gelphase
LB-Film	Langmuir-Blodgett-Film
LB-Medium	Nährmedium, von engl. <i>lysogeny broth</i>
LMVs	große multilamellare Vesikel, von engl. <i>large multilamellar vesicle</i>
LUVs	große unilamellare Vesikel, von engl. <i>large unilamellar vesicle</i>
LP	Lysepuffer für VapA-Aufreinigung
LPS	Lipopolysaccharid
LW	Love-Welle
M	Mol pro Liter
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, von engl. <i>major histocompatibility complex</i>
MLVs	multilamellare Lipidvesikel
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaCl	Natriumchlorid
NBD	7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol
NBD-PE	N-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)-1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin
NETs	neutropile extrazelluläre Fallen, von engl. <i>neutropil extracellular traps</i>
P_{β}	Riffelphase
PC	Phosphatidylcholin

PAMP	Krankheitserreger-assoziierte molekulare Strukturen, von engl. <i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, von engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
pI	isoelektrischer Punkt
PI	Phosphatidylinositol
PI(3)P	Phosphatidylinositol 3-Phosphat
PI(4)P	Phosphatidylinositol 4-Phosphat
PIM	Phosphatidylinositolmannosid
PLL	Poly-L-Lysin
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
PRR	Strukturmuster erkennende Rezeptoren, von engl. <i>pattern recognition receptors</i>
PS	Phosphatidylserin
QCM	Quarzkristallmikrowaage, von engl. <i>quartz-crystal microbalance</i>
<i>R. equi</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
REV	<i>Rhodococcus equi</i> enthaltende Vakuole
rh-DHPE	Lissamine™ Rhodamine B 1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium
SAW	akustische Oberflächenwelle, von engl. <i>surface acoustic wave</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, von engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SM	Sphingomyelin
SMVs	kleine multilamellare Vesikel, von engl. <i>small multilamellar vesicle</i>
STM	Rastertunnelmikroskop(ie), von engl. <i>scanning tunneling microscope</i> oder <i>-microscopy</i>
SUVs	kleine unilamellare Vesikel, von engl. <i>small unilamellar vesicle</i>
TDM	Trehalose Dimykolat
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor, von engl. <i>toll-like receptor</i>

Abkürzungen

VapA	virulenz-assoziiertes Protein A, analog für VapB bis VapG
VapA His6	VapA mit N-terminalem His-Tag (sechs Histidine), analog für VapB His6
VapA p12	proteasestabiles, 12 kDa großes Fragment von VapA, analog für VapB p12

Symbole und Konstanten

a	mittlere Molekülfläche
A	Fläche
ΔA	Amplitudenänderung
A_{KG}	Flächeninhalt der Lipid-Kopfgruppe in lateraler Ebene
A_M	Membranfläche
c	Federkonstante
C_f	Schichtwägemempfindlichkeit für stehende Wellen
C_{lv}	Flüssigkeitskonstante für Änderung der Phasengeschwindigkeit
$C_{l\alpha}$	Flüssigkeitskonstante für Änderung der Dämpfung
C_M	elektrische Membrankapazität
C_v	Schichtwägemempfindlichkeit für laufende Wellen
d_M	Membrandicke
d_P	Porendurchmesser
d_S	Dicke einer Substratschicht
E_F	FRET-Effizienz
E_k	Krümmungsenergie
f_0	Resonanzfrequenz
Δf	Frequenzverschiebung mechanischer Wellen
F	Kraft
G	Größenparameter
I	Intensität
k_0	intrinsische Krümmung
k_G	gaußsche Krümmung
l_C	Cantileverlänge

Symbole und Konstanten

l_R	Resonatorlänge
l_{FS}	Länge der Lipid-Fettsäureketten in axialer Richtung
m	Masse
m_f	Fremdschichtmasse
P	Packungsparameter
Q	Wärme
R	Molekülabstand
R_a	Rauhigkeit, mittlere Abweichung
R_k	Krümmungsradius
R_0	Försterradius
R_L	Lastwiderstand
R_M	Membranwiderstand
R_s	spezifischer Widerstand
S	Entropie
t	Zeit
T	Temperatur
T_m	Phasenübergangstemperatur
u	Auslenkung
U	innere Energie
U_G	Gesamtspannung
U_M	elektrische Membranspannung
v_p	Phasengeschwindigkeit
Δv	Änderung der Phasengeschwindigkeit
V_{FS}	Volumen der Lipid-Fettsäurekettenregion
W	Arbeit
W_{diss}	dissipative Arbeit
Δz	Auslenkung in z-Richtung
Z	mechanische Impedanz
α	Dämpfung

