

Von Myelin und Nanodiscs:
Eine biophysikalische Analyse
vom peripheren Myelinprotein P2, dessen Mutanten und
den nanodiscbildenden Polymeren

Dissertation

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

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät II
Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Herrn Dipl.-Pharm. Florian Arndt Schöffmann

Gutachter:

Herr Prof. Dariush Hinderberger
Herr Prof. Benesh Joseph

Datum der Verteidigung:

25.02.2026



Alles hat seine Zeit.

Ein jegliches braucht seine Zeit.

Kohelet 3,1

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	I
1. Einleitung und Zielstellung	1
2. Theoretische Grundlagen	4
2.1. Elektronenparamagnetische Resonanz	4
2.1.1. Spin Hamilton Operator	5
2.1.2. <i>continuous wave</i> EPR (cwEPR)	7
2.2. Lipide	10
2.2.1. Struktur der Selbstordnung der Lipide.....	10
2.2.2. Lipide in Doppelschichtenmembranen	11
2.2.3. Lipid-Mix cytosolische Seite der Membran peripheren Nervensystem (PNS).....	14
2.2.4. Grundlagen der Nanodiscs	15
2.3. Monoschichtexperimente – Langmuir Filme.....	17
2.3.1. Pockels-Langmuir-Filmwaagen.....	18
2.3.2. Kompressionsexperimente an Pockels-Langmuir Filmwaagen.....	20
2.3.3. Epifluoreszenz Filmwaagen	22
2.4. Dynamische Lichtstreuung	24
2.5. zeta-Potential und elektrophoretische Lichtstreuung	26
3. peripheres Myelinprotein P2	29
3.1. Einführung	29
3.1.1. neuronale Krankheiten, Charcot-Marie-Tooth Krankheit; Guillain-Barre-Syndrom	29
3.1.2. Aufbau und Funktion des peripheren Myelinprotein 2	32
3.2. EPR-spektroskopische Analyse der Fettsäurebindung von P2	35
3.2.1. Einführung	35
3.2.2. Qualitative Analyse der <i>continuos wave</i> EPR Spektren	37
3.2.3. Quantitative Analyse der spektralen Bindungsmodi des P2	39
3.2.4. Temperaturreihe	44
3.2.5. Interpretation der EPR-Ergebnisse in Korrelation zur Mutation des P2	46
3.2.6. Zusammenfassung und Ausblick	49

3.3. Messungen an der myelinartigen Monoschicht.....	51
3.3.1. Einführung	51
3.3.2. Maximaler Insertionsdruck / <i>Maximum Insertion Pressure</i> (MIP)	52
3.3.3. Synergie	54
3.3.4. Epifluoreszenzmikroskopie	55
3.3.5. Zusammenfassung und Korrelation der Mutanten.....	68
3.4. Zusammenfassung / Ausblick	70
4. Ryanodin-Rezeptor Sonden Synthese und Untersuchung.....	72
4.1. Einführung	72
4.2. Synthese der EPR aktiven Xanthin Derivate	75
4.2.1. Theoretische Vorbetrachtungen	75
4.2.2. präparativer Abschnitt	81
4.3. EPR Analytik der EPR aktiven Xanthin Derivate	83
4.3.1. Senkung der Rotationskorrelationszeit (τ_c) bei Zugabe von Glycerol	83
4.3.2. Einfluss der Spacerlänge auf die Rotationsdynamik	87
4.3.3. Einfluss der Spacerposition auf die Rotationsdynamik.....	89
4.3.4. Einfluss der EPR-Sonde auf die Rotationsdynamik	90
4.4. Zusammenfassung/Ausblicke	92
5. Analyse der nanodiscbildenden Polymere.....	94
5.1. Einführung	94
5.2. Dynamische Lichtstreuung	96
5.3. cwEPR Analytik	99
5.3.1. Interaktionsmuster bei X- und Q-Band Frequenzen	100
5.3.2. Der Einfluss von Puffersalzen auf die Interaktionsmuster.....	104
5.3.3. Einfluss der Temperatur auf die Parameter der Spinsonde.....	108
5.4. Fazit.....	113
6. Zusammenfassung und Ausblick	116
7. Material und Methoden.....	119
7.1. P2 –Material und Methoden	119

7.2. RyR – Material und Methoden	123
7.3. ND-Material und Methoden	126
8. Anhang	129
8.1. peripheres Myelinprotein 2	129
8.1.1. cwEPR Analytik	129
8.1.2. Filmwaage	150
8.2. RyR Sonden Synthese und Analyse	161
8.2.1. Synthese und Syntheseanalytik	161
8.2.2. cwEPR Analytik	186
8.3. Nano Disc Anhang	213
9. Verzeichnisse	248
9.1. Abbildungsverzeichnis	248
9.2. Tabellenverzeichnis	261
9.3. Literaturverzeichnis	264
10. Danksagung	285
11. Eidesstattliche Erklärung	286
12. Lebenslauf	287
13. Publikationsliste	288

Abkürzungen

16-DSA	16-Doxylstearinsäure
5-DSA	5-Doxylstearinsäure
8-BC	8-Bromocoffein
Carboxy-TEMPO	4-Carboxy-2,2,6,6-Tetramethylpiperidiny-N-oxyl
CAT-1	4-(Trimethylammonium)-2,2,6,6-Tetramethylpiperidiny-N-oxyl
ch	Cholesterol
cmPALS	continuous monitored Phase Analysis Light Scattering
CMT	Charcot-Marie-Tooth-
cwEPR	continuous-wave Elektronenparamagnetische Resonanz
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid (Kondensationsreagenz)
DIBMA	Diisobutylen-Maleinsäure-Copolymer
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DMPG	Dimyristoylphosphatidylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
ELS	Elektrophoretic Light Scattering
EPR	Elektronenparamagnetische Resonanz Spektroskopie
FABP	Fatty Acid Binding Protein
Fremy's Salz	Kaliumnitrosodisulfonat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IR	Infrarotspektroskopie
MBP	Myelin Basic Protein
MH	maligne Hyperthermie
MIP	Maximaler Insertionsdruck
Mn	Molmasse
MS	Massenspektrometrie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NO-Achse	Nitroxid-

PO	Myelin Protein Zero
P2 / PMP2	Peripheres Myelinprotein 2
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
PMP22	Peripheral Myelin Protein 22
PS	Phosphatidylserin
RyR	Ryanodinrezeptor
SM	Sphingomyelin
SMA	Styrol-Maleinsäure-Copolymer
SMA-SB	SMA mit Sulfobetain-Seitenketten (zwitterionisch)
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyln-N-oxyl
TEMPOL	4-Hydroxy-2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyln-N-oxyl
TEMPONE	4-Oxo-2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyln-N-oxyl
THF	Tetrahydrofuran
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Puffer)
UCST	Upper Critical Solution Temperature

1. Einleitung und Zielstellung

Biologische Membranen stellen eine zentrale Grundlage zellulärer Organisation und Kommunikation dar.^{1,2} Als hochkomplexe, dynamische Systeme bestimmen sie nicht nur die strukturelle Abgrenzung von Kompartimenten, sondern übernehmen auch essentielle Aufgaben wie Signalweiterleitung, Transportvorgänge und molekulare Erkennung. Insbesondere in spezialisierten Geweben wie dem peripheren Nervensystem (PNS) sind Membranarchitektur und Membranassoziierte Proteine eng aufeinander abgestimmt. Die Myelinscheide, die von Schwann-Zellen gebildet wird, sorgt hier durch ihre kompakte Struktur für eine salvatorische Reizweiterleitung. Ein Protein welches zentral am Aufbau der Myelinscheide beteiligt ist, ist das periphere Myelinprotein P2 (P2, PMP2), auch bekannt als *Fatty Acid Binding Protein 8 (FABP8)*.³⁻⁵

P2 übernimmt hier zwei physiologische Aufgaben: Es fungiert zum einen als Fettsäurebindungsprotein (FABP), das langkettige Fettsäuren transportiert, zum anderen interagiert es direkt mit der Myelinmembran und kann diese durch seine Bindung an die lipidreiche Membrandomänen stabilisieren. Mutationen im P2-Gen können mit pathogenen Prozessen einhergehen – insbesondere mit hereditären Neuropathien auch bekannt als Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 1G (CMT1G). Experimentelle Studien (u. a. Gonzalez,⁶ Motley⁷) konnten belegen, dass Mutante wie I43N oder I52T den Aufbau der Myelinscheide und der Nervenstruktur am Beispiel von Zebrafischen in vivo deutlich beeinflussen, was die strukturelle und funktionelle Relevanz des P2-Proteins unterstreicht.

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit besteht darin, die funktionellen Eigenschaften des P2 in molekularer Auflösung zu untersuchen. Hierzu wurden EPR-spektroskopische Methoden, insbesondere die *continuous wave-EPR (cwEPR)*, eingesetzt, um die Ligandenbindung und Rotationsdynamik des Proteins zu charakterisieren. Die Ergebnisse zeigen, dass selbst Punktmutationen an strukturell peripheren Positionen (z. B. P38G) signifikante Effekte auf die Ligandenbindung und Membraninteraktion haben können – obwohl diese Mutationen formal nicht direkt in die Bindungstasche bzw. an der Bindung involviert sind.

Zur Analyse der P2-Membranwechselwirkungen wurde eine zytoplasmatische PNS-Myelin-Monoschicht auf Basis natürlicher Hirnlipide (PC, PE, PS, PI, SM, Cholesterol) verwendet. Mittels Filmwaage und Epifluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass P2 – abhängig

von seiner Variante – unterschiedliche Affinitäten zur natürlichen Lipidmembran aufweist. Der maximale Insertionsdruck (MIP) und Synergieparameter lieferten quantitative Werte zur Adsorptionsfähigkeit, während Zweifarb-Fluoreszenzexperimente die Lokalisation an Phasengrenzen innerhalb der Monoschicht aufzeigen. Hervorzuheben ist, dass Wildtyp-P2 in der Lage ist, Domänenstrukturen in der Membran zu vernetzen: ein möglicher Hinweis auf seine Rolle bei der Membranstapelung *in vivo*.

Ein zweiter Fokus der Dissertation liegt auf polymerbasierten Nanodiscs als Modellmembranen. Diese ermöglichen die solubilisierte Repräsentation nativer Lipidumgebungen unter Erhalt funktioneller Membraneigenschaften, ohne Einsatz schädlicher Detergenzien. Die Untersuchungen fokussierten sich auf die cwEPR Analyse der Polymer gegenüber einer Variation aus sowohl geladenen, als auch nicht geladenen EPR-aktiven Sonden z.B.: CAT-1, Carboxy-TEMPO, 4-Oxo-TEMPO, TEMPO. Die hier verwendeten Polymere SMA, DIBMA und SMA-SB unterscheiden sich in ihrer Ladungsverteilung, Hydrophilie und Interaktionsmuster mit den Spinsonden. Die cwEPR und dynamische Lichtstreuung (DLS) zeigen, dass insbesondere SMA-SB durch sein zwitterionisches Design eine geringere Aggregationstendenz aufweist und dennoch, wie die Literatur aufzeigt, stabile Nanodisc-Strukturen erzeugen kann. Diese Beobachtungen sind relevant für zukünftige Studien zur solubilisierten Darstellung von Membranproteinen wie den P2 oder dem Transmembranären Ryanodinrezeptor-Protein RyR.

Das dritte Thema dieser Arbeit ist die Entwicklung neuartiger EPR-aktiver Xanthin-Derivate. Ziel war es, Sonden herzustellen, die nicht nur stabil und spektral charakterisierbar sind, sondern auch eine Affinität zu physiologisch relevanten Zielstrukturen wie dem Ryanodinrezeptor (RyR) aufweisen. Aufbauend auf der pharmakologischen Wirksamkeit natürlicher Xanthine (z. B. Coffein, Theophyllin) wurden vier Derivate synthetisiert und in Glycerolgradienten spektroskopisch untersucht. Die Resultate liefern Informationen über Spacerabhängigkeiten (Länge und Position am Xanthin-Grundgerüst), Rotationsmodi und die Sensitivität gegenüber molekularer Umgebung. Besonders das Theophyllin-Derivat RYR-7 zeigte zwei spektrale Komponenten auf, welche sensitiv auf die Glycerol-Wasser-Cluster⁸ der wässrigen Umgebung waren.

Die vorliegende Arbeit integriert damit verschiedene disziplinäre Zugänge: die biophysikalische Proteinanalyse (P2), die Charakterisierung von Lipo-Nanodisk bildenden Polymeren und die synthetische Sondenentwicklung (EPR-aktive Xanthin-Derivate). Ziel ist es,

durch dieses interdisziplinäre Design ein besseres Verständnis von Protein-Lipid-Wechselwirkungen und Struktur-Funktions-Korrelationen in biologischen Membransystemen zu ermöglichen. Dies kann nicht nur zur Aufklärung molekularer Mechanismen beitragen, sondern auch potenzielle Plattformen für zukünftige pharmakologische oder diagnostische Anwendungen schaffen.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Elektronenparamagnetische Resonanz

Die elektroparamagnetische Resonanz (EPR) beruht auf der Interaktion zwischen einem Elektronenspin S in einem paramagnetischen Zentrum und einem externen Magnetfeld B_0 . Ungepaarte Elektronen sind mit einem intrinsischen Spin und folglich einem magnetischen Moment ausgestattet, der mit einem externen Magnetfeld interagiert. Aufgrund der nicht entarteten magnetischen Spinzustände ist die Energie des Elektrons innerhalb des Magnetfeldes empfindlich gegenüber der magnetischen Quantenzahl m .⁹ Die Aufspaltung der Energie eines freien Elektronenspins in zwei diskrete Energieeigenwerte innerhalb eines Magnetfeld B_0 wird als Zeeman-Effekt bezeichnet. Die Größe der Aufspaltung ist dabei proportional zur Stärke des äußeren Magnetfeldes B_0 (Abbildung 3).¹⁰ Die Energieeigenwerte E_{m_S} mit der Spinquantenzahl $m_S = +\frac{1}{2}$ und $m_S = -\frac{1}{2}$ können mithilfe von Gleichung 1 berechnet werden.¹¹ Dabei repräsentiert g den Landé-Faktor des ungepaarten Elektronenspins und μ_B das Bohr'sche Magneton. Die Energiedifferenz zwischen den Spinquantenzuständen kann mithilfe von Gleichung 2 (Resonanzbedingung) berechnet werden.

$$E_{m_S} = -\mu_S * B_0 = m_S * g * \mu_B * B_0 \quad 1$$

$$\Delta E = E_{+1/2} - E_{-1/2} = g * \mu_B * B_0 = h * \nu \quad 2$$

h ist das Planck'sche Wirkungsquantum und ν die Frequenz der absorbierten Strahlung mit denen die Übergänge zwischen den Energieniveaus induziert werden. Diese Strahlung liegt bei Magnetfeldstärken der EPR im Mikrowellenbereich (z.B. X-Band: 9,4 GHz, B_0 320-430 mT; Q-Band: 34 GHz, B_0 1200 – 2500 mT). Die Resonanzbedingung wird erfüllt, wenn die Energie der elektromagnetischen Strahlung der Energiedifferenz zwischen den Spinzuständen entspricht. Die Resonanzposition des Elektronenspins wird durch die Wechselwirkung mit nahegelegenen Kernspins und deren lokalen Magnetfeldern beeinflusst.^{10,12} Folgend beschreibt der Spin-

Hamilton-Operator diese energetische Wechselwirkung des Elektronenspin mit seiner Umgebung näher.^{13,14}

2.1.1. Spin Hamilton Operator

Spin-Hamilton-Operator:

$$\hat{H}_S = \hat{H}_{EZ} + \hat{H}_{ZFS} + \hat{H}_{ee} + \hat{H}_{HF} + \hat{H}_{NZ} + \hat{H}_{NQ} \quad 3$$

Der Spin-Hamilton-Operator besteht aus:

Elektron-Zeeman-Effekt (\hat{H}_{EZ}), der Nullfeldaufspaltung (*zero-field splitting*) (\hat{H}_{ZFS}), der Elektron-Elektron-Wechselwirkung (Heisenberg-Effekt und Dipol-Dipol-Wechselwirkung) (\hat{H}_{ee}), der Kern-Zeeman-Effekt (\hat{H}_{NZ}) und der Kern-Quadrupol-Wechselwirkung (\hat{H}_{NQ}).

Die für die vorliegende Arbeit relevantesten Bestandteile werden folgend kurz näher beleuchtet:

Die **Elektron-Zeeman-Effekt**, auch Zeeman-Aufspaltung (\hat{H}_{EZ}) genannt, beschreibt die Wechselwirkung der Spinzustände mit dem externen magnetischen Moment und wird durch den Spinoperator \hat{S} definiert.

$$\hat{H}_{EZ} = g * \mu_B * B_0 * \hat{S} \quad 4$$

Der Landé-Faktor g hat hier im drei dimensionalen Raum eine 3x3-Matrix und kann mittels der Euler-Winkel-Transformation des Magnetfeldvektors in das molekulare Koordinatensystem gewandelt werden. Die vereinfachte diagonalisierte Matrix, welche die symmetrischen Tensoren (g_{xx}, g_{yy}, g_{zz}) und die drei Euler-Winkel (α, β, γ) enthält, beschreiben die Orientierung im molekularen Koordinatensystem.

$$g = \begin{pmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} g_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & g_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & g_{zz} \end{pmatrix} \quad 5$$

Bei isotropen, schnellen Rotationen kann der isotrope Landé-Faktor als gemittelter g_{iso} – Wert herangezogen werden

$$g_{iso} = \frac{1}{3} * (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) \quad 6$$

Die Eulerwinkel (α, β, γ) transformieren über die x, z, x -Achse vom x, y, z -Koordinatensystem in das A, B, C-Koordinatensystem.^{15,16}

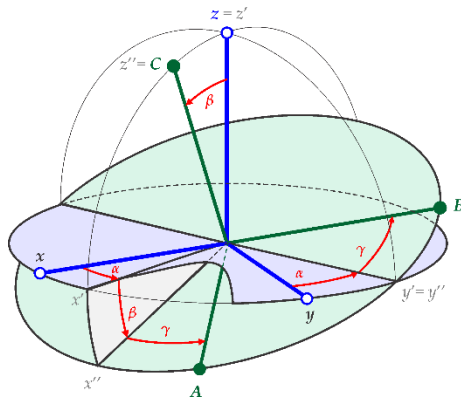


Abbildung 1 schematische Darstellung der Euler-Winkel und ihre Wirkung bei der Transformation der Koordinatensystem¹⁷

Die **Elektronen-Elektronen-Wechselwirkung**, (\hat{H}_{ee}), besteht aus der Dipol-Dipol-Wechselwirkung und der Austausch-Wechselwirkung (Heisenberg-Effekt), definiert die Interaktion mehrerer ungepaarter Elektronenspins, die sich in unterschiedlichen Atomen (v.a. Molekülen) aufhalten. Diese Wechselwirkung kann in Dipol-Dipol- und Austausch-Wechselwirkung unterteilt werden. Die für diese Arbeit relevante Austausch-Wechselwirkung tritt auf, wenn sich die Spins in unmittelbarer Nähe befinden (endliche Aufenthaltswahrscheinlichkeit im gleichen Orbital) und es zu einem quantenmechanischen Austausch der Spinzustände kommt.¹⁸

Die **Hyperfein-Wechselwirkung** (\hat{H}_{HF}) stellt die Hyperfeinaufspaltung der Energieniveaus durch die Interaktion des Dipolmomentes des Atomkernes zum Dipolmoment des Spins auf. Die Aufspaltung ($2I + 1$) mit I als Kernspinquantenzahl, im EPR-Absorptionsspektrum ist bei $m_s = \pm \frac{1}{2}$ und $m_I = \pm 1$ (^{14}N) bei Nitroxid-Radikalen eine Anzahl von drei Linien zu sehen.

$$\hat{H}_{HF} = \sum_k \hat{S} * A_k * \hat{I} \quad 7$$

Die Hyperfeinkopplung kann ebenfalls über den Kernspinoperator \hat{I} und den Hyperfeinkopplungstensor A_k beschrieben werden. Hier nimmt A_k wieder eine 3x3 Matrix an und kann mit den diagonalen Hauptkomponenten A_{xx}, A_{yy}, A_{zz} analog zur g beschrieben werden. Für schnelle ungehindert rotierende Systeme ergibt sich die richtungsunabhängige Hyperfeinkopplungskonstante a_{iso} , die ebenfalls durch die Abstände der Nulldurchgänge des Resonanzsignals beschrieben werden kann.^{13,19}

$$a_{iso} = \frac{1}{3} * (a_{xx} + a_{yy} + a_{zz})$$

8

2.1.2. continuous wave EPR (cwEPR)

Die cwEPR ist neben der Puls-EPR-Methode eine wichtige Technik im Gebiet der EPR-Spektroskopie. Bei der cwEPR-Methode wird bei konstanter Mikrowellenfrequenz, das Magnetfeld B_0 in einem bestimmten Bereich variiert. Für den in dieser Arbeit verwendeten Frequenzbereich von 9,4 GHz (X-Band) wird typischerweise ein Magnetfeld von circa 320 mT bis 450 mT gefahren, während das ebenfalls verwendete Frequenzband (Q-Band) von 34 GHz ein Magnetfeld von 1200 bis 2500 mT erfordert, um die hier verwendeten Nitroxid-Radikale zu detektieren.¹⁰

Nitroxid-Radikale eignen sich aufgrund ihrer Stabilität und des geringen Molekulargewichtes für die Messung an bzw. in biologischen Systemen. Das ungepaarte Elektron hält sich, wie in der folgenden Abbildung verdeutlicht, vorwiegend mittig zwischen den Sauerstoff- und Stickstofforbitalen auf. Dabei verläuft die x-Achse definitionsgemäß entlang der NO-Bindung, die z-Achse entlang der $2p_z$ -Orbitale und y-Achse senkrecht zur xz-Ebene.

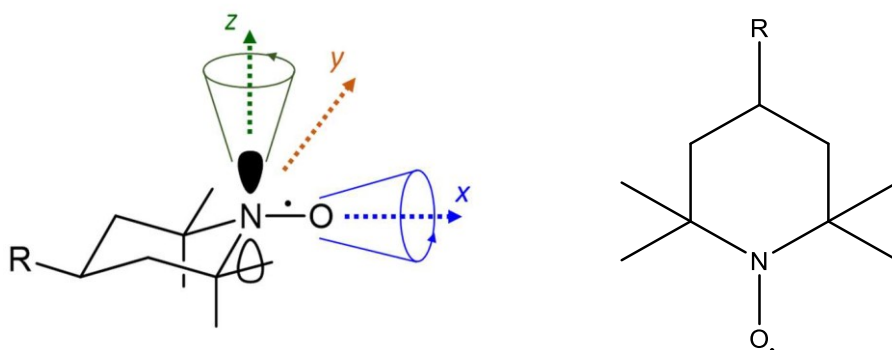


Abbildung 2 Grundstruktur eines üblichen Nitroxid-Spinlabels mit dem Rest R (TEMPO, R=H) mit eingezeichneten Haupttensorachsen und deren taumelnden Rotation entlang der Achsen^{20,21}

Die Verwendung von Nitroxid-Radikalen ermöglicht ebenfalls eine vereinfachte Anwendung der Spin-Hamilton-Operatoren auf die Operatoren: \hat{H}_{EZ} , \hat{H}_{EE} , \hat{H}_{HF} . Die Kernspinzahlen für ^{14}N -Isotope sind bekannt ($I(^{14}\text{N})=1$; $m_I = -1, 0, +1$), was eine Unterteilung des Zeeman-Energieniveaus des Spins durch die Hyperfein-Wechselwirkung ermöglicht. Bei schnellen, isotropen Rotationen in Lösungen führt dies zu drei Resonanzlinien im Spektrum der Nitroxid-Messungen, die durch a_{iso} separiert sind.^{11,22}

Generell befindet sich das ungepaarte Elektron bei Nitroxid-Radikalen in der π -Bindung zwischen dem Stickstoff- und Sauerstoffatom. Die Elektronendichte kann durch die Umgebung der Spinsonde beeinflusst werden. In einer polaren Umgebung, wie sie durch Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen charakterisiert ist, wird ein polarer Mesomeriezustand des Nitroxid-Moleküls mit auftretenden Formalladungen energetisch bevorzugt und dabei die Elektronendichte des ungepaarten Elektrons in Richtung des Stickstoffatoms verschoben, was zu einer erhöhten Hyperfein-Kopplung führt.^{11,12} Die Hyperfein-Kopplungskonstante a nimmt somit in hydrophilerer Umgebung zu.

Das EPR-Spektrum reagiert nicht nur sensitiv auf die molekulare Umgebung sondern besonders auf die rotationsdynamischen Umstände. Die molekulare Dynamik der Spinsonde kann durch die Rotationskorrelationszeit τ quantifiziert werden. Für isotrope Bewegungen von Spinsonden kann die Rotationskorrelationszeit durch die Brownsche Rotationsdiffusion, basierend auf der Stokes-Einstein-Gleichung mit dem Rotationsdiffusionskoeffizient D , beschrieben werden.

$$\tau = \frac{1}{6 * D} \quad 9$$

Bei nicht sphärischen Molekülen, die anisotrop rotieren, wird der Rotationsdiffusionstensor $D_{i(i=(x,y,z))}$ eingeführt. Die mittlere Rotationskorrelationszeit ist folgend das geometrische Mittel der Tensor-Werte. dafür muss wiederum über die Euler-Winkel α , β , γ das Hauptsachsensystem des Rotationsdiffusionstensors in das Molekülkoordinatensystem überführt werden.^{10,13}

$$\tau_c = \sqrt[3]{\tau_{xx} * \tau_{yy} * \tau_{zz}} = \frac{1}{6 * \sqrt[3]{D_{xx} D_{yy} D_{zz}}} \quad 10$$

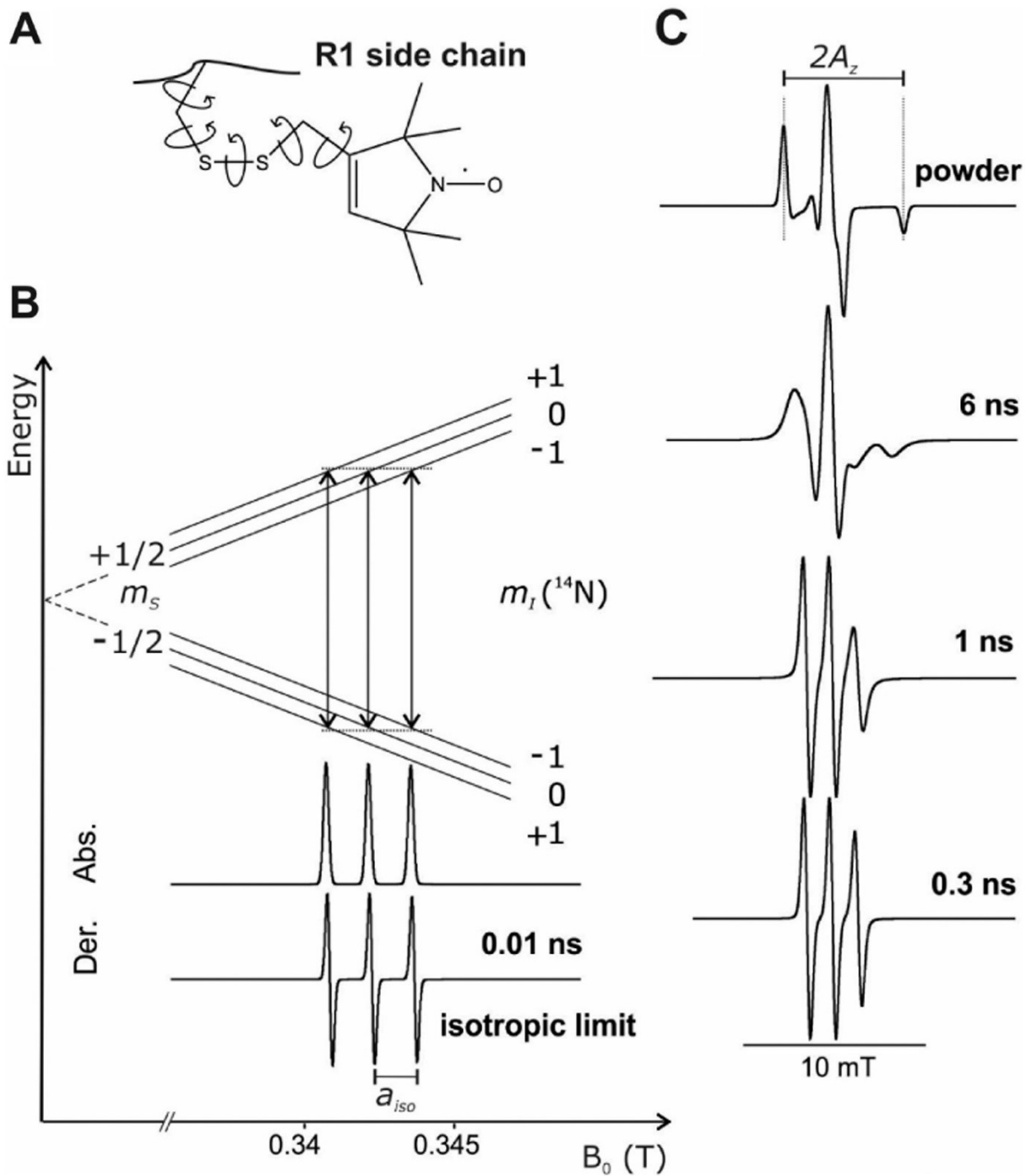


Abbildung 3 (A) Darstellung der Rotationsfreiheiten des Nitroxides, hier PROXYL; (B) Energieaufspaltung eines Spin (oben), resultierendes Absorptionsspektrum (mittig), Derivat des Absorptionsspektrums (unten); (C) Visualisierung des a Tensors und der Rotationsdynamik eines Nitroxid-Radikals; Grafik von Bordignon, Bleicken²³

2.2. Lipide

2.2.1. Struktur der Selbstordnung der Lipide

Lipide gehören zur Gruppe der amphiphilen Moleküle, die in wässrigen Medien die Tendenz zur Aggregation zeigen, um ihre hydrophoben Ketten von den Wassermolekülen zu isolieren (hydrophober Effekt).²⁴ Die Aggregation von Lipiden ist dabei abhängig von mehreren Faktoren, darunter der Wassergehalt, der Temperatur, die Ionenkonzentration sowie der chemische Aufbau der Lipide (Ester-, Etherphospholipide, Sphingolipide, Bolalipide). Die Aggregation beginnt bei kegelförmigen Lipiden (z. B. Di-Palmitoyl-phosphatidylcholin (DPPC); Kopfgruppe größer als Kettengruppe) mit der Ausbildung einer Mizelle, mit steigender Konzentration kommt es zur Ausbildung von Lipiddoppelschichten, die in verschiedenen Phasenzuständen vorliegen können. Die am häufigsten in Membranen von Organismen vorkommenden Lipide sind die Phospholipide, Sphingolipide, Glycolipide und Sterole. Generell gesehen bestehen Lipide aus einer polaren Kopfgruppe, einem "Backbone" und einer unpolaren Kettenregion. Für die in dieser Arbeit am häufigsten verwendeten Phosphocholinlipide wäre der Aufbau aus einer polaren Cholin-Kopfgruppe, verbunden mit einem polaren Phosphorylverol-Rückgrat, zu zwei unpolaren Kohlenwasserstoffketten zu sehen.^{25,26}

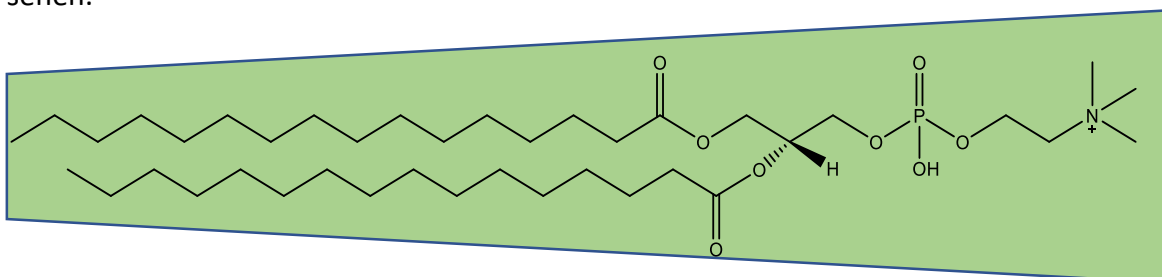


Abbildung 4 Strukturformel von Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) und Visualisierung der Kegelform bzw. Kegelstumpf Form (hydrodynamische Raumeinnahme eines Lipides)

Es ist bekannt, dass eine Variation von Lipiden häufig in der Kopfgruppen- oder Kettenregion stattfindet. Eine Kopfgruppenvariation kann zur Ladungsvariation oder zur Veränderung der hydrodynamischen Größe führen. Durch eine Veränderung der Kettengruppen, wie beispielsweise durch Verlängerung der Kette oder die Einführung von Doppelbindungen (Sättigungsgrad) oder anderweitige Modifikationen, kann eine Variation der Wechselwirkung der Lipide innerhalb der Membran herbeigeführt werden. In der Folge kann der Zusammenhalt der Lipide im Hinblick auf *Mono-* oder *Bilayer* modifiziert werden.

2.2.2. Lipide in Doppelschichtenmembranen

Die Aufgabe der Kompartimentierung kann von Organismen auf unterschiedliche Weise erfüllt werden, wobei die Bildung von Membranen eine wesentliche Rolle spielt. Diese können als „zweidimensionale Flüssigkeiten“ betrachtet werden. Membranen sind keine starren Systeme, sondern hoch dynamisch und fluide. Das Flüssig-Mosaik-Modell von Singer und Nicolson² unterteilt die Membranen in viskose und fluide Schichten und beschreibt die Bildung von Domänen und Clustern unterschiedlichster Art und Zusammensetzung. Obwohl dieses Modell bereits seit 1972 existiert, hat es seine Aktualität bis heute nicht verloren. Dies ist auf die kontinuierliche Überarbeitung und Erweiterung zurückzuführen, wie sie in aktualisierter Form durch Nicolson¹ beschrieben worden.

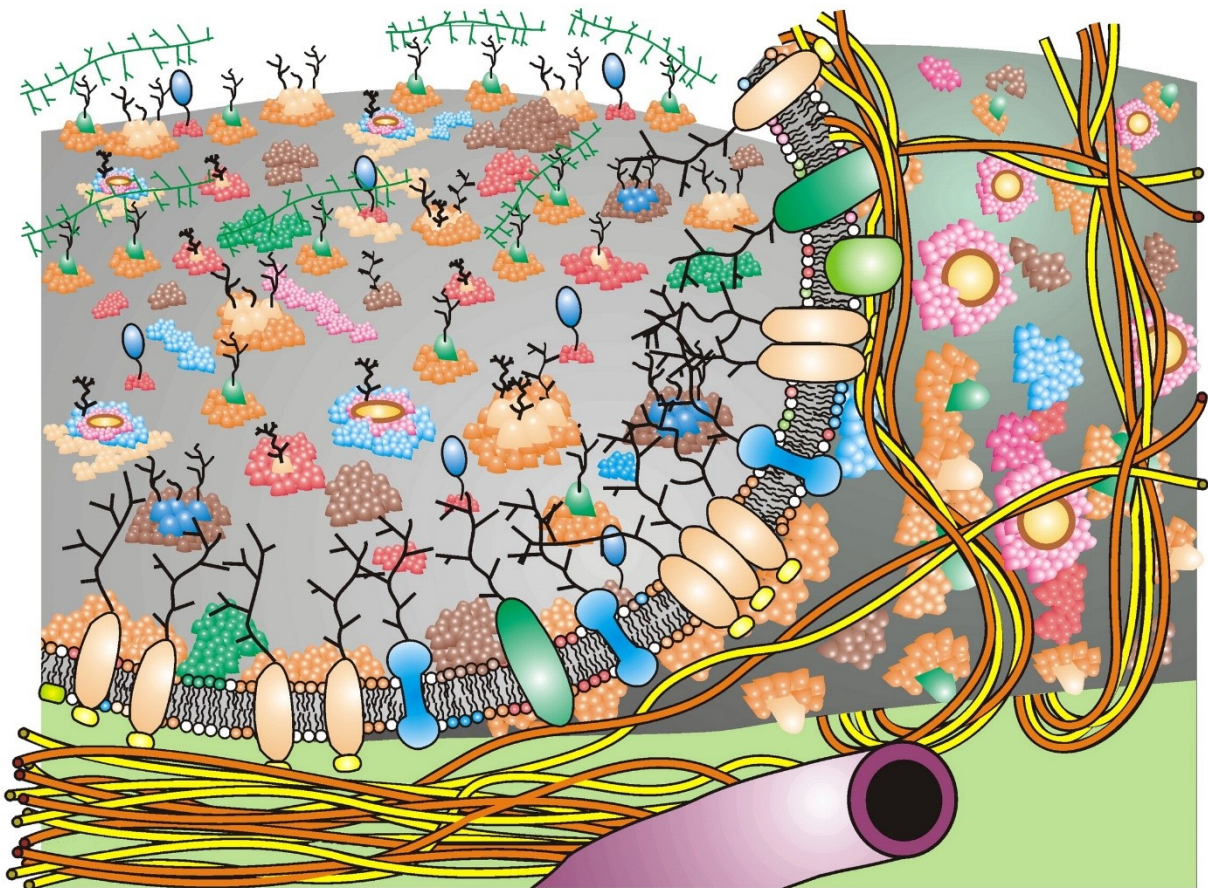


Abbildung 5 Das *Fluid Mosaic Membran Model* von 2014 verdeutlicht die Komplexität der Membran und ihrer Vernetztheit im Organismus.¹ Ein aktualisiertes Fluid-Mosaic-Membranmodell, das Informationen über Membrandomänenstrukturen und membranassoziierte Zytoskelett- und extrazelluläre Strukturen enthält. Verschiedene integrale Proteine, Glykoproteine, Lipide und Oligosaccharide werden durch unterschiedliche Farben dargestellt, und dort, wo die Membran abgezogen wurde, um die innere Membran zu betrachten, ist die Oberfläche des Zytoskeletts zu erkennen, dass die laterale Diffusion einiger, aber nicht aller Transmembran-Glykoproteine einschränkt.