δ	Strahldivergenz
χ	Flächenkompressibilität
$\Delta\alpha$	Dämpfungsänderung
ϵ_M	relative Permittivität einer Membran
$\Delta\varphi$	Phasenänderung
Φ	inneres Membranpotential
Φ_B	Born-Potential
Φ_D	Dipolpotential
Φ_{GC}	Guy-Chapman-Potential
γ	Massenbelegung
Γ	Oberflächenspannung
η	Flüssigkeitsviskosität
κ	Elastizitätsmodul
κ_d	elastisches Dehnungsmodul
κ_k	elastisches Krümmungsmodul
λ	elektrische Leitfähigkeit
μ	mittlere freie Energie pro Molekül
ν	Frequenz elektromagnetischer Wellen
Π	Lateraldruck
θ	Kontaktwinkel
ρ	Dichte
ρ_{el}	Ionendichteprofil
ρ_l	Flüssigkeitsdichte
σ	spezifische elektrische Leitfähigkeit
Σ	mechanische Spannung
Ψ	intrinsisches Membranpotential

Symbole und Konstanten

e_0	Elementarladung, $1,602176487(40) \cdot 10^{-19}$ C
h	Plancksches Wirkungsquantum, $6,626070040(81) \cdot 10^{-23}$ J·s
k_B	Boltzmann-Konstante, $1,3806488(13) \cdot 10^{-23}$ J/K
ϵ_0	elektrische Feldkonstante, $8,85418781762 \dots \cdot 10^{-12}$ As/Vm
π	Kreiszahl, 3,1415926535...

Anhang

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Gutschmann möchte ich danken für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Forschungsgruppe anzufertigen, für das spannende Dissertationsthema und vor allem für das Vertrauen, welches er mir entgegengebracht hat und entgegenbringt. Seine hervorragende Betreuung hat die Qualität der vorliegenden Arbeit erst ermöglicht.

Herrn Prof. Dr. Christian Hübner danke ich für sein freundliches Einverständnis, diese Arbeit als Zweitberichterstatter zu begutachten.

Bei Herrn PD Dr. Norbert Reiling bedanke ich mich für die Betreuung als Mentor im Rahmen der *Borstel Biomedical Research School*.

Herrn Prof. Dr. Albert Haas danke ich für die angenehme Kooperation, für die Bereitstellung von VapB und von Informationen zu den Vap-Proteinen.

Frau Dr. Annika Saathoff danke ich für die Anleitung und technische Unterstützung bei den zur Aufreinigung von VapA anfallenden Arbeiten im S2-Labor. Vor allem danke ich ihr für die gemeinsame (Frei-)Zeit in Borstel, viele gemeinsame Konferenzen und für ihre Fähigkeit, auch mal spontan zu sein.

Bei Frau Christine Hamann möchte ich mich für exzellente technische Unterstützung bei Vesikelpräparation und FRET-Messungen bedanken. Von ihren jahrelangen Erfahrungen, welche sie mir stets gerne vermittelt hat, profitiere ich bei vielen praktischen Labortätigkeiten.

Frau Kerstin Stephan und Frau Sabrina Groth danke ich für hervorragende und stets bereitwillige technische Unterstützung, für viele Tür-und-Angelgespräche und eine sehr angenehme Laboratmosphäre.

Frau Irina von Cube und Frau Dr. Franziska Kopp danke ich für die Anleitung und technische Unterstützung beim Gießen von Gelen und beim Proteinnachweis.

Herrn Dr. Uwe Mamat bin ich für die Hilfe bei der Aufreinigung von VapA, insbesondere bei Zellaufschluss und IMAC, zu großem Dank verpflichtet.

Bei Herrn Rainer Bartels bedanke ich mich für die Synthese und Bereitstellung von LL-32.

Herrn Karlo Komorowski, der seine Bachelorarbeit unter meiner Betreuung angefertigt hat, danke ich für die Durchführung vieler elektrophysiologischer Messungen und für die kollegiale Zusammenarbeit, die ich stets in guter Erinnerung behalten habe.

Auch die Bachelorarbeit von Herrn Kyrill Saile unter meiner Betreuung konnte zu der vorliegenden Dissertation beitragen, hierfür möchte ich mich bei ihm bedanken.