Natürliche, "lebende" Membranen stellen eine komplexe Struktur dar, die nicht nur als Ansammlung von Lipiden zu betrachten ist, dabei spielen Proteine und Zucker entscheidende Rolle im Aufbau dieser Membranen. Es ist zu beachten, dass die Anordnung der Lipide und Proteine in den Membranen nicht zufällig sondern gemäß einer bestimmten Symmetrie erfolgt. Zudem sind diese nicht in einem thermodynamischen Gleichgewicht. Die Diffusion der Lipide und Proteine wird nicht nur durch die Fluidität oder den ionischen Wechselwirkungen der Lipide beeinflusst, sondern auch durch Proteinbarrieren oder Zuckerreste an der Membranoberfläche, die einen direkten und indirekten Einfluss ausüben. Die mechanischen Eigenschaften wie Krümmung und Elastizität werden hingegen vorwiegend durch die Lipidzusammensetzung und -verteilung definiert.^{25,27-29}

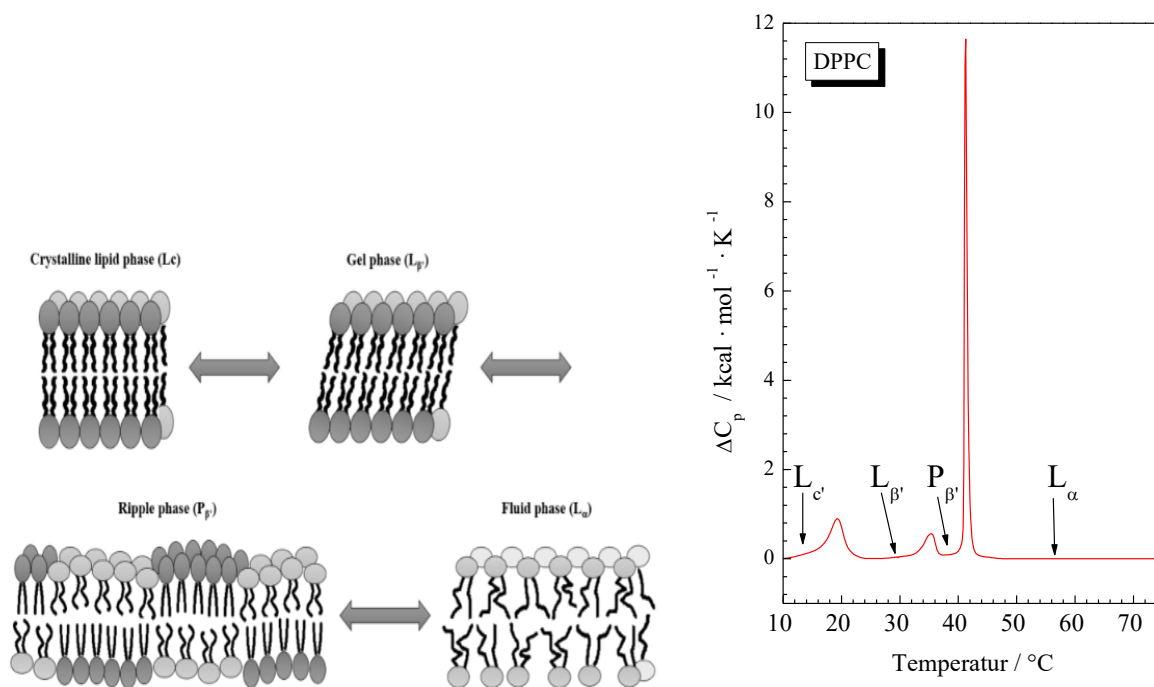


Abbildung 6 rechts: Bilayerphasenschema adaptiert von Startek³⁰; links: Schematische Darstellung einer DPPC DSC-Kurve samt Einzeichnung der Phasen,

Es lässt sich beobachten, dass mit fallender Temperatur in der Regel folgende Phasen mit zunehmender Ordnung der Kette angezeigt werden, beginnend mit der L_α, P_{β'}, L_{β'} und L_c-Phase. Der Begriff L_c (*liquid condensed*) beschreibt eine kristalline Phase, in der alle Ketten in der all-trans-Konformation angeordnet sind, vergleichbar mit den Kohlenwasserstoffen in Paraffinen. In der Gel-Phase L_{β'} (*solid-ordered*) sind die Lipidketten weiterhin all-trans, jedoch besteht eine Neigung in der Membrannormalen, sowie ein erhöhtes Rotationsvermögen der Ketten um ihre eigene Achse. Der Übergang zur *liquid-disordered* L_α wird durch die Rippel-Phase

(hexagones Gitter, P_{β}) beschrieben. Diese Phase ist charakteristisch durch die Präsenz von Wellen auf der Oberfläche und die Anwesenheit von Doppelschichten, deren Zuordnung zu L_{β} oder L_{α} möglich ist. Die *liquid-disorder* Phase L_{α} stellt eine flüssigkristalline Phase dar, die auch als geschmolzene Phase bezeichnet wird. In dieser Phase sind die Lipidketten ungeordnet und durch die Bildung von gauche Isomeren gekennzeichnet, die eine hohe Beweglichkeit aufweisen.

Die Phasenübergangstemperatur ist definiert als die Temperatur, die erforderlich ist, um eine Änderung des physikalischen Lipidzustandes von geordneten Gelphase zur ungeordneten flüssigkristallinen Phase zu induzieren. Die Phasenübergangstemperatur wird dabei von verschiedenen Faktoren beeinflusst, darunter die Art der Lipide, die Kettenlänge, der Sättigungsgrad, die Kopfgruppenspezifität, mögliche Ladung am Lipid sowie Defektstellen, wie beispielsweise EPR-aktive Sonden oder fluoreszenzmarkierte Lipide (z.B. Rhodamin-B-DHPE). Die erhöhte Kettenlänge bedingt eine Stärkung der van-der-Waals-Wechselwirkungen, was wiederum einen erhöhten Energiebedarf zur Störung der geordneten Lipid-Paketierung erfordert, somit zu einer Erhöhung der Phasenumwandlungstemperatur führt. Die Einführung einer Modifikation oder cis-Doppelbindung in die Kettenregion führt zu einer Instabilität in diesem Bereich und zu einer Erniedrigung der Phasenumwandlungstemperatur.^{25–27,31–37}

Lipide können auch lokale Domänen mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung und Fluidität bilden. Diese werden als Rafts (Lipidflöße) bezeichnet und bestehen aus Cholesterol und Sphingolipiden. Sie weisen im Vergleich zu ihrer Umgebung eine höhere Starre auf.^{32,33} Die Fluidität einer Lipiddoppelschicht beeinflusst mehrere Funktionen auf einmal. So wird nicht nur die laterale Diffusion (Verteilung der Lipide und Proteine in einer Monoschicht, Bewegung, Rotation), sondern auch die Permeabilität, die Elastizität (Krümmung) und die laterale Spannung davon dirigiert.²⁵ Die Dicke der hydrophoben Lipidschichten kann variieren und wird meist durch die Länge der gesättigten Fettsäuren gesteuert. Die Verteilung von Lipiden mit unterschiedlicher Kettenlänge ist nicht zufällig und ermöglicht eine lokale Einstellung der Membrandicke, wie es bei Rafts benötigt wird. Lipiddoppelschichten können laterale Diffusion (Bewegung in der Ebene) und Flip-Flops (Austausch von Lipiden zwischen beiden Einzelschichten) betreiben.

2.2.3. Lipid-Mix cytosolische Seite der Membran peripheren Nervensystem (PNS)

Um Myelin Proteine in ihre „natürlichen“ Eigenschaften untersuchen zu können ist es essentiell die für diese Proteine „natürliche“ bzw. naturnahe Umgebung zu schaffen. Daher wurde statt der bekannten DMPC- bzw. DPPC-Membranen eine Lipidmembran verwendet, die auf den Lipiden der cytosolische Seite der PNS-Membran beruhen. Diese Lipide sind das Phosphatidylcholine (PC), Phosphatidylserine (PS), Phosphatidylethanolamine (PE), Sphingomyelin (SM), Phosphatidylinositol (PI) und Cholesterin (ch). Dieses Lipidemsemble hat einen bedeutenden Einfluss auf Wechselwirkungen zum Protein und den folgenden Messungen im Kontext zum peripheren Myelinprotein 2 (P2). Somit wird an dieser Stelle näher auf die Eigenschaften der Lipide dieser Membran eingegangen.

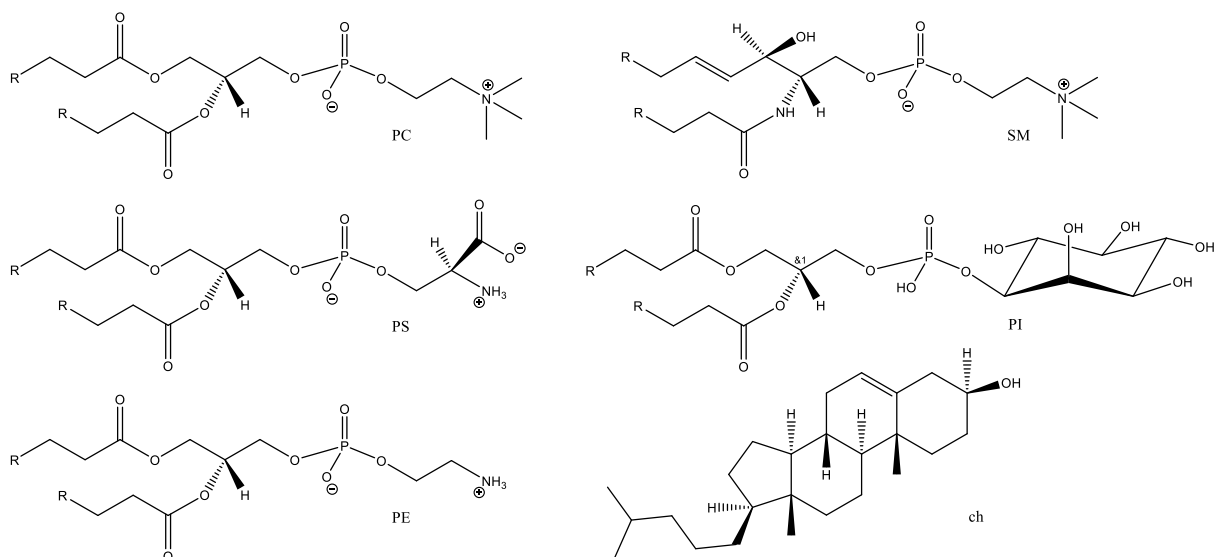


Abbildung 7 Chemische Strukturen der typischen menschlichen PNS-Membranlipide: Gehirn L- α -Phosphatidylcholin (PC), Schweinehirn L- α -Phosphatidylserin (PS), Schweinehirn L- α -Phosphatidylethanolamin (PE), Schweinehirn-Sphingomyelin (SM), Rinderleber L- α -Phosphatidylinositol (PI) und Schafswollcholesterin (ch); R steht für eine variable Lipidkettenszusammensetzung. Es handelt sich um natürliche Lipide in einer Mischung mit einer durchschnittlichen Fettsäureverteilung.

Die verwendeten Lipide können in drei Kategorien eingeteilt werden: die neutralen Lipide (PC, PE, SM), die geladenen Lipide (PI, PS) und das Cholesterin. Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylinositol (PI) gehören zu den geladenen anionischen Lipiden, die durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem geladenen Bereich der Proteine interagieren.^{38,39} Die Interaktion führt zu einer verringerten Fluidität, die vermutlich durch die Lipidkondensation bedingt ist. Die anderen neutralen Lipide, PC und PE sind für die Gesamtwechselwirkung der Monoschicht verantwortlich, wobei eine elektrostatische

Interaktion mit den Proteinen nicht zu beobachten ist. Stattdessen scheinen sie als Abstandhalter zwischen den repulsiven Wechselwirkungen der geladenen Lipide zu fungieren und die Lipidkondensation auszugleichen. Cholesterin weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu Membranlipiden auf, wobei sich jedoch eine differenzierte Struktur zeigt. Während die Phospholipide eine Kopfgruppe und zwei hydrophobe Acylketten aufweisen, ist Cholesterin charakterisiert durch eine kurze Isoocetylkettenkette, ein starres planares Steroidringsystem und eine kleine polare Hydroxylgruppe. Die Hydroxylgruppe ist im Lipidemblem auf Höhe der Kopfgruppen der Phospholipide positioniert, während das plattenartige Rindsystem parallel zu den Acylketten verläuft. Letzteres reicht bis zur Position C9, C10 der Phospholipide. Es konnte nachgewiesen werden,^{31,40} dass Cholesterin die Kopplung der Kopfgruppen unterbricht und die Bildung von Lipidflößen begünstigt, die angereichert sind mit Cholesterin und Sphingolipiden, wie es in den Studien zu Sphingomyelinen (SM) beschrieben wird.^{32,33,41} Diese Rafts sind hochgeordnet und starr, was zu einer Verringerung der Fließfähigkeit der gesamten Membran führt. Cholesterin reduziert die für den Phasenübergang erforderliche Bindungsenergie und verringert folglich die Umwandlungstemperatur von Phospholipiden-Doppelsichten.

Die Hypothese von Widder⁴² besagt, dass es durch Adsorption von Membranproteinen, wie beispielsweise Myelin Basic Protein (MBP), an die Membran es zu einer Verringerung der Linienspannung und einem Energiegewinn kommen kann. Ein ähnlicher Effekt konnte in den Studien zu P2 beobachtet werden. Des Weiteren zeigte Träger⁴³ auf, dass während der Adsorption des MPB an die myelinähnliche Lipidmonoschichten zwei energetische Effekte miteinander konkurrieren. Das sind i) die elektrostatische Anziehung und ii) die Verringerung der Linienspannung an der Phasengrenze zwischen phospholipidreichen und cholesterinreichen Domänen.⁴² Ein ähnliches Phänomen konnte in den Studien des P2 ebenfalls beobachtet werden. In Analogie zu MPB ist auch P2 in der Lage, sich in die Phasengrenze zwischen den Domänen zu positionieren und eine Interaktion mit den geladenen Lipiden PI und PS aufzuzeigen.

2.2.4. Grundlagen der Nanodiscs

Nanodiscs (Lipodisks, Liponanodisks, ND) sind scheibenförmige Strukturen die aus den Doppellipidsystemen abgeleitet sind. Die beiden wichtigsten Methoden zur Darstellung von NDs sind entweder die Verwendung eines amphiphilen Proteins, dem Membran Scarford Protein (MSP)⁴⁴⁻⁴⁶ oder über die Verwendung von amphiphilen Copolymeren.^{47,48} Bei der

Verwendung von MSP stehen mehrere Proteine zur Verfügung, die die Doppelschichtmembran stabilisieren. Ihr Vorteil ist ihre geringe Dispersität und die breite Anwendbarkeit.⁴⁶ Die Hauptklasse der Proteine, die für die Stabilisierung der Lipide verwendet werden, sind Membrangerüstproteine (MSP). Die MSP bestehen aus amphiphilen Helices, die den Kern der Doppelschicht gürtelartig umgeben. Sie können in ihrer Größe für verschiedenen Durchmesser der zu bildenden Nanodisc optimiert werden.⁴⁴⁻⁴⁶ Nachteile der auf MSP basierenden Nanodisc sind, dass einige biochemische Methoden insbesondere die NMR oder IR-Spektroskopie nicht in der Lage sind, zwischen MSP und den eingebauten Proteinen, der zu untersuchenden Membranproteinen, zu unterscheiden. Ebenfalls ist zu erwähnen, dass in den Präparationsprotokollen in der Regel Detergenzien verwendet werden müssen. Hier besteht eine große Gefahr labile Membranproteine zu denaturieren.⁴⁴⁻⁴⁶ Diese oben genannten Nachteile haben die auf Copolymer-basierenden Nanodisc nicht. Die Polymere sind in der Lage ihre Zielproteine samt Lipidumgebung direkt aus der natürlichen Doppelschichtmembran herauszulösen, dafür benötigen sie keine Detergenzien.^{47,49} Sie sind in großen Mengen sowie in größerer Polymervariation kommerziell verfügbar und stören auf Grund ihrer Struktur in den üblicherweise verwendeten biochemischen Methoden nicht.^{47,49-52} Die aktuellen Hauptvertreter sind die auf das Styrol-Maleinsäure (SMA) bzw. Di-Isobutyl- Maleinsäure (DIBMA) basierenden Copolymere.⁵³ Deren Nanodisc SMALP's, DIBMALP's genannt werden. Das hydrophile Monomer dieser Polymere ist in der Regel die Maleinsäure. Im SMA wird die Maleinsäure mit Styrol als hydrophobes Monomer polymerisiert. Dabei ist je nach Anwendungsgebiet eine Variation der Kettenlänge und Monomerverhältnis möglich.⁵⁴⁻⁵⁶ Trotz das SMA negativ geladen ist, wie die meisten natürlichen Lipidmembranen, weist es eine hohe Solubilisierungseffizienz auf.^{47,54,57} Dies ist auf die Fähigkeit zurückzuführen, dass seine Styrol-Körper während der Solubilisierungsphase zwischen die Lipidketten, einschleusen zu können und so die Nanodisc zu stabilisieren.^{57,58} Diese Einfügungen von Styrol in die Lipiddoppelmembran kann jedoch auch zu Störeffekten in den Lipiden führen und somit die Doppelmembranstruktur verändern.^{49,59} DIBMA, welches statt des Styrol eine Diisobutyl-Einheit als hydrophobe Einheit aufweist, hat keinen derartigen negativen Einfluss auf die Lipidmembran.⁴⁹ Als Ableitung des SMA kann das zwitterionische Copolymer SMA-SB angesehen werden. Es trägt statt der Maleinsäure-Einheiten ein Betaminsulfon-Säure Derivat derer. Dies soll wiederum für eine verbesserte Membranaffinität und Nanodiscstabilität führen.

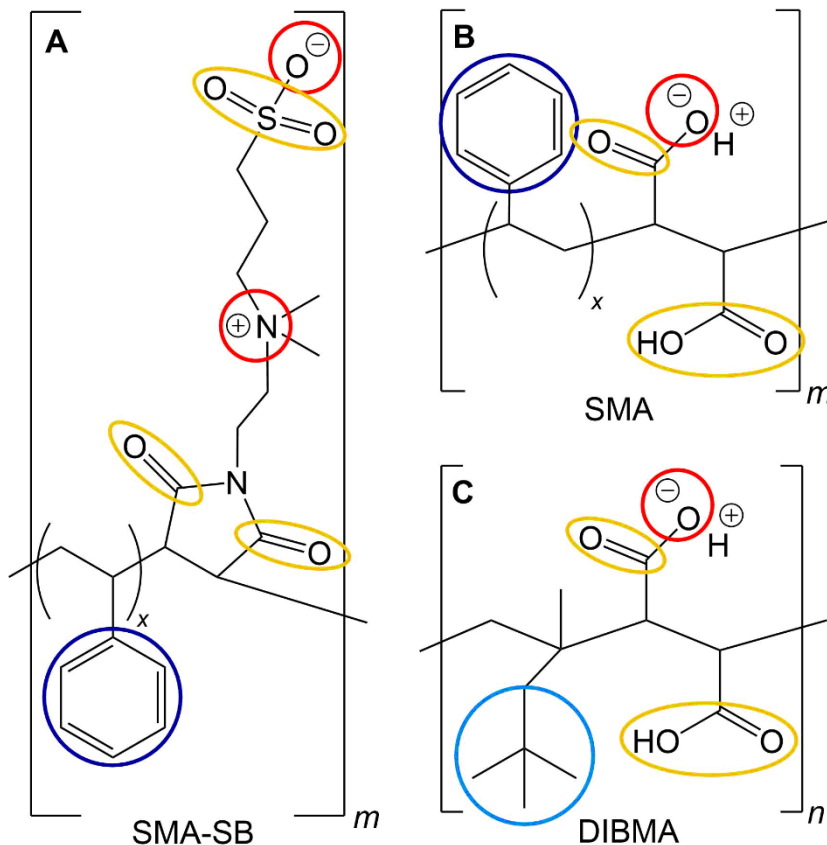


Abbildung 8 Darstellung der Struktur der Monomere von SMA, DIBMA und SMA-SB, samt Einzeichnung der an der Interaktion mit der Lipidmembran beteiligten funktionellen Gruppen, rot: positiv geladen; gelb: negativ geladen; blau: lipophile Gruppe

2.3. Monoschichtexperimente – Langmuir Filme

Biologische Systeme, wie etwa die Zellmembran, sind in der Grundlagenforschung komplex zu modellieren. Abhängig vom jeweiligen Zelltyp bestehen sie aus einer Lipiddoppelschicht, die mit adsorbierenden oder durchdringenden Proteinen und weiteren Komponenten kombiniert ist. Um die Zellmembran für Labor-Experimente zu modellieren, ist es häufig erforderlich, das Membransystem zu vereinfachen. In der Regel wird dazu eine Doppelschicht verwendet, die eine reduzierte Variation der Lipidarten enthält, beispielsweise eine reine Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC)-Doppelschicht). Eine weitere gängige Praxis ist die Bildung von Monoschichten, eine halbe Doppelschicht, für Untersuchungen in einer Grenzflächenumgebung,^{60,61} da sich so Eigenschaften wie der Phasenzustand, der Phasenübergang⁶² und der Einfluss der Subphase oder die Lipidzusammensetzung⁶⁰ auf Proteine untersuchen lassen. Dies ist insbesondere der Fall, wenn es sich nicht um Transmembranproteine handelt.^{26,27}

2.3.1. Pockels-Langmuir-Filmwaagen

Die Bildung eines Langmuir-Films setzt die Anordnung von amphiphilen Molekülen (Lipiden) auf der Grenzfläche zwischen Luft und Wasser auf der wässrigen Phase voraus. Zu diesem Zweck wird zunächst ein temperierbaren Teflontrog mit der wässrigen Phase befüllt, wobei das Volumen bzw. die resultierende Oberfläche A (siehe Abbildung 10, links) konstant gehalten werden.

In Kombination mit der Fläche eines Lipidmoleküls, die stoffspezifisch ist, wird auf diese Weise die Spreitmenge des Lipides berechnet. Die Monoschichtbildung führt zu einer Erniedrigung der Oberflächenspannung, die sich nach der Oberflächenkonzentration bemisst ($\Gamma = n_i/A$). Der Oberflächendruck wird von einer Wilhelmy-Plättchen-Waage detektiert.⁶³ Diese ermittelt die Oberflächenspannung über ein dünnes Plättchen (z. B. Filterpapier), das in die Subphase eintaucht. Dabei wird die kompensierende Kraft gemessen, die das Plättchen durch Benetzung nach unten zieht, welche durch eine Waage registriert wird. Der Oberflächendruck ist definiert als der Abfall der Oberflächenspannung γ auf eine Subphase, z.B. wenn eine Monoschicht an der Luft/Wasser-Grenzfläche gespreitet und komprimiert wird. Dabei bezeichnet γ_0 die Oberflächenspannung der Subphase ohne Lipidmonoschicht und γ die Oberflächenspannung der Subphase mit Monoschicht. Gemäß dessen wird die Oberflächenspannung als diejenige Arbeit definiert, die aufgewendet werden muss, um die Oberfläche der wässrigen Phase zu vergrößern.^{62,63}

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad 11$$

2.3.1.1. MIP (maximaler Insertionsdruck; *maximum insertion pressure*)

Bei zeitabhängigen Filmwaagemessungen mit konstanter Oberfläche (Adsorptionsfilmwaage, siehe oben) können Adsorptionsvorgänge von Proteinen oder Tensiden in der Monoschicht beobachtet werden. Für die Berechnung des MIP (*Maximum Insertion Pressure*) werden unterschiedliche Mengen der Lipidmischung je Messung auf die Grenzfläche aufgebracht, um eine bestimmte initiale Oberflächenspannung π_{ini} zu erreichen. Die Differenz zwischen π_{ini} der initialen Oberflächenspannung und π_{end} der Oberflächenspannung nach Einstellung des Gleichgewichtes (Adsorption des Tensides/Proteins zu Lipidmembran) ist $\Delta\pi$. Wenn man $\Delta\pi$ in eine lineare Funktion von π_{ini} setzt, so kann der maximale Eindringdruck MIP berechnet

werden. Er ist definiert durch den Schnittpunkt der linearen Regression gegen die x-Achse und beschreibt den höchstmöglichen Oberflächendruck, bei dem das Protein oder Tensid noch in die Lipidmonoschicht adsorbieren bzw. eindringen kann.

$$\Delta\pi = \pi_{end} - \pi_{ini}$$

12

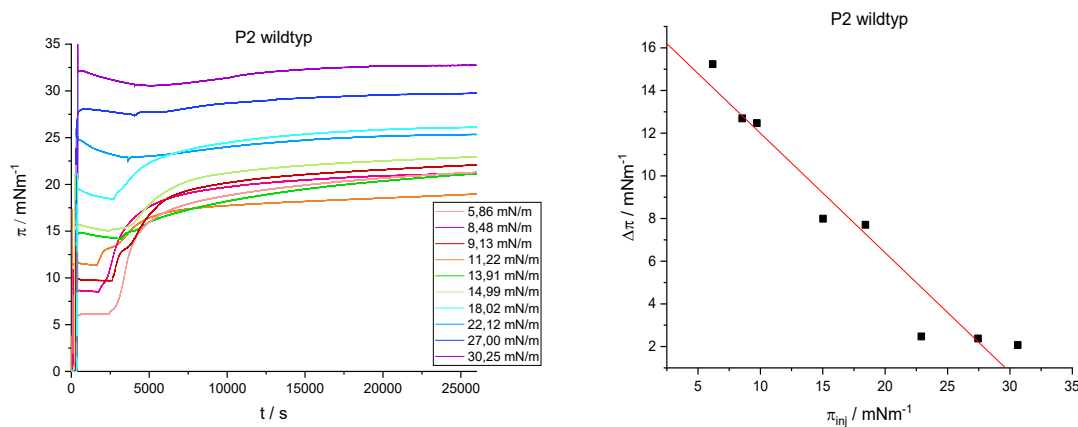


Abbildung 9 repräsentative Absorptionsmessung links und der Auswertung und Darstellung des MIP rechts; für die Messung P2 Wildtyp auf einer PNS-Monoschicht

2.3.1.2. Synergie

Während der MIP die Wirkung des Proteins auf die Monoschicht beschreibt, kann die Synergie als Wirkung der Monoschicht auf das Protein beschrieben werden. Die Synergie veranschaulicht die Wechselwirkung zwischen Protein und Lipid und gibt an, ob und wie stark die Lipidmischung in der Monoschicht die Adsorption an die Monoschicht unterstützt oder verhindert. Zwei Werte sind dafür von Bedeutung: i) der Schnittpunkt der y-Achse mit der linearen Regression und ii) die Steigung der Regressionsgeraden. Der Schnittpunkt der y-Achse gibt den maximal möglichen Druck an, bei dem das Protein in eine lipidfreie Grenzfläche eindringen kann (MIP in lipidfreier Grenzfläche). Die Steigung der Regressionsgerade beschreibt die Wechselwirkung zwischen Proteinen und Lipiden. Dabei ist die Synergie die Steigung der Regressionsgeraden plus eins.

$$synergy = b + 1$$

13

Ein Synergiewert größer als 0 deutet auf einen positiven Effekt hin, eine gegenseitige Unterstützung, es kann also zu einem MIP kommen. Bei Werten gleich 0 gibt es keinen Synergieeffekt, es kommt eher zu einem stationären Oberflächendruck bei initialen

Oberflächendruck. Bei Werten kleiner als 0 deutet es auf einen negativen Effekt hin, es kommt zu einem Ausschluss bzw. Verdrängung des Proteins bei erhöhtem initiale Oberflächendruck.

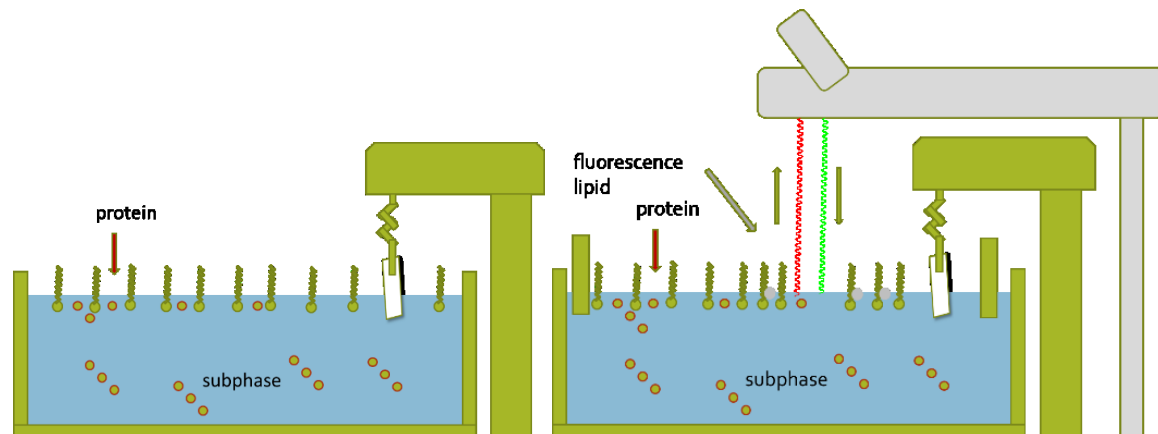


Abbildung 10 links: Schematische Darstellung einer Langmuir-Pocket-Filmwaage (ohne Barrieren zur Kompression), rechts: Schematische Darstellung einer Kompressionsfilmwaage mit einem Epifluoreszenzmikroskopieaufbau

2.3.2. Kompressionsexperimente an Pockels-Langmuir Filmwaagen

Je nach Versuchsaufbau bzw. Versuchsart^{60,61,64} befinden sich im Aufbau der Filmwaage an beiden Enden bewegliche Barrieren (Abbildung 10, rechts), mit denen der gespreitete Film komprimiert werden kann, um das Kompressionsverhalten der Lipide zu untersuchen. Dabei wird die Oberfläche pro Molekül kontinuierlich verkleinert und der Oberflächendruck gemessen. Das Kompressionsverhalten des Monolayers wird durch die Oberflächendruck/Flächen(π/A)-Isotherme beschrieben. Die Flächenpressung steigt bei weiterer Kompression durch die Barriere der Filmwaage bis zu dem Punkt an dem die größte Packungsdichte erreicht wird. Bei weiterer Kompression kollabiert das System und bildet Multilayer. Sowohl der Verlauf der π/A -Isotherme als auch der Filmkollaps sind unter Gleichgewichtsbedingungen (niedrige Kompressionsgeschwindigkeit) charakteristisch für die die Monoschicht bildende Substanz. Es können Rückschlüsse auf die Anzahl und die Art der molekularen Wechselwirkungen, als auch die Massenorganisation in einer Phase und den Übergang zwischen verschiedenen Phasen getroffen werden. Die Isotherme ist ebenfalls abhängig von Subphasenparametern wie pH-Wert, Ionenkonzentration und Temperatur.^{25,27} In der Monoschicht liegen, obwohl quasi zweidimensional, verschiedene Aggregatzustände vor (Abbildung 11). Der Phasenstatus der Lipidmoleküle ist vergleichbar mit dem eines realen Gas. Allerdings ist in der Monoschicht der Bewegungsspielraum der Moleküle

wesentlich eingeschränkt, da die Kopfgruppe das Lipidmolekül an der Wasseroberfläche fixiert. In Abbildung 11 ist ein beispielhafter Verlauf einer Oberflächendruck-/Flächenisotherme mit den verschiedenen Phasenübergängen dargestellt. Zunächst liegen auf einer expandierten Oberfläche die Lipide isoliert voneinander vor. Die Moleküle können sich auf der Wasseroberfläche bewegen, ohne sich gegenseitig zu beeinflussen (nicht nachweisbare Druckanstieg bei Kompression). Da sich die Monoschicht (2D) wie ein ideales Gas in einem 3D-Volumen verhält, wird diese Phase als gasanaloge Phase bezeichnet. Durch Verkleinerung des zur Verfügung stehenden Raumes wird die Lipiddichte erhöht und die Wechselwirkungen zwischen den Lipiden dominieren das Phasenverhalten. Die Moleküle "spüren" sich gegenseitig und setzen der Kompression einen messbaren Druck entgegen (lift off): Die Lipide werden zunehmend dazu gezwungen, sich aufzurichten, um dem verringerten Platzangebot entgegenzuwirken. In der flüssigen Phase lassen sich drei verschiedene Zustände unterscheiden: die flüssig-expandierte (LE), die flüssig-geordnete (Lo) und die flüssig-kondensierte Phase (LC). Phasenübergänge lassen sich an Veränderungen in der Steigung der Isothermen erkennen. Die Lo-Phase (nicht dargestellt) stellt eine Zwischenstufe zwischen der LE- und der LC-Phase dar. In dieser Phase sind die Lipide bereits orientiert, weisen jedoch noch nicht die hohe Packungsdichte der folgenden LC-Phase auf. Die Form des Isothermenanstieg liefert Informationen über die Ordnung des Übergangs. Horizontale Plateaus, bei denen keine Druckänderung auftritt, deuten auf einen Phasenübergang erster Ordnung hin, während geneigte Übergänge auf Übergänge höherer Ordnung schließen lassen. In der flüssig-kondensierten Phase behalten die starren Kohlenstoffketten noch eine gewisse Rotationsfreiheit und sind geneigt, um eine dichtere Packung zu ermöglichen. Mit zunehmendem Oberflächendruck ist die Packungsdichte der Kohlenwasserstoffketten des Filmes so dicht wie in vergleichbarem kristallisierten Paraffinen. Es wird die sogenannte feste analoge Phase (S) erreicht, an die sich der Filmkollaps mit irreversiblen Veränderungen anschließt.²⁵⁻²⁷ Welches Phasenverhalten

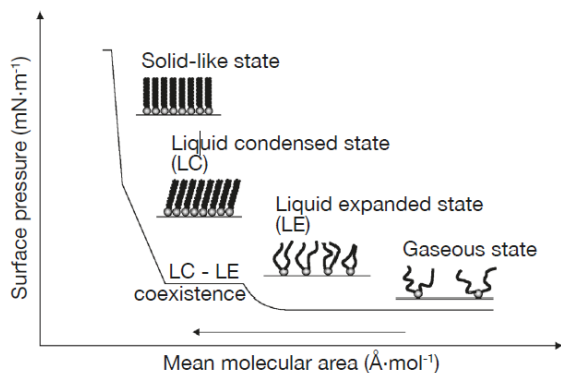


Abbildung 11 theoretische phi-A isotherme; Kompression eines nicht löslichen Lipidmonolayers auf einer Luft-Wasser-Grenzfläche²²² samt schematischer Darstellung der verschiedenen Zustände der Monoschicht

entgegen (lift off): Die Lipide werden zunehmend dazu gezwungen, sich aufzurichten, um dem verringerten Platzangebot entgegenzuwirken. In der flüssigen Phase lassen sich drei verschiedene Zustände unterscheiden: die flüssig-expandierte (LE), die flüssig-geordnete (Lo) und die flüssig-kondensierte Phase (LC). Phasenübergänge lassen sich an Veränderungen in der Steigung der Isothermen erkennen. Die Lo-Phase (nicht

dargestellt) stellt eine Zwischenstufe zwischen der LE- und der LC-Phase dar. In dieser Phase sind die Lipide bereits orientiert, weisen jedoch noch nicht die hohe Packungsdichte der folgenden LC-Phase auf. Die Form des Isothermenanstieg liefert Informationen über die Ordnung des Übergangs. Horizontale Plateaus, bei denen keine Druckänderung auftritt, deuten auf einen Phasenübergang erster Ordnung hin, während geneigte Übergänge auf Übergänge höherer Ordnung schließen lassen. In der flüssig-kondensierten Phase behalten die starren Kohlenstoffketten noch eine gewisse Rotationsfreiheit und sind geneigt, um eine dichtere Packung zu ermöglichen. Mit zunehmendem Oberflächendruck ist die Packungsdichte der Kohlenwasserstoffketten des Filmes so dicht wie in vergleichbarem kristallisierten Paraffinen. Es wird die sogenannte feste analoge Phase (S) erreicht, an die sich der Filmkollaps mit irreversiblen Veränderungen anschließt.²⁵⁻²⁷ Welches Phasenverhalten

beobachtet werden kann, hängt von der Lipidstruktur bzw. dem Lipidmix ab. So findet man in sphingomyelinreichen Mischungen, mit langen gesättigten Kohlenwasserstoffketten, überwiegend feste Phasen. Ungesättigte Phospholipide zeigen meist nur flüssig expandierte Phasenzustände oder reichern sich in diesen an.⁶⁵ Ebenso ist die Temperatur entscheidend für die Beobachtung von Phasenübergängen. Bei tiefen Temperaturen wird meist eine kondensierte Phase induziert, während hohen Temperaturen die flüssig-expandierte Phase begünstigen.²⁷

2.3.3. Epifluoreszenz Filmwaagen

Fluoreszenz beschreibt den Prozess, bei dem kurzwelliges Licht absorbiert und langwelliges Licht emittiert.⁶⁶ Ein Elektron aus dem Grundzustand S_0 geht in einen angeregten Zustand S_1 über, dem eine strahlungslose Schwingungsrelaxation in den niedrigsten angeregten Schwingungszustand in S_1 folgt und schließlich eine Emission zum Grundzustand S_0 stattfindet. Zu den konkurrierenden Reaktionen gehören z. B. die strahlungslose Totaldeaktivierung (IC: Internal Konversion) und Phosphoreszenz. Dabei werden Elektronen aus Doppelbindungen leichter angeregt, da die p-Elektronen der Doppelbindung über beide Atome verteilt und damit weniger stark gebunden sind. Deshalb werden meist Fluorochrome

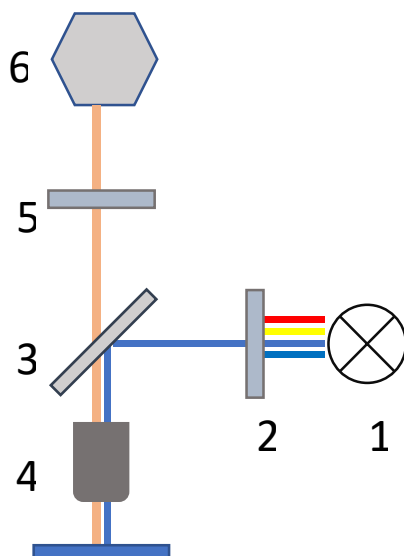


Abbildung 12 Schematischer Aufbau und Prinzip eines Epifluoreszenzmikroskops; 1 Lichtquelle, 2 Anregungslichtfilter, 3 dichroitischen Spiegel, 4 Objektiv, 5 Emissionsfilter, 6 EMCCD-Kamera

Moleküle mit konjugierten Doppelbindungen verwendet.⁶⁶

In dieser Arbeit wurde mit einem Auflicht-(Epi-)Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 12) gearbeitet. In einem Auflichtmikroskop trifft das kurzwellige Licht der Lichtquelle, meist eine Quecksilber- oder LED-Lampe, deren gewünschte Anregungswellenlänge zuvor herausgefiltert wurde, auf einen dichroitischen Spiegel, der das Licht durch ein Objektiv auf die Probe fokussiert. Das langwelligere Fluoreszenzlicht passiert erneut das Objektiv und durchstrahlt den für das Emissionslicht durchlässigen dichroitischen Spiegel erneut. Nach Passieren des Emissionsfilters wird das Signal von einer EMCCD-Kamera detektiert.⁶⁷ Die Charakterisierung von Lipidmonoschichten mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie ist von Vorteil, da die