Den Biogielaboranten-Auszubildenden Frau Ricarda Wurtzel, Herrn Kilian Schütt, Herrn Markus Wenzel und Frau Lara Erich danke ich für ihre erstklassige technische Unterstützung und wünsche ihnen weiterhin ein erfolgreiches Berufsleben.

Bei Frau Sabine Dabelstein bedanke ich mich für die vielen kleinen Dinge, die einem meistens erst dann auffallen, wenn sie einmal nicht da sind.

Frau Laura Paulowski danke ich dafür, dass sie es nach wie vor mit mir in einem Büro beziehungsweise Labor aushält. Sie hat in den letzten Monaten am direktesten mit den Konsequenzen des Stresses beim Zusammenschreiben leben müssen und sich nie beschwert. Von ihrer Expertise als Chemikerin habe ich des Öfteren profitiert, aber auch und vor allem von ihrer geschätzten Gesellschaft bei regelmäßigen Kaffeepausen.

Frau PD Dr. Andra Schromm, Herrn Prof. Dr. Klaus Brandenburg, Frau Dr. Lena Heinbockel, Herrn Dr. Wilmar-Alexander Correa-Vargas und der gesamten Forschungsgruppe Biophysik danke ich für die fachlichen Gespräche, ohne die die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre und für die nicht fachlichen Gespräche, ohne die das Anfertigen der vorliegenden Arbeit nicht halb so kurzweilig gewesen wäre.

Herrn Dr. André Beerlink und Frau Julia Wernecke danke ich für die vielen angenehmen gemeinsamen Messzeiten an Röntgenstrahlungsquellen im In- und Ausland.

Meinem Informatiklehrer Herrn Törber möchte ich an dieser Stelle danken für eine kleine, aber bedeutende Motivation, die ich nie vergessen habe und die mich möglicherweise erst bewogen hat, eine Promotion in Betracht zu ziehen.

Meiner Freundin Angie danke ich für die fortwährende Unterstützung und das Verständnis, für die Durchsicht der vorliegenden Arbeit und das Entfernen von unzähligen Membranen aus dem Manuskript, und meinen Kindern Frederico und Florentina dass es sie gibt.

Publikationen, Vorträge und Poster

Publikationen

- Sommer A, Kordowski F, Evers A, Maretzky T, Andrä J, Blobel CP, Jung S, Schirmeister T, **Nehls C**, Heinbockel L, Gutschmann T, Grötzinger J, Bhakdi S, Reiss K (in zweiter Revision). Phosphatidylserine exposure represents the decisive step of ADAM17-mediated proteolysis.
- **Nehls C**, Gutschmann T (in Vorbereitung). Characterization of lipopolysaccharide model membranes and antimicrobial peptide interaction using a surface acoustic wave biosensor.
- Gutschmann T, **Nehls C**, Koistinen M, Willcocks S, Schaible U (in Vorbereitung). Interaction between host defence peptides and mycobacteria.
- Fessele C, Hartmann M, **Nehls C**, Lindhorst TK, Gutschmann T (in Vorbereitung). Applied tensile force determines lectin specificity.

Vorträge

- **1st CSSB International Symposium**, Hamburg, Deutschland, 09.04.2015 - 11.04.2015
- **Annual Meeting of the German Biophysical Society**, Lübeck, Deutschland, 14.09.2014 - 17.09.2014
- **International Workshop "Molecular Membrane Biophysics"**, Hünfeld, Deutschland, 03.03.2014 - 05.03.2014
- **7th North German Biophysics Meeting**, Borstel, Deutschland, 17.01.2014

Poster

- **10th European Biophysics Congress**, Dresden, Deutschland, 18.07.2015 - 22.07.2015, ausgewählt für den „Biophysical Society Student Poster Award“
- **International 5th Annual Cluster Symposium Inflammation at Interfaces**, Kiel, Deutschland, 26.02.2015 - 28.02.2015, ausgewählt für den „1. Posterpreis des Exzellenzclusters Inflammation at Interfaces“
- **8th North German Biophysics Meeting**, Borstel, Deutschland, 23.01.2015
- **9th European Biophysics Congress - EBSA2013**, Lissabon, Portugal, 13.07.2013 - 17.07.2013
- **6th North German Biophysics Meeting**, Borstel, Deutschland, 25.01.2013
- **64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie**, Hamburg, Deutschland, 30.09.2012 - 03.10.2012
- **Annual Meeting of the German Biophysical Society**, Göttingen, Deutschland, 23.09.2012 - 26.09.2012
- **International Workshop "Membranes in Health and Disease"**, Gomadingen, Deutschland, 12.03.2012 - 14.03.2012