Probe nicht mechanisch belastet wird und die Sensitivität der Fluoreszenzmikroskopie sehr

hoch ist.⁶⁸ Das hier dem Lipidgemisch zugegebene Fluorophor Rhodamin-B-1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-Glycerin-3-Phosphoethanolamin (Rhodamin-B-DHPE) ist aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit in den Phasen für den Hell-Dunkel-Kontrast in der Bildgebung verantwortlich. Dunkle Bereiche in der Abbildung bedeuten Abwesenheit, helle Bereiche zeigen eine Anreicherung des Fluoreszenzfarbstoffs an. Außerdem bevorzugt Rhodamin-B-DHPE die flüssig-expandierte Phase und lagert sich die Kopfgruppen der Lipide an.⁶⁹ Mit dieser Versuchsanordnung lässt sich vor allem die Bildung von Domänen beobachten, da diese eine Phase höherer Ordnung bilden und in Mischungen eine andere Lipidzusammensetzung als ihre

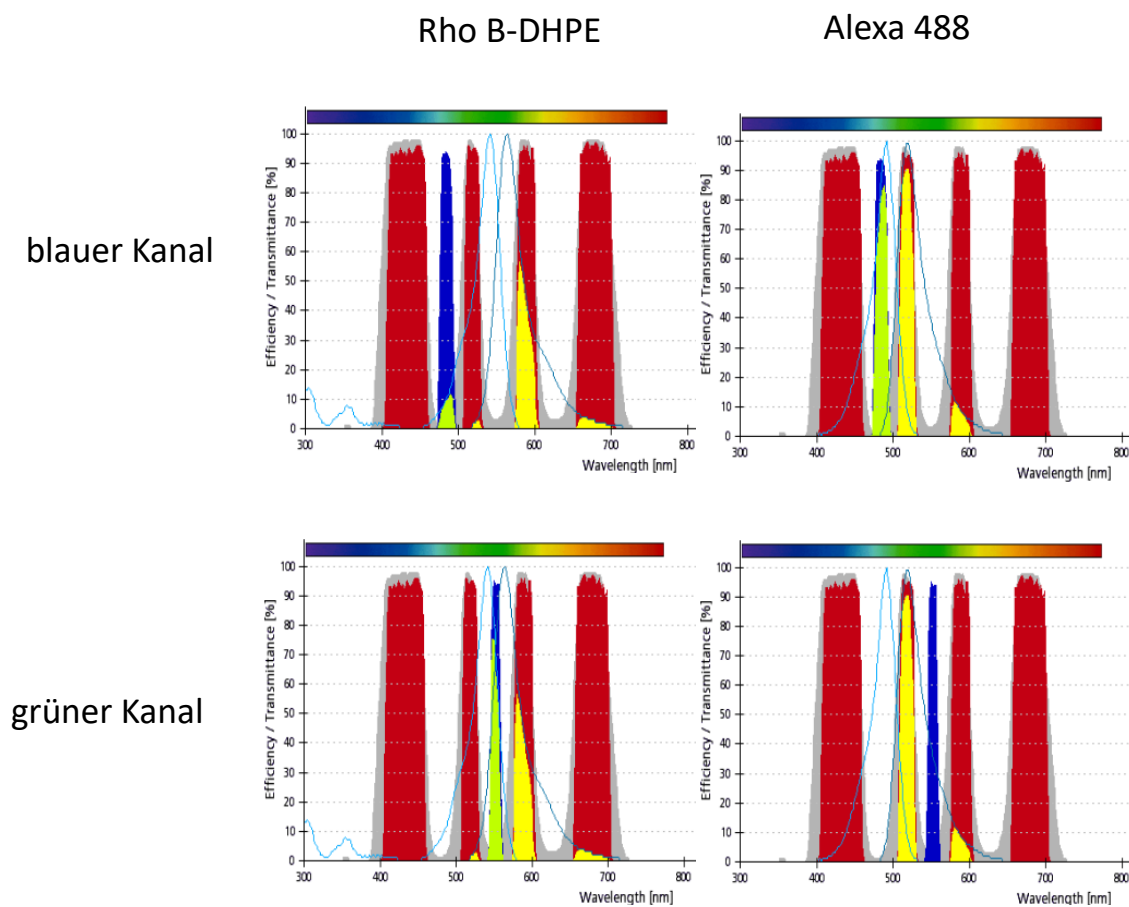


Abbildung 13 Emissions-Absorptionsspektren von Rhodamin B (RhoB-DHPE) und Alexa 488, jeweils bei Emissionswellenlänge 486 nm (blauer Kanal) und 547 nm (grüner Kanal)²²³; Bildfarben: blau: Emissionslicht, rot: Detektionsbereiche; grün Emissionseffizienz, gelb: Detektionseffizienz

Umgebung annehmen, vergleichbar mit Rafts in Lipiddoppelschichten. Die Domänen können jede Form annehmen. In Lipidmischen mit einem höheren Cholesterolgehalt können die Domänen bei niedrigen Oberflächendrücken runde Formen annehmen, bei hohen Oberflächendrücken können streifenförmige Domänen gebildet werden.^{70,71}

Bei den in dieser Arbeit gezeigten Zwei-Farb-Experimenten auf der epifluoreszenzmikroskopischen Filmwaage wurde neben dem bereits erwähnten Rhodamin-DHPE der Fluoreszenzfarbstoff Alexa-488 verwendet. Dieses Rhodamin-Derivat, als Succinidylester, wurde an das Protein vorab konjugiert und ein entsprechender Anteil des nativen Proteins gegen das Konjugat sublimiert. Die Kombination von Alexa 488 und Rhodamin-B-DHPE beruht auf der Überlappung der Absorptions- und Emissionsbanden des Rhodamins-DHPE im Bereich von Alexa 488 im blauen Kanal (Alexa 488: ~490 /513 nm Anregungs-/Emissionsmaximum⁷²; Rho-B-DHPE: ~560/580 nm Anregungs-/Emissionsmaximum⁷³). Diese Überlappung, die normalerweise als negativ angesehen wird, ermöglicht in diesen Experimenten die Lokalisierung der gelabelten Proteine innerhalb der Monoschicht. Dies ist notwendig, da Lipid-Monolayer keine starren Systeme sind und eine kontinuierliche Bewegung des Films innerhalb der Aufnahme stattfindet.

2.4. Dynamische Lichtstreuung

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) stellt ein nicht-invasives und schnelles Verfahren zur Bestimmung der Größe von Partikeln in einer Probe im Bereich von weniger als einem Nanometer bis zu mehreren Mikrometern dar. Die Messung der Geschwindigkeit der Brownschen Molekularbewegung von Partikeln bildet die Grundlage für diese Analyse. Die Brownsche Bewegung beschreibt die ungerichtete Bewegung von kleinen Partikeln in einer Lösung und resultiert aus Kollisionen mit Lösungsmittelmolekülen. Dabei weisen kleine Partikel eine höhere Diffusionsgeschwindigkeit auf als große Partikel. Die quantitative Messung der Geschwindigkeit der Brownschen Bewegung erfolgt durch den Translationsdiffusionskoeffizienten D . Die Messung der Diffusionsgeschwindigkeiten erfolgt mittels DLS durch die Beleuchtung (Laser) von Partikeln in einer Dispersion. Die Partikel streuen einen Teil des Laserlichtes und aufgrund der Eigenbewegung der Teilchen fluktuiert die Intensität des gestreuten Lichtes mit der Zeit. Die Kumulation vieler detektierter einzelner dynamischer Lichtstreuungsintensitäten resultiert in einem fluktuierenden Intensitätssignal (Abbildung 14). Die beobachteten Schwankungen werden durch die Interferenz des von jedem einzelnen Teilchen gestreuten Lichts verursacht. Es ist zu erwarten, dass sich die Intensität mit der Zeit verändern wird, da die Partikel eine Diffusion erfahren.^{74,75}

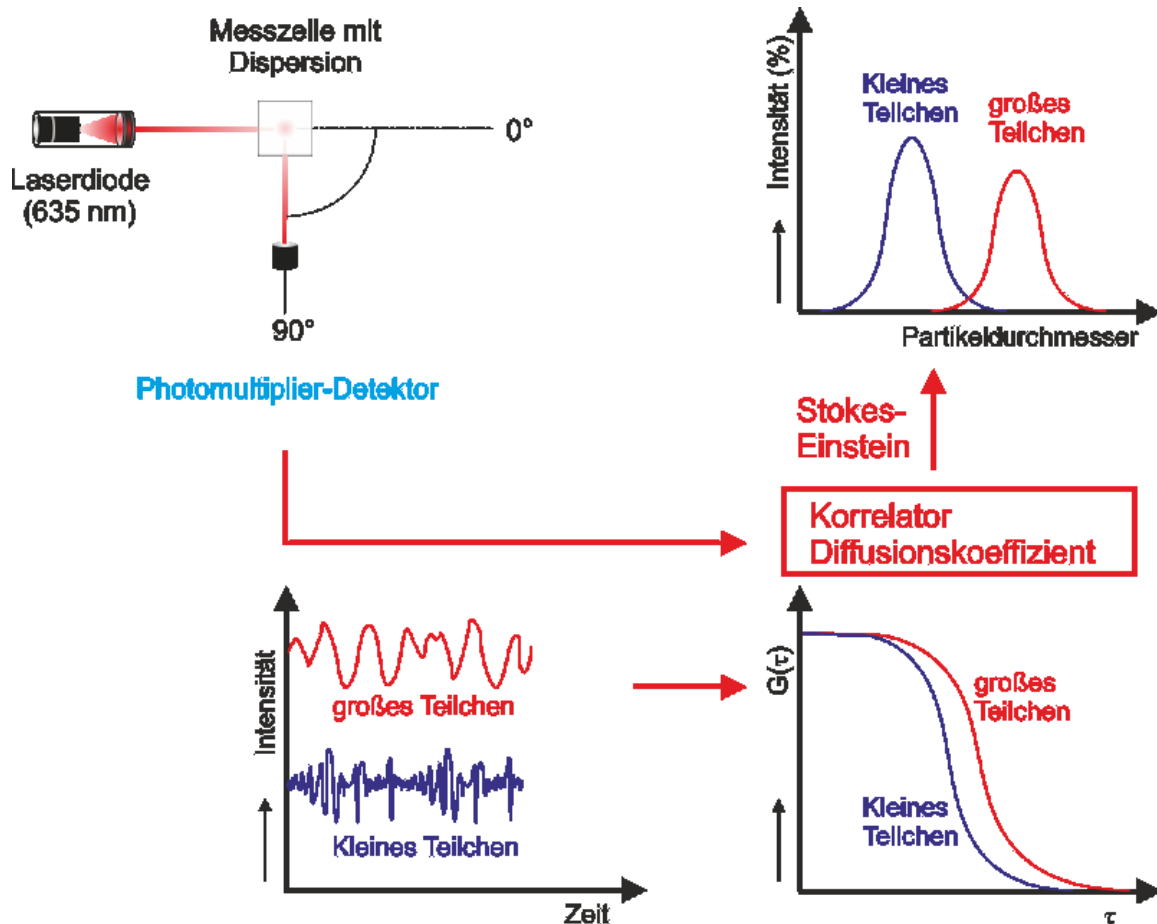


Abbildung 14 Schema der Beziehungen zwischen gemessenen fluktuierenden Intensitätssignalen (links) und Schema der Beziehungen zwischen gemessenen fluktuierenden Intensitätssignalen (links) und Intensitätskorrelationsfunktionen $g_2(\tau)$ (rechts) für große und kleine Partikel mit Basislinie C und Steigung B wie in Gleichung 7 verwendet⁷⁶

Die Geschwindigkeit der Intensitätsfluktuationen ist abhängig von der Diffusionsrate der Partikel, wobei kleinere Teilchen eine schnellere Diffusion aufweisen und dies zu rapiden Schwankungen des gestreuten Lichtes führt. Die zeitlichen Abstände zwischen den Aufnahmen des Lichtstreusignals $I(t + \tau)$ sind dabei in der Regel sehr gering, da die Messungen in einem Bereich der Korrelationszeit τ von Nano- oder Mikrosekunden erfolgen. Die so gewonnenen Momentaufnahmen werden anschließend miteinander verglichen. Bei Betrachtung von Momentaufnahmen, die zeitlich weiter voneinander entfernt sind, nimmt die Ähnlichkeit oder Korrelation jedoch ab, bis schließlich keine Korrelation mehr mit dem ursprünglichen Signal besteht. Dieser Vorgang wird als Autokorrelation bezeichnet. (zeitliche Entwicklung der Intensitätssignale) Die Diffusionsgeschwindigkeit der Partikel sowie die Dauer bis zum vollständigen Verlust des Korrelationssignals sind dabei signifikant korreliert. Die Größe der Partikel hat einen direkten Einfluss auf die Diffusionsgeschwindigkeit sowie die Dauer bis zum Verlust des Korrelationssignals (Abbildung 14). Kleine Partikel weisen demnach

eine schnellere Diffusion auf, was wiederum eine schnellere Korrelationsabnahme zur Folge hat.^{74,75,77}

$$d_H = \frac{k_B * T}{3 * \pi * \eta * D} \quad 14$$

Die Erfassung der Größeninformationen erfolgt durch Umwandlung der Werte in den hydrodynamischen Durchmesser d_H unter Anwendung der Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung 14).^{78,79} Die Variablen Lösungsmittelviskosität η und Temperatur T sind dabei zu berücksichtigen, da sie die Diffusionsrate der Partikel beeinflussen. Die gemessene Größenverteilung wird als Intensitätsverteilung angezeigt und die Ergebnisse können unter Verwendung verschiedener Annahmen in eine Volumen- oder Zahlengrößenverteilung umgewandelt werden. Der angegebene hydrodynamische Durchmesser (d_H) ist der Durchmesser einer harten Kugel, die mit der gleichen Geschwindigkeit diffundiert wie das zu messende Partikel oder Molekül. Der Translationsdiffusionskoeffizient ist dabei abhängig von der Größe des Partikelkerns sowie von der Oberflächenstruktur, der Konzentration und der Art der Ionen im Medium. Sowohl die Ionen im Medium als auch die Gesamtionenkonzentration können die Partikeldiffusionsgeschwindigkeit beeinflussen, indem sie die Dicke der elektrischen Doppelschicht ändern. Jede Änderung der Partikeloberfläche, die die Diffusionsgeschwindigkeit beeinflusst, führt zu einer entsprechenden Änderung der scheinbaren Partikelgröße. Zum Beispiel kann durch die Proteinkonformation die Art der Partikeloberfläche und des Proteins sowie durch die Ionenkonzentration des Mediums beeinflusst werden, was wiederum eine Veränderung der scheinbaren Partikelgröße um einige Nanometer zur Folge haben kann. Die Breite der Partikelgrößenverteilung wird durch den Polydispersitätsindex (PDI) beschrieben. Dieser wird durch die kumulative Anpassung abgeleitet, wobei eine Abklingkonstante der Intensitätskorrelationsfunktion berechnet wird.^{77,80}

2.5. zeta-Potential und elektroforetische Lichtstreuung

Das elektrische Potenzial ist ein Maß dafür, wie viel Energie benötigt wird, um eine einzelne Punktladung aus unendlich großer Entfernung zum Teilchen zu bewegen. Das Zeta-Potential ist ein Maß für die Oberflächenladung und ein Indikator für die Stabilität des einzelnen Partikels sowie seine Neigung zur Aggregation oder Koagulation. Es ist als das Oberflächenpotential definiert, welches sich auf der Gleichebene des Partikels befindet. Es ist

dabei von einigen Faktoren abhängig, u. a. dem Anfangswert des Oberflächenpotentials auf der Partikeloberfläche, der Dicke der elektrischen Doppelschicht (Debye-Länge) und der Salzkonzentration des umgebenden Mediums. Dabei nimmt die Dicke der Doppelschicht mit steigender Ionenstärke des umgebenden Mediums ab.

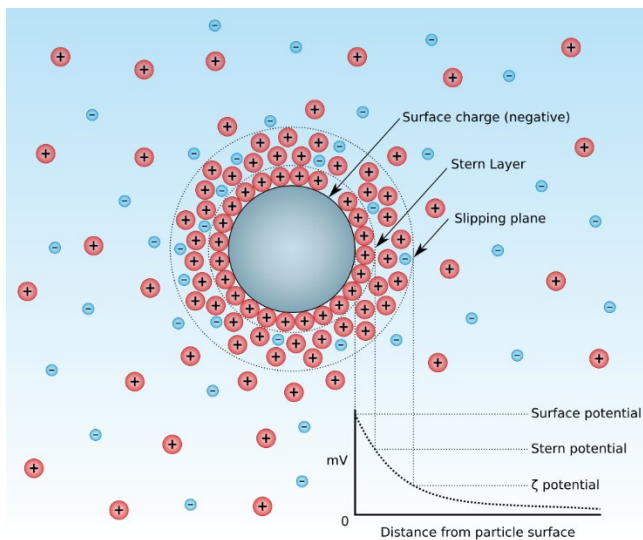


Abbildung 15 Schematische Darstellung der Oberflächenpotentiale eines Partikels⁸¹

Das Zeta-Potenzial wird in der Regel über die elektrophoretische Lichtstreuung ermittelt. Dabei wird die elektrophoretische Beweglichkeit der sich in einer Lösung befindlichen Teilchen innerhalb eines elektrischen Feldes gemessen. Aus den ermittelten Werten der elektrophoretischen Mobilität (U_E) kann nach Lösen der Gleichung xxx das Zeta-Potenzial errechnet werden.

$$U_E = \frac{2 * \epsilon * \zeta * F(\kappa * a)}{3 * \mu} \quad 15$$

Dabei sind: U_E die elektrophoretische Mobilität, ϵ die Permittivität, ζ das Zeta-Potential, μ die Viskosität und $F(\kappa * a)$ die Henry-Funktion mit als κ^{-1} Debye-Länge und a als Teilchenradius

Eine moderne Messtechnik zur Bestimmung des Zeta-Potentials ist die cmPALS. Sie beruht grundsätzlich auf der ELS, jedoch wird die Phasenänderungsrate der gemessenen Interferenz zwischen dem von der Probe gestreuten Licht und dem errechneten modulierten

Referenzstrahl untersucht (PALS). Bei der cmPALS werden zwei Signale parallel gemessen: das Probensignal (Streulicht der Probe und modulierte Referenzstrahlung) und das Monitorsignal, bei dem der modulierte und der unmodulierte Referenzstrahl überlagert sind. Diese Doppelmessung ermöglicht es, probe- oder messgerätbezogene Indikatoren in die Berechnung des Zeta-Potentials einzubeziehen, z. B. Alterung, Temperatur- oder Frequenzänderung.^{25,82-94}

3. peripheres Myelinprotein P2

3.1. Einführung

Im folgenden Abschnitt wird das periphere Myelinprotein 2 (PMP2, P2) näher beleuchtet, dabei werden mittels cwEPR-Spektroskopie und Filmwaagenmethodik die beiden bekannten physiologischen Funktionen des P2 experimentell betrachtet. Mutationen am P2 sind nachweislich mitverantwortlich für Entstehung von neuronalen Erkrankungen u.a. der Charcot-Marie-Tooth (CMT) Krankheit und des Guillain-Barré-Syndroms (GBS). Dabei treten diese neuronalen Krankheiten bei einer Punktmutation des P2 einher.^{7,95} P2 wird in der Literatur auch Myelin-*Fatty Acid Binding Protein* (M-FABP) oder FABP 8 bezeichnet. Die Klasse der FABPs sind β -Fass-Transportproteine, welche für den intrazellularen Fettsäuretransport und den Aufbau der Zellmembran mitverantwortlich sind. Um zu verstehen in welchem Rahmen P2 und neurologische Krankheiten assoziiert sind, müssen beide Aufgaben des P2 näher betrachtet werden. So wird in den folgenden Kapiteln zunächst die Funktion als fettsäurebindendes Protein (*Fatty Acid Binding Protein*, FABP) analysiert und später die Funktion der Membranassoziation bei der Verbindung von PNS-Lipidmembranen in der Myelinscheide.

3.1.1. neuronale Krankheiten, Charcot-Marie-Tooth Krankheit; Guillain-Barre-Syndrom

für Krankheiten und phänotypische, pathogene Veränderungen von Organismen haben oftmals ihren Ursprung in Mutationen von Proteinen. Eine Mutation von P2 wurde in Kausalität mit neuronalen Krankheiten wie der der Charcot-Marie-Tooth (CMT) Krankheit oder dem Guillain-Barré-Syndroms nachgewiesen.^{7,95} Die CMT, auch hereditäre motorische-sensible Neuropathie Typ I genannt, ist eine durch Gendefekte ausgelöste Neuropathie, die mit der Demyelinisierung des peripheren Nervensystems einhergeht. In deren Folge kommt es zu einer Beeinträchtigung der Nervenleitgeschwindigkeit. Die mittlere motorische Nervenleitgeschwindigkeit liegt je nach Ausprägung der CMT unter 38 m/s;⁹⁶ der anatomische Normwert liegt bei A α -Fasern (nach Erlanger/Gasser) bei: 60-120 m/s.⁹⁶ Diese verminderte Nervenleitgeschwindigkeit hat motorische als auch sensible Ausfälle zur Folge. Die CMT manifestiert sich i.d.R. in den ersten zwei Lebensjahrzehnten. Sie hat eine Prävalenz von 20-

40 auf 100.000. Die häufigste Ursache ist die Duplikation des Peripheren Myelin Protein 22 (PMP22)-Gen (CMT1A). Die CMT1G (P2 assoziierte CMT) hat eine Prävalenz von 1 zu 1.000.000, trotz deren geringerer Prävalenz ist sie nicht weniger klinisch relevant.^{7,95-100}

Gonzaga⁹⁵ und Motley⁷ konnten in genetischen Studien zwei für die CMT1G verantwortliche Varianten (Mutanten) des P2 identifizieren. I43N und I52T stehen in beständigem kausalem Zusammenhang zum autosomal dominant vererbten CMT1G. Wie die Ergebnisse von Gonzaga⁹⁵ zeigen, haben das Vorhandensein von P2, als auch die Mutation des P2 einen großen Einfluss auf das Nervensystem, wie es hier in Experimenten mit Zebrafischen verdeutlicht wird. Abbildung 16 zeigt die Aufnahmen der Nervensysteme von Zebrafischen und die Auswirkungen von fehlendem P2 bzw. der Zugabe der I43N-Mutante .

Die Kontrollgruppe (Abbildung 16 A) zeigt geordnete Nervensysteme. In der Morpholino-Knockdown (MO) Variante (Abbildung 16 B) wurde das P2-Gen unterdrückt. Es zeigen sich ein Motorneuronenphänotyp, bei dem die Nervenstränge nicht vom Notochord herauswachsen und die Axone nicht korrekt innervieren. In Abbildung 16 C und D wurden den MO-Zebrafischen im Embryostadium humanes P2-Gen (Wildtyp bzw. I43N-Variante) injiziert. Zwar konnte diese Geninjektion den Wildtyp-Phänotyp nicht wiederherstellen, es zeigt sich dennoch, dass die humane P2wt-Gen-Injektion, bei der Phänotyp Ausprägung nah an der Kontrollgruppe ist und die Gruppe mit I43N-Gen Injektion weiterhin eine deutliche Anomalität der Nervenstränge aufweist. Ebenfalls ist aus diesen Studien⁹⁵ bekannt, dass die Konzentration des exprimierten P2 im Organismus, verglichen zu PMP22, für die korrekten Aufbau der Nervenbahnen essenziell ist.

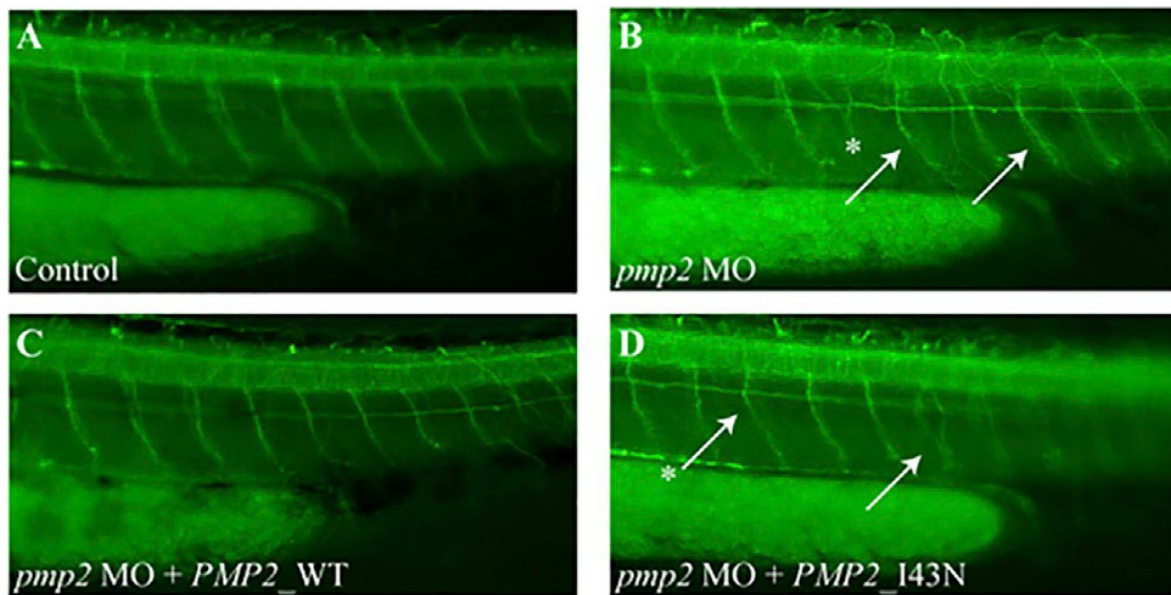


Abbildung 16 laterale Aufnahme des Zebrafischnervensystems, A Kontrollgruppe; B Morpholino-Gruppe (MO-Gruppe), P2-Gen unterdrückt; C MO-Variante und Injektion von humanem wtP2-Gen; D: MO-Variante und Injektion von humanem I43N-Gen⁹⁵

I43N und I52T sind Punktmutationen, welche Änderung von Aminosäuren in der β -Faltblattfasstruktur aufzeigen. I43N hat einen Austausch eines Isoleucins gegen ein Asparagin und bei I52T einen Austausch von Isoleucin gegen Threonin. Obwohl die Mutation nicht an einer Membranbindungsstelle bzw. an einer für die Ligandbindung beteiligten Position liegt, noch in direkter Beziehung zu den für die Membranadsorption verantwortlichen Bereiche, hat diese Punktmutation signifikante Auswirkungen auf die Funktion des P2 und das Outcome der CMT.^{7,95}

Als dritte hier aufgeführte Variante steht das P38G. Hier wurde Prolin gegen Glycin getauscht, die Position 38 befindet sich in einem ungeordneten Strukturbereich zwischen dem β -Faltblattfasc und dem an der Ligandenbindung involvierten α -helikalen Deckelregion. Ebenfalls ist die Position 38 in großer Nähe zu der Anionbindungsstelle, welche an der Konformationsänderung zur Ligandenaufnahme stark beteiligt ist.^{39,101} Bisher gibt es noch keine Studien die eine Assoziation zwischen P38G und einer neuronalen Krankheit belegen. Jedoch erlaubt diese Variante einen Vergleich und Aufschluss auf die Bedeutung der Mutationsposition auf die Funktion bzw. Funktionseinschränkung des P2.

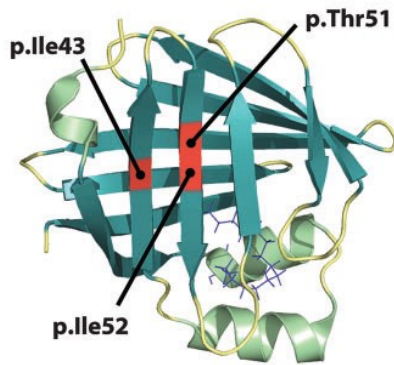


Abbildung 17 Kristallstruktur des P2 modelliert mit Palmitat als Ligand, Helixstruktur in hellgrün, β -Stränge in blaugrün. Darstellung der drei CMT1-assoziierten Varianten; I43N an β -Strang B; I52T und T51P an β -Strang C⁷

3.1.2. Aufbau und Funktion des peripheren Myelinprotein 2

Nach Abe¹⁰² ist P2 unter anderem für den Transport und die asymmetrische Verteilung (extra-/intrazellulär) des Sphingomyelins (SM) in der Myelinmembran mit verantwortlich, mit dem Lipid PIP2 zusammen. Es regelt die asymmetrische Konzentration der SM auf den Membranseiten. Abe¹⁰² zeigt in Knock-Out- und Überexpressionsexperimenten die Rolle des P2. Es wird verdeutlicht, dass P2 in der Lage ist Mikromilieus aufzubauen, wobei sich eine Abhängigkeit zwischen P2-Konzentration und Häufigkeit der Membranmikrotubi sowie der SM Asymmetrie ergibt.¹⁰² Die Erhaltung der Asymmetrie gibt einen Hinweis auf die Begründung der Doppelfunktion der P2: i) als *Fatty Acid Bindung Protein* (FAPB) für den Lipidtransport – ob noch nicht final geklärt ist, welches der endogene Ligand des P2 ist³⁹ und ii) die Membranassoziation an die Myelinmembran.^{39,103,104} Es ist bekannt, dass die meisten Myelinproteine (P2, P0, MPB) mit neurologischen Krankheiten assoziiert werden können, jedoch ist aktuell noch wenig über die Beziehung zwischen dem pathogenen Bild und dem Protein bekannt.^{4,105}

P2 gehört zu den amphiphilen Transportproteinen, welche im Cytosol von Wirbeltieren die Aufgabe des Fettsäuretransportes übernehmen.¹⁰⁶ P2, das zur Familie der FABPs gehört, steht hier in einer homologen Reihe von β -Faltblattfassetproteinen mit einem Molekulargewicht von 14-15 kDa.¹⁰⁷ Aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften sind FABPs wasserlöslich und können hydrophobe Moleküle nicht kovalent binden und transportieren.¹⁰⁸ Es gibt mehrere Isoforme der FABPs die wahrscheinlich durch konvergente Evolution analoger Proteine hervorgegangen sind und durch Anpassung an die jeweiligen Gewebekompartimente sich dementsprechend stark sequenziell unterscheiden, unter Beibehaltung der Tertiärstruktur.¹⁰⁶

Die Kristallstruktur von FAPBs besteht aus zehn antiparallelen β -Strängen, die in zwei fünfsträngigen β -sheets organisiert sind. Zusammen bilden sie eine β -Faltblattfasstruktur mit einem Helix-Turn-Helix Motiv. Teile dieses Motives bilden den α -helikalen Deckel.^{5,104} Er bildet die Portalregion, die vermutlich als Eintritt für die Liganden dient und zum inneren hydrophoben Raum der β -Fass-Struktur führt.¹⁰⁹ FAPBs binden und transportieren grundsätzlich nur einen Liganden¹¹⁰, außer FABP1/*Liver*-FABP, welches mehrere Liganden binden kann¹¹¹ und zu meist alle gesättigten und ungesättigten langkettigen (ab C13) Fettsäuren.¹¹² Am direkten Bindungsprozess innerhalb der Bindungstasche ist das Kompartimente beteiligt, welches die Aminosäuren Arg108, Arg Thy126 und Arg128 umfasst (vgl. Abbildung 19).

Am Bindungsprozess ist ebenfalls die Anionbindungsstelle beteiligt, die durch die Amidgruppen des Rückgrats von Lys37 und Thr56 gebildet wird, welche aufeinander zuweisen. Bei einer Wechselwirkung mit der Membranoberfläche könnte die Bindung einer anionischen Gruppe an diese Region, eine Konformationsänderung induzieren, die für den Fettsäuretransfer erforderlich ist.^{39,101} Möglicherweise spielt der benachbarte Prolinrest (Pro38) eine Rolle dabei, dass die Amide des Rückgrats aufeinander zuzuweisen und die Öffnung des Deckels regulieren.^{39,101} In Anbetracht der möglichen Lipidtransfermodi in der FABP-Familie – diffusiv oder kollisional – ist FABP1 (*Leber*-FABP)¹¹³ das am besten charakterisierte FABP mit einem diffusiven Mechanismus. Bei FAPBs mit einem berichteten oder vermuteten Kollisionsmechanismus und einer bekannten dreidimensionalen Struktur ist Pro38 konserviert und die Amide des Rückgrats der Reste 37 und 56 sind wie bei P2 zueinander ausgerichtet. Interessanterweise ist Pro38 in FABP1 nicht konserviert und die Amide des Rückgrats, die die Anionenbindungsstelle in P2 bilden, sind nicht einander zugewandt.¹¹⁴

Die zweite Aufgabe der P2 liegt in der Membranbindung der Myelinmembran.³⁹ P2 wird in den Schwanzzellen in einer großen Menge exprimiert,¹¹⁵ es interagiert direkt mit dem Lipiddoppelschicht. So sind es z.B. elektrostatische Kräfte oder Kräfte hydrophober Gruppen zwischen dem α -helikalen Deckel und den Lipiden der Membran als auch anionische Regionen in den β -Faltblättern die für die Adsorption an die Membran verantwortlich sind.^{39,101,116} Die physiologische Aufgabe des P2 ist die Bindung an die Lipidmembran und das Stapeln zweier aneinander liegender cytoplasmatischer Membranbereiche zu einer kompakten Myelinmembran (Abbildung 18).^{103,117} Ebenfalls zeigt P2 einen direkten Einfluss auf die Lipidzusammensetzung der Membran und ist in der Lage sich Mikromilieu aufzubauen, als

auch die Asymmetrie der SM aufrecht zu erhalten,¹⁰² jedoch ist der Grund für diesen Einfluss bisher noch unbekannt.¹¹⁸ Winter¹¹⁹ publizierte 1982, dass in *Knock-Out*-Mäusen, die kein MPB exprimieren, P2 die Aufgabe des MBP übernimmt. Dies zeigt die Vielseitigkeit und multiple Funktionalität dieses doch relativ kleinen Proteins.

Um an die Myelinmembran zu binden, hat das P2 Membranbindungsstellen an seiner Oberfläche ausgebildet und mit positiv geladenen und/oder hydrophoben Aminosäuren besetzt. Besonders zu erwähnen, sind die an gegenüberliegenden Seiten des Proteins befindlichen positiv geladenen Regionen, welche für die Bindung an die, mit negativ geladenen Lipiden besetzte Myelinmembran, mitverantwortlich sind.^{101,104} Ruskamo¹⁰¹ geht davon aus, dass die Hauptmembranbindung auf dem α -helikalen Deckel liegt, welcher eine hydrophobe Spitze aus Leu27, Leu32, Leu35 mit einer positiv geladenen Umrandung besitzt. Die zweite Bindungsseite des P2 zeigt sich im β -Loop β 5 und β 6 bilden Arg88 und Arg78/Lys79/Arg96 den zweiten Anker zur Membranbindung.³⁹ Dort wechselwirken die Aminosäuren mit den positiv geladen Lipiden der Membran. Wie in Abbildung 18 gezeigt, sind es PIP (grün) und POPS (rot). Somit ist das P2 in der Lage die Aufgabe der Membranquervernetzung zu übernehmen und bei der Bildung einer kompakten Myelinscheide, in möglicher Kooperation mit dem basischem Myelinprotein (MPB), dem peripheren Myelinprotein 0 (P0) und dem peripheren Myelinprotein 22 (PMP22), zu unterstützen.

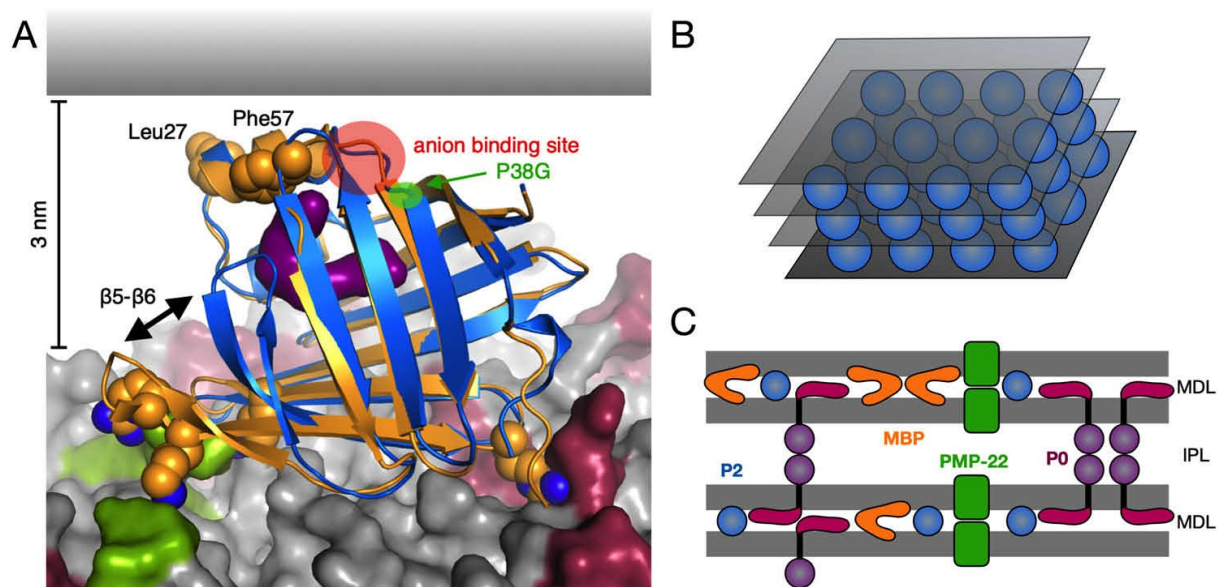


Abbildung 18 A MD-Simulation einer Membranbindung; Wildtyp (blau), P38G (orange) bei der Membranbindung wird Arg-88 über POPS-lipide verankert (rot); rot Anionenbindungsstelle, grüner Kreis Mutation von P38G; lila Fettsäure-Ligand wird durch Öffnung des α -helikalen Deckels freigegeben.; B schematisches Modell der gitterartigen P2-Anordnung in der Myelinscheide; C: integrale (P0 und PMP-22) und periphere (P2 und MBP) Membranproteine im kompakten PNS-Myelin.³⁹

3.2. EPR-spektroskopische Analyse der Fettsäurebindung von P2

3.2.1. Einführung

Für den Aufbau und Umbau von Membranen sind Fettsäuretransportierende Proteine, (FABP), von großer Bedeutung.^{101,104,106} Ihre Aufgabe besteht u.a. darin, Fettsäuren aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER), in die jeweiligen Kompartimente zu transportieren. Da Fettsäuren auch Signalinduktoren sein können,^{6,120} sollten sie erst an ihrem Zielort an das Zellorganell oder den Rezeptor abgegeben werden. In seiner Primärfunktion transportiert P2 Fettsäuren.^{6,120,121} P2 ist aktiv am Aufbau der Myelinscheide beteiligt. Wie Majavar⁵ in ihrer Simulation zeigen, nimmt P2 die Fettsäureliganden innerhalb der β -Faltblatt-Fasstruktur auf. Der Zugang wird über einen α -helikalen Deckel (α 2-Helix) gesteuert. Dieser α -helikale Deckel ist ebenfalls an der zweiten Funktion des P2 beteiligt – dem Adsorbieren des Proteins an die Myelinmembran¹⁰¹ (siehe Kapitel 3.3.). Fettsäureliganden die die Portalpassage überwunden haben, werden über ein mit Wassermolekülen besetzten Kanal in das Proteininnere geleitet,⁵ dort werden die Fettsäure über die Arg106, Arg126 und Try128 mittels Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischen Wechselwirkungen (Salzbrücken) arretiert. Dabei interagiert die Carbonyl-Gruppe mit dem Arg126 und Thy128 und die Alkoholgruppe mit dem Arg106.¹⁰¹ Somit befindet sich die Fettsäure mit dem Carboxyl-Kopf voraus in der Proteinbindungstasche (Abbildung 19). Im geschlossenen Zustand kommen dann weitere Aminosäuren hinzu, die mit dem Liganden in Interaktion treten, z.B. Phe57 aus der α -helikalen Deckelregion. Um eine EPR-Analyse dieses Proteins zu ermöglichen, war es strategisch sinnvoll EPR-aktive Fettsäuren als Modell-Liganden zu verwenden. Für die vorliegende Arbeit wurden die 5-Doxylstearinsäure (5-DSA) und die 16-Doxylstearinsäure (16-DSA) verwendet. Das 5-DSA trägt die Doxylgruppe an der Position 5 der Alkylkette in der Nähe der Carboxylgruppe und ermöglicht somit einen Blick in die Tiefe der Bindungstasche unter der Annahme einer ähnlichen Konformation der Modell-Liganden zur nativen Fettsäure. Das 16-DSA trägt die Doxyl-Gruppe an der Position 16 somit am aliphatischen Endstück des Liganden und ermöglicht eine Betrachtung der α -helikalen Deckelregion. Im Folgenden wird zunächst ein Einblick in die Bindungscharakteristika bei 37°C gegeben, anschließend erfolgt die genauere Betrachtung des Bindungsmodus mittels spektraler Simulation und schließlich die Untersuchung innerhalb von Temperaturreihen.

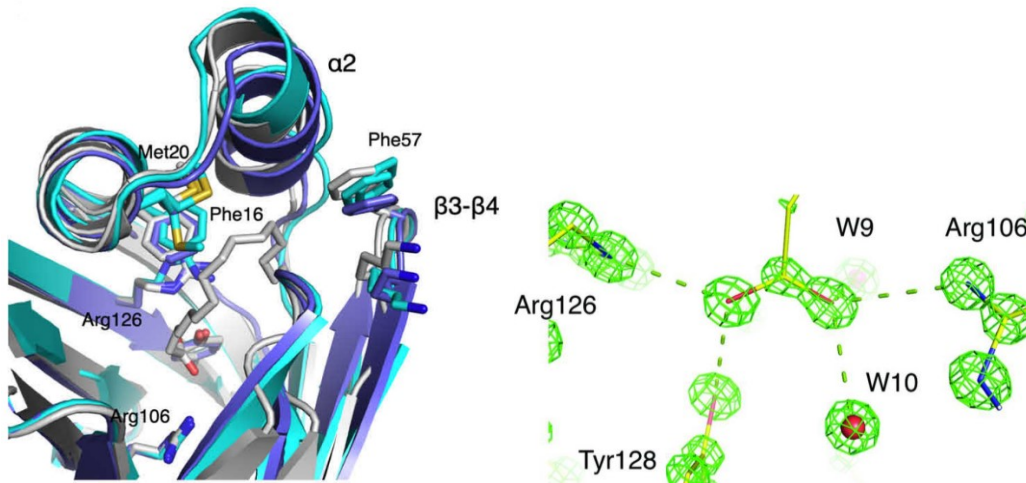


Abbildung 19 links: Konformationsunterschiede bei P2-Variation P38G mit und ohne Ligand; grau: P38G mit Ligand, hellblau/blau ohne Ligand;³⁹ rechts: Ausrichtung der Carboxylgruppe der Fettsäure im P2. Verdeutlichung der Wechselwirkung der Carboxylgruppe mit Arg126 und Tyr 128, als auch die Wechselwirkung von Wasser10 und Arg106¹⁰¹

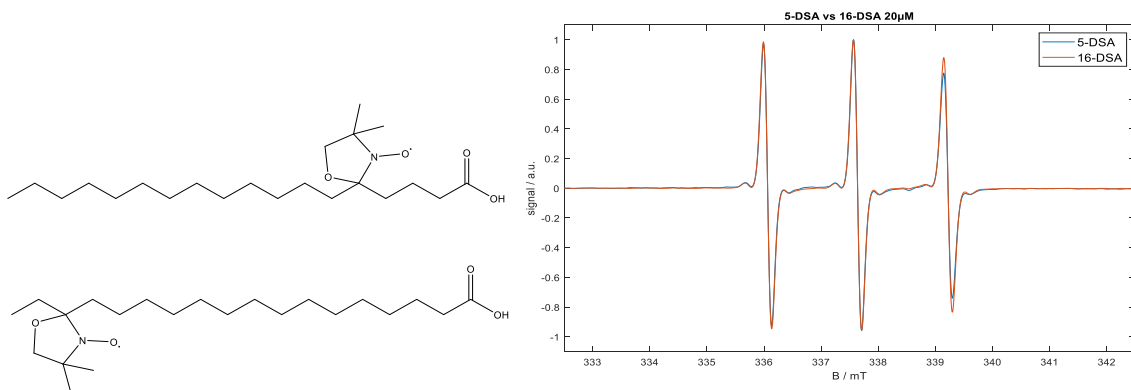


Abbildung 20 links Strukturformel von 5-DSA und 16-DSA; rechts: X-Band EPR Spektrum von reinem 5-DSA (blau), 16-DSA (rot)

Die cwEPR Spektren von isotrop, schnell rotierenden DSA-Molekülen zeigen die typischen Charakteristika von Nitroxid-Radikalen (NO_x- Radikalen) auf. Mit $I(^{14}\text{N})=1$ und Spin $s = \pm \frac{1}{2}$ ergibt sich ein Drei-Linien-Spektrum (Abbildung 20). Charakteristisch für die Spektren von DSA-Molekülen ist der leicht kleinere *high field* Peak. Dies begründet sich aus der Rotationshemmung senkrecht zu den aliphatischen Ketten. Die Rotation entlang der Kette, mit dieser als Rotationsachse, ist nur schwach gehemmt und verläuft relativ schnell. Senkrecht zur Kette orientierte Rotationsachsen zeigen aufgrund der Molekülsterik deutlich gehemmtere Rotationen.

3.2.2. Qualitative Analyse der *continuous wave* EPR Spektren

Für die Messung der Affinität des P2 Wildtyp und seiner Mutanten gegenüber 5-Doxylstearinsäure (5-DSA) und 16 DSA wurde ein cwEPR X-Band Spektrometer verwendet, die Kapillarraumtemperatur betrug während der Messung 37°C. Aus spektroskopischen Gründen wurde die Konzentration der Sonde (5/16-DSA) bei 20µM konstant gehalten und die Konzentration des Proteins wurde von 10 µM bis 200µM variiert. Das daraus resultierende Ligand-zu-Protein Verhältnis der Proben verändert sich somit schrittweise von 1 zu 0,5 auf 1 zu 10. Abbildung 21 und Abbildung 22 zeigen im Vergleich zu Abbildung 20 den Einfluss der Proteins auf die Rotationsdynamik der EPR-Sonde.

Das Spektrum aus Abbildung 20 zeigt ein für DSA-Moleküle typisches cwEPR Spektrum mit hoher Rotationsgeschwindigkeit und frei im Raum rotierenden EPR-Sonden in Lösung. Es besteht aus scharf abgegrenzten *Low-*, *Middle-* und *High-Field-Peak*. In Abbildung 21 und Abbildung 22 sind nun diese Sonden im jeweiligen Verhältnis zum P2 gemischt worden, wobei nun anteilig Spektren gebundener Sonde im gemessenen Gesamtspektrum zu erkennen sind.

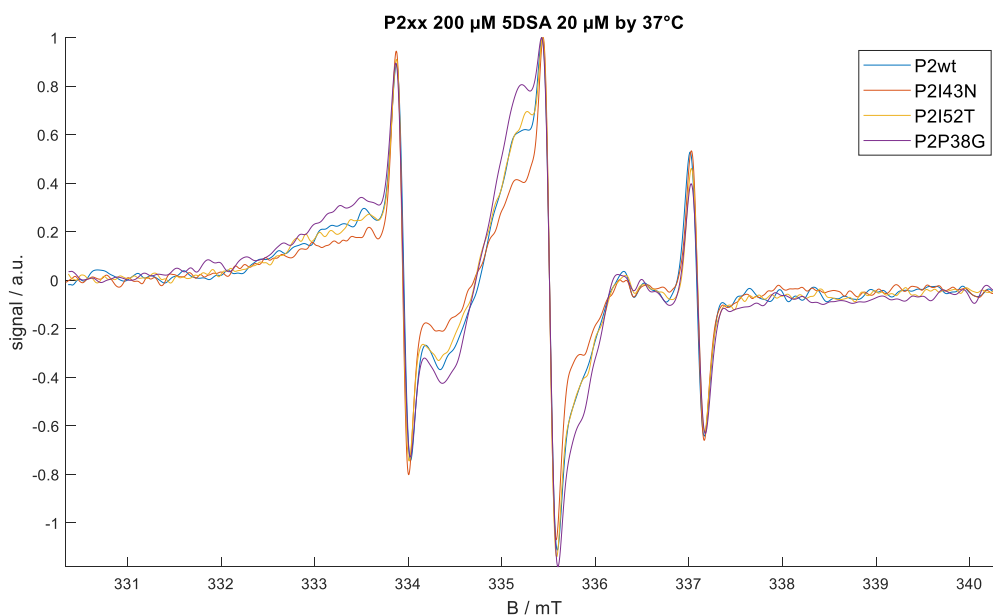


Abbildung 21 cwEPR Messung bei 37°C, X-Band Frequenzen P2-Varianten 200µM mit 5-DSA 20 µM

Dies kann anhand der nachweislich langsameren Rotation des 5-DSA-Moleküle, welche diese spektrale Komponente erzeugen, als gebunden interpretiert werden. Eine quantitative Analyse dieser Beobachtung und Interpretation wird im folgenden Kapitel gegeben.

Wie deutlich wird, nimmt der Beitrag der gebundenen Komponente mit steigender Proteinkonzentration – Abbildung 21 zu Abbildung 22 (folglich Ligand-Protein-Verhältnis) – zu.

Dieses Verhalten ist bei allen P2-Varianten, wenn auch unterschiedlich stark ausgeprägt, zu sehen. Die Annahme der langsamer rotierenden, gebundenen Komponente wird ebenfalls anhand der Linienverbreiterung des Spektrums deutlich. Sie kann, wie bei Reichenwaller¹²² beschrieben, als Indikator für eine Rotationsveränderung/Rotationshemmung der EPR-Sonde interpretiert werden.

Die DSA-Moleküle befinden sich an oder innerhalb der β -Fasstruktur und treten, wie oben beschrieben, unter anderem über Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Kräfte mit dem Protein in Interaktion. Dies reduziert die Rotationsdynamik der Sonden deutlich. Eine genauere Betrachtung des Bindungsmodus lässt sich über die Simulation der spektralen Komponenten erzielen. Die Aufteilung und die Art der Bindungsmodi werden im Folgenden beschrieben.

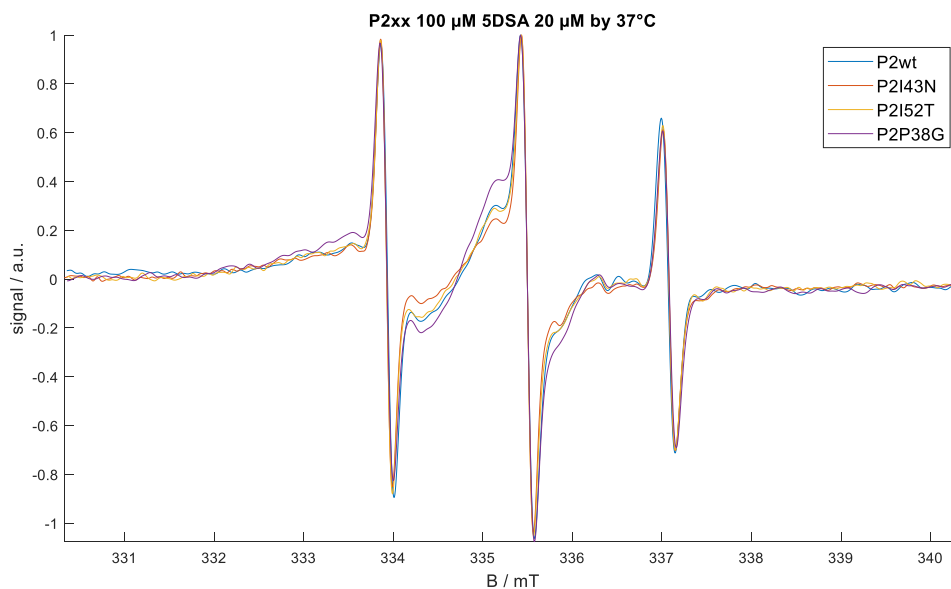


Abbildung 22 cwEPR Spektrum bei 37°C, X-Band Frequenzen P2-Varianten 200 μ M mit 5-DSA 20 μ M

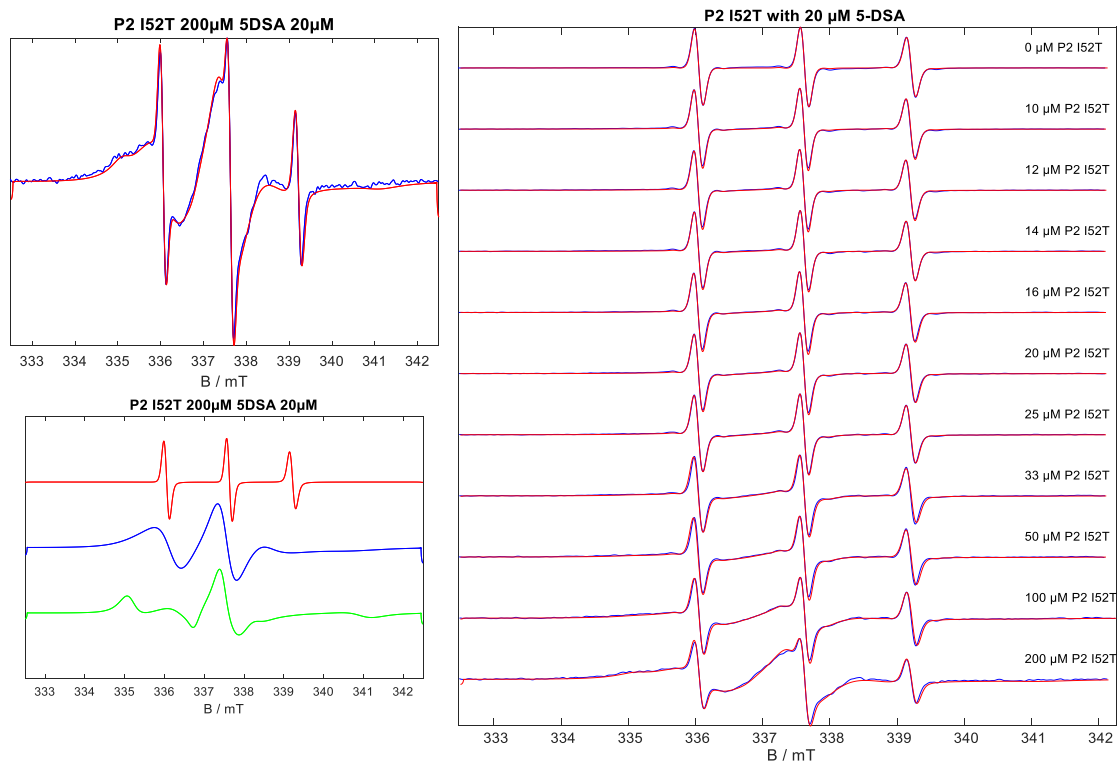
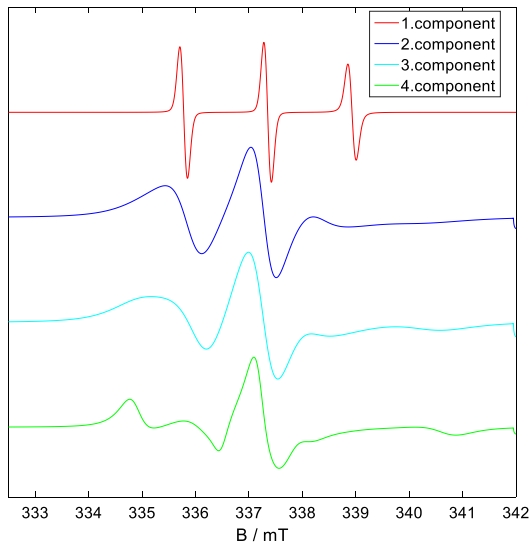


Abbildung 23 Simulationen der cwEPR-Messung (X-Band): oben links: Gegenüberstellung von Messung (blau) und Simulation (rot) bei 200 μM P2 I52T und 20 μM 5-DSA; links unten: Darstellung der spektralen Komponenten der Simulation, rot: freie Komponente, blau: intermediäre Komponente; grün: fest gebundene Komponente; rechts: Gegenüberstellung von Messung (blau) und Simulation (rot) P2 I52T Konzentrationsserie und 20 μM 5-DSA;

3.2.3. Quantitative Analyse der spektralen Bindungsmodi des P2

Um die Spektren quantitativ zu analysieren, wurden cwEPR-Simulationen unter Zuhilfenahme des Programmes Matlab samt der Easyspin-Toolbox durchgeführt. Diese ergeben, dass das Spektrum der am Protein gebundenen Sonde aus zwei bzw. drei sich überlagernden Spektralkomponenten besteht, welche mit unterschiedlichen Rotationskorrelationszeiten τ_c , A-Tensoren bzw. a_{iso} -Werten und Heisenberg-Austauschfrequenzen beschrieben werden kann. Im Folgenden wird kurz auf die Unterschiede der spektralen Komponenten eingegangen. Nach Reichenwallner¹²² wird angenommen, dass sich die Rotationsdynamik der EPR-aktiven Fettsäure bei Interaktion mit Proteinen indirekt proportional zur Stärke der intermolekularen Wechselwirkung zwischen der Fettsäure und dem Protein verhält. Daher repräsentieren die spektralen Komponenten die Bindungszustände der Fettsäuresonde. Höhere Rotationskorrelationszeiten signalisieren eine geringere Ligandendynamik und somit eine höhere Ligand-Protein-Interaktion. Die Spektralkomponenten in frei, intermediär

gebunden und stark gebundene Liganden interpretiert werden. Vergleichbares wurden bereits von Junk und Fournier^{122–124} durchgeführt.



	a_{iso}	τ_c [ns]	H [MHz]
Frei	44,25	0,12	0
Intermediär I	42,91	4,81	2,7
Intermediär II	42,91	4,18	4
Stark	42,00	17,26	0

Abbildung 24 Links Abbildung der spektralen simulierten Komponenten im X-Band Frequenzbereich, rot freie Komponente, blau intermediär I, türkis Intermediär II, grün stark gebundene Komponente; Rechts: Isotrope Hyperfeinkopplungskonstanten, Rotationskorrelationszeiten und Austauschfrequenzen der Komponenten.

Frei: beschreibt die freie Spektralkomponente, welche in diesem Fall die im Raum sich frei bewegenden 5- bzw. 16-DSA Moleküle sind. Diese Moleküle spüren kaum bis keinen Einfluss des Proteins und können sich somit isotrop und schnell rotieren (vgl. 5-DSA Spektren in Lösung, Abbildung 20).

Intermediär I: beschreibt die Spektralkomponente, bei der man von intermediär angebindenem (*attached*) 5-DSA sprechen kann.¹²⁵ Die 5-DSA Moleküle sind in direkter Wechselwirkung mit dem Protein, registrieren die geänderten räumlichen und hydrostatischen Eigenschaften. Es ist zu vermuten, dass diese Moleküle sich in der Portalregion des Proteins, nahe der α -helikalen Deckels, aufhalten.

Intermediär II: ist wie intermediär I eine spektrale Komponente der Moleküle in der Portalregion des Proteins mit ähnlicher Rotationsdynamik und Polarität. Allerdings liegen die Werte des Heisenberg-Effektes bei 4 MHz statt bei 2,7 MHz. Dies ist ein Hinweis auf eine veränderte Portalregion der P2. Ein höherer Heisenberg-Effekt beschreibt einen größeren Spin-Spin-Austausch, welcher nur zustande kommt, wenn die DSA Moleküle näher aneinander

liegen und sich die π -Orbitale der NO_x-Radikale überlappen können. Diese räumliche Nähe könnte durch eine verengte bzw. anders geformte Portalregion induziert werden.

Stark: Diese spektrale Komponente entsteht durch DSA-Moleküle, welche sich in starker, nicht-kovalenter Wechselwirkung mit dem Protein befinden, vermutlich im Inneren der Faszstruktur. Die Rotation ist deutlich verlangsamt gegenüber der intermediären und freien Spektralkomponente. Wie in Majava⁵ für Fettsäuren beschrieben ist das 5-DSA Molekül höchstwahrscheinlich in der Bindungstasche alleinig lokalisiert, wodurch kein Heisenberg-Effekt auftreten sollte. Der a_{iso} -Wert dient als Sensor für die Hydrophilie in der Umgebung der Sonde,^{10,19} (Kapitel: 2.1.1). Diese sind den Werten der intermediären Spektralkomponenten ähnlich. Dies spricht ebenfalls für eine Bindung am bzw. im Protein. Die Bindungstasche ist mit Wassermoleküle gefüllt^{5,126} wodurch die a_{iso} -Werte denen von 5-DSA im wässrigen Medium ähneln. Wasserfreie Bindungstaschen würden hier zu deutlich reduzierteren a_{iso} -Werten der DSA-Moleküle führen. Die Darstellung der Tensor-Werte und Grundlagen der Simulationen sind im Anhang ersichtlich. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zwar alle identifizierten Bindungsmodi prinzipiell in den untersuchten Varianten vorkommen, jedoch nicht in jedem System (Protein, Temperatur, Ligand-Protein-Verhältnis) gleichermaßen sichtbar sind. Dies kann auf Überlagerungseffekte oder konzentrationsabhängige Unterschiede zurückzuführen sein. Jedoch unterscheiden sich die P2-Varianten deutlich in Ihrer Affinität bzw. Ihrer Dynamik von intermediär zu stark gebunden.

Beispielsweise ist bei den P2 Varianten I52T und P38G bereits bei 37°C die stark gebundene Spektralkomponente sichtbar, während diese bei dem Wildtyp und der Variante I43N erst bei höheren Temperaturen (siehe Temperaturkapitel, Abbildung 25) erkennbar wird. Bei Wildtyp und I43N dominieren im Temperaturbereich von 37°C alleinig die freie und die intermediäre Spektralkomponente. Dies lässt sich als höhere Affinität des Variante I52T und P38G zur Fettsäure interpretieren. Im Abschnitt zur Bindungsenergie wird dieser Umstand aus energetischer Sicht deutlicher.

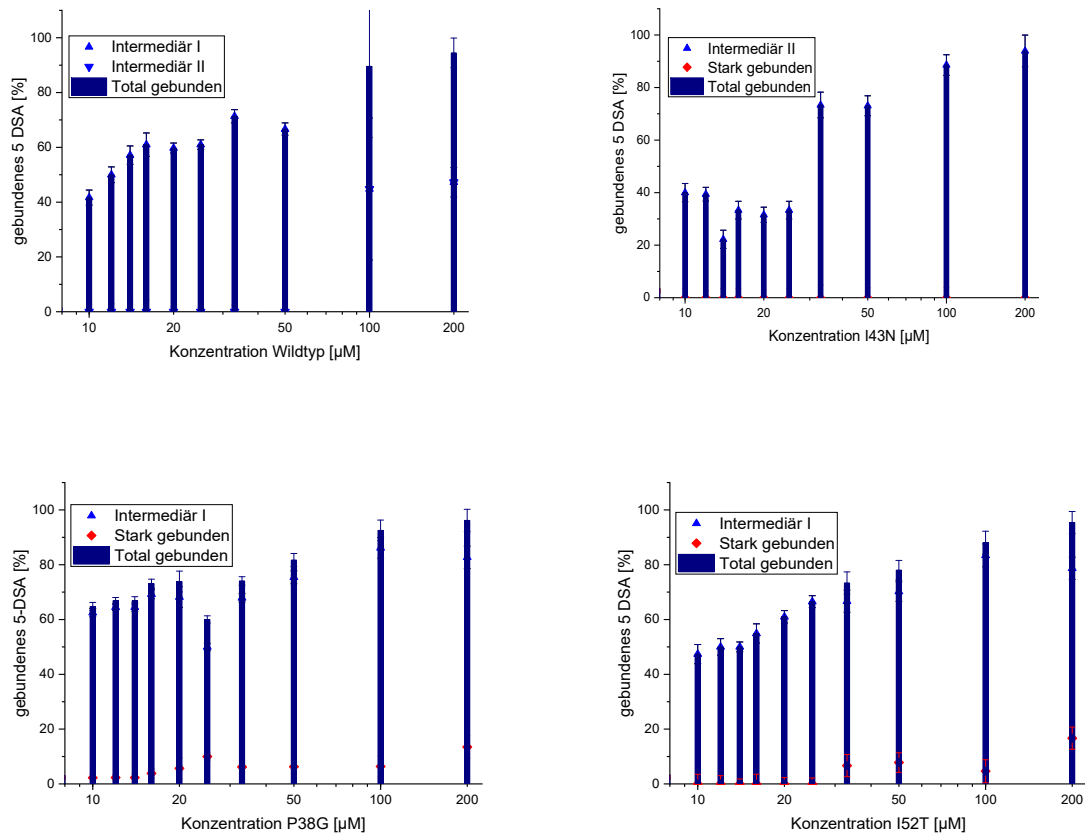


Abbildung 25 Darstellung der gebundenen spektralen Komponenten der P2 (Wildtyp und Varianten), blaue Dreiecke symbolisieren die intermediäre Komponente, rote Rauten die stark gebundene Spektralkomponente. Die schraffierten Flächen entsprechen der summierten Prozentwerte an gebundene- 5-DSA.

Die Abbildung 25 zeigt die Gewichtung der einzelnen Bindungsmodi und den Gesamtanteil an gebundenen DSA-Molekülen an. So hat der Wildtyp keine messbare stark gebundene Spektralkomponente, jedoch zwei Intermediäre; Intermediär I und Intermediär II. Intermediär II ist erst ab einer Ligandenkonzentration von 100 μM zu simulieren, dies entspricht einem Protein/Ligand-Verhältnis von 1 zu 5. Eine stark gebundene Komponente ist bei 37 $^{\circ}\text{C}$ nicht auszuschließen, detektierbar ist sie jedoch erst ab einer Temperatur von 60 $^{\circ}\text{C}$ (siehe Temperaturkapitel Kap.3.2.4.). Es ist durchaus möglich, dass die Wechsel des Bindungsmodus zwischen stark und intermediär gebundenem Zustand schneller ablaufen, als es mithilfe des verwendeten X-Band-EPR-Spektrometers zeitaufgelöst detektierbar ist. Es kann angenommen werden, dass der Wildtyp die physiologische Konformation und Ligandenaffinität widerspiegelt.

I43N hat ebenfalls wie der Wildtyp keine stark gebundene Spektralkomponente, jedoch ist bei 37°C ausschließlich die Intermediäre-Spektralkomponente II erkenntlich. Dies deutet auf eine veränderte Portalregion hin, welche die 5-DSA-Molekül beim Durchtritt näher an einander bringt. Diese Nähe spiegelt sich in einem messbaren und simulierbaren höheren Heisenberg-Effekt wieder.

Die P2 Varianten I52T und P38G zeigen bereits bei geringen Ligandenkonzentrationen (I52T ab 20µM; P38G 10µM) eine stark gebundene Komponente, dies ist ein Hinweis auf eine bereits hohe Affinität zum Liganden bei physiologischen Temperaturen.

Um ein vollständigeres und energetisches Bild über die Bindungseigenschaften von P2 mit 5/16-DSA-Molekül zu erhalten, werden folgend die Dissoziationskonstanten K_D und die freiwerdenden Gibbs-Energien ΔG der Bindungsprozesse genauer analysiert, welche aus den zuvor simulierten Komponentenanteilen berechnet wurden.

Tabelle 1 Darstellung der Bindungsenergien des P2 und Varianten; *keine stark gebundene Komponente, hier Wechsel von Intermediär I zu Intermediär II; $K_{D,T}(\text{fit})$ Werte aus Hill-Fits siehe Anhang; ΔG_{F-T} freie Gibbs-Energie von Frei zu Totalgebunden, ΔG_{F-S} freie Gibbs-Energie von Frei zu Starkgebunden, ΔG_{F-I} freie Gibbs-Energie von Frei zu Intermediär gebunden, ΔG_{I-S} freie Gibbs-Energie von Intermediär zu Starkgebunden, F = freie Komponente, I = Intermediär, S = Stark gebunden, T = Total gebunden (T = S + I); 20/50/100 µM Konzentration des Liganden;¹²⁵

K_D and ΔG	wt		I43N		I52T		P38G	
Ligand	5-DSA	16-DSA	5-DSA	16-DSA	5-DSA	16-DSA	5-DSA	16-DSA
$K_{D,T,50}(\text{fit})$	11,87	23,30	16,60	57,91	12,78	50,02	1,51	7,36
$K'_{D,T,75}(\text{fit})$	60,10	64,79	46,68	100,05	39,67	118,94	38,67	50,05
$K_{D,T,20\mu\text{M}}$	5,42	-	29,64	-	4,99	-	1,84	-
$K_{D,T,50\mu\text{M}}$	18,33	16,07	14,04	59,67	16,82	40	7,53	11,67
$K_{D,T,100\mu\text{M}}$	9,58	16,67	10,61	28,33	11,19	35,78	6,58	15,10
$\Delta G_{F-T,100\mu\text{M}}$	-29,80	-28,36	-29,53	-27,00	-29,39	-26,40	-30,77	-28,62
$\Delta G_{F-S,100\mu\text{M}}$	-	-	-	-	-15,95	-	-16,82	-
$\Delta G_{F-I,100\mu\text{M}}$	23,25*	-	-	-	-	-	-	-
	-	-28,36	-29,53	-27,00	-28,24	-26,40	-28,71	-28,62
$\Delta G_{I-S,100\mu\text{M}}$	0*	-	-	-	7,45	-	6,7	-

Die Rangfolge der Bindungsaffinität anhand der berechneten $K_{D,T,100\mu\text{M},5\text{-DSA}}$ zeigt P38G > Wildtyp > I43N > I52T. Diese deckt sich mit dem exergonischen Energietransfer des ΔG bei

Bindung des 5/16 DSA an die Proteine. Wie bereits dargestellt hat P38G hier den größten Anteil an stark gebundene Spektralkomponente und den höheren Anteil an gesamtem gebundenen Liganden. Daraus kann für P38G die stärkste Gesamtaffinität zum DSA abgeleitet werden. In dieser Untersuchung wurde die Thermodynamik zwischen den Bindungszuständen betrachtet. Die Bindung von Frei zu Intermediär scheint stark exergonischen Charakter zu haben und hat einen erheblichen Anteil an der Gesamtbindungsenergie. Diese ist ebenfalls exergonisch, jedoch bei höheren Protein-Ligand-Verhältnissen weniger ausgeprägt. Die Summe der Bindungsübergänge von Frei zu Total gebunden zeigt folglich niedrigere ΔG -Werte. Der Übergang I-S liegt energetisch am Rand zwischen exergonisch und endergonisch und ist bei 37 °C für die gewählten Konzentrationen als endergonisch zu betrachten. Somit ist der Übergang von der intermediären Bindung zur stark gebunden Bindung bei Körpertemperatur thermodynamisch nicht begünstigt und sollte nicht spontan erfolgen. Jedoch wäre der Übergang S-I exergonisch. Diese Beobachtung unterstreicht die angenommene Rolle des intermediär gebundenen 5/16 DSA, welches möglicherweise einen aktiven Übergangszustand widerspiegelt. Der Übergang vom stark gebundenen zum intermediären Zustand kann dadurch als „Aktivierung“ des Liganden-Komplexes beschrieben werden.¹²⁵ Daher wäre eine niedrigere Energiebarriere bei optimaler Arbeitstemperatur des Proteins als möglich zu erachten.

3.2.4. Temperaturreihe

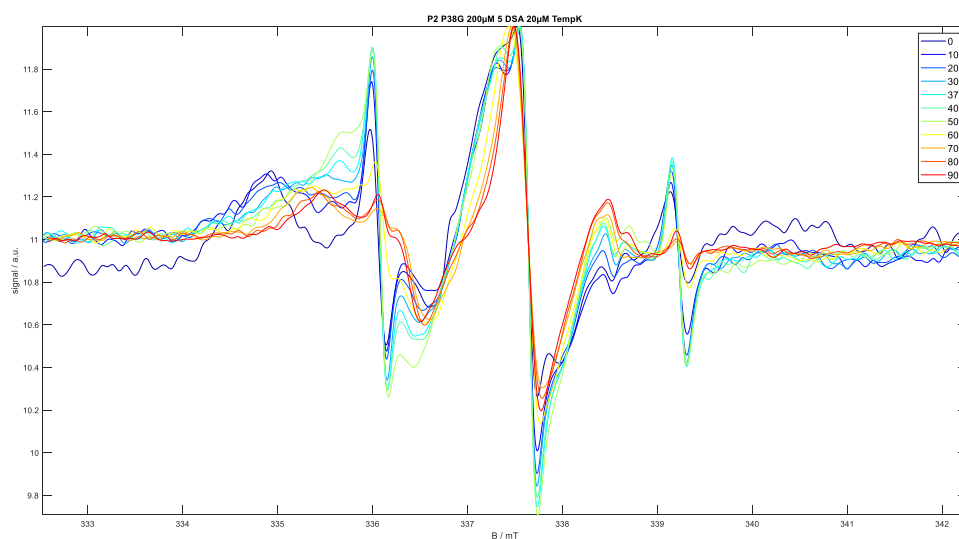


Abbildung 26 X-Band cwEPR Messung im Temperaturbereich von 0°C bis 90°C, dargestellt in 10 K Abstand von P38G 200µM und 5-DSA 20µM;

Die im vorherigen Kapitel analysierten cwEPR-Spektren bei 37°C zeigten das Verhalten der Protein/Ligand-Systeme im physiologischen Temperaturbereich des menschlichen Organismus. Im folgenden Kapitel wird die Betrachtung durch Messungen in einem Temperaturbereich von 0 °C bis 90 °C erweitert. Untersuchungen des Bindungsverhaltens und der Interaktionsdynamik abseits der physiologischen Temperatur können weitere Informationen über die Thermodynamik der Bindungsprozesse geben. Die Bindung von Fettsäuren unterliegt einer starken Temperaturabhängigkeit, wie es in Abbildung 26, in der Temperaturreihe der Variante P38G und 5-DSA zu sehen ist. Die weiteren Temperaturreihen und Temperaturreihensimulationen der verschiedenen Systeme sind im Anhang dargestellt. Die Simulationen und die daraus abgeleiteten Bindungskurven in Abbildung 27 liefern ein vollständigeres Bild über die Ligandenbindung von 0 °C bis 90 °C. Die Temperaturreihen wurden in der Messserie zwar bei -15 °C begonnen, jedoch zeigte sich abgesehen von der Liganden- „Remobilisierung“ im Zuge des Auftauprozesses, keine signifikante Differenzierung zwischen den P2 Varianten. Ab einer Temperatur von 5 °C, mit vollständig aufgetauten Komponenten differenzieren sich die Varianten (Abbildung 27). So ist die stark gebundene Komponente in I52T erst circa 30 °C erkenntlich, wohingegen P38G bereits bei 37 °C eine deutliche Ausprägung der stark gebundenen Spektralkomponente aufweist.

Ebenfalls zeigt es sich in den Messungen der P2-Varianten, dass es bei einer bestimmten Temperatur zu einem Wechsel des dominierenden Bindungsmodus kommt, bei 60 °C für P38G und bei 50 °C für I43N und I52T. Es kann dort zu einer Denaturierung der Proteine kommen oder zu einer Dimerisierung der DSA-Sonde. Messung bei 37 °C nach Abschluss der Temperaturreihe, zeigen kein messbares Signal mehr auf, dass davon auszugehen ist, dass spätestens bei 90°C die Proteine samt Liganden vollständig denaturiert sind.

Die Temperaturanalyse zeigt deutlich, dass die P2-Varianten unterschiedliche Bindungsverhalten in Abhängigkeit von Temperatur und Konzentration aufweisen. Zudem wird ersichtlich, dass das Bindungsoptimum offenbar an die physiologische Körpertemperatur (37 °C) angepasst ist. Insbesondere beim Wildtyp sind die Bindungen – wie in Tabelle 1 dargestellt – zwar energetisch negative Werte, jedoch nur moderat ausgeprägt, während der dominante Bindungsmodus intermediär bleibt. Dies unterstützt die Annahme, dass im Wildtyp bei 37 °C die Bindung zwischen Protein und Ligand stark genug ist, um eine Fixierung des Liganden zu gewährleisten, gleichzeitig jedoch schwach genug, um eine kontrollierte Freisetzung am Zielkompartiment zu ermöglichen.

Im Gegensatz dazu zeigen die Varianten P38G und I52T bei erhöhten Temperaturen einen erhöhten Anteil stark gebundener spektraler Komponenten. Wie bereits in den Messungen bei 37 °C beobachtet, weisen diese P2-Varianten eine stärkere – möglicherweise zu starke – Ligandenbindung auf, was die dynamische Übergabe an zelluläre Zielorte potenziell beeinträchtigen könnte.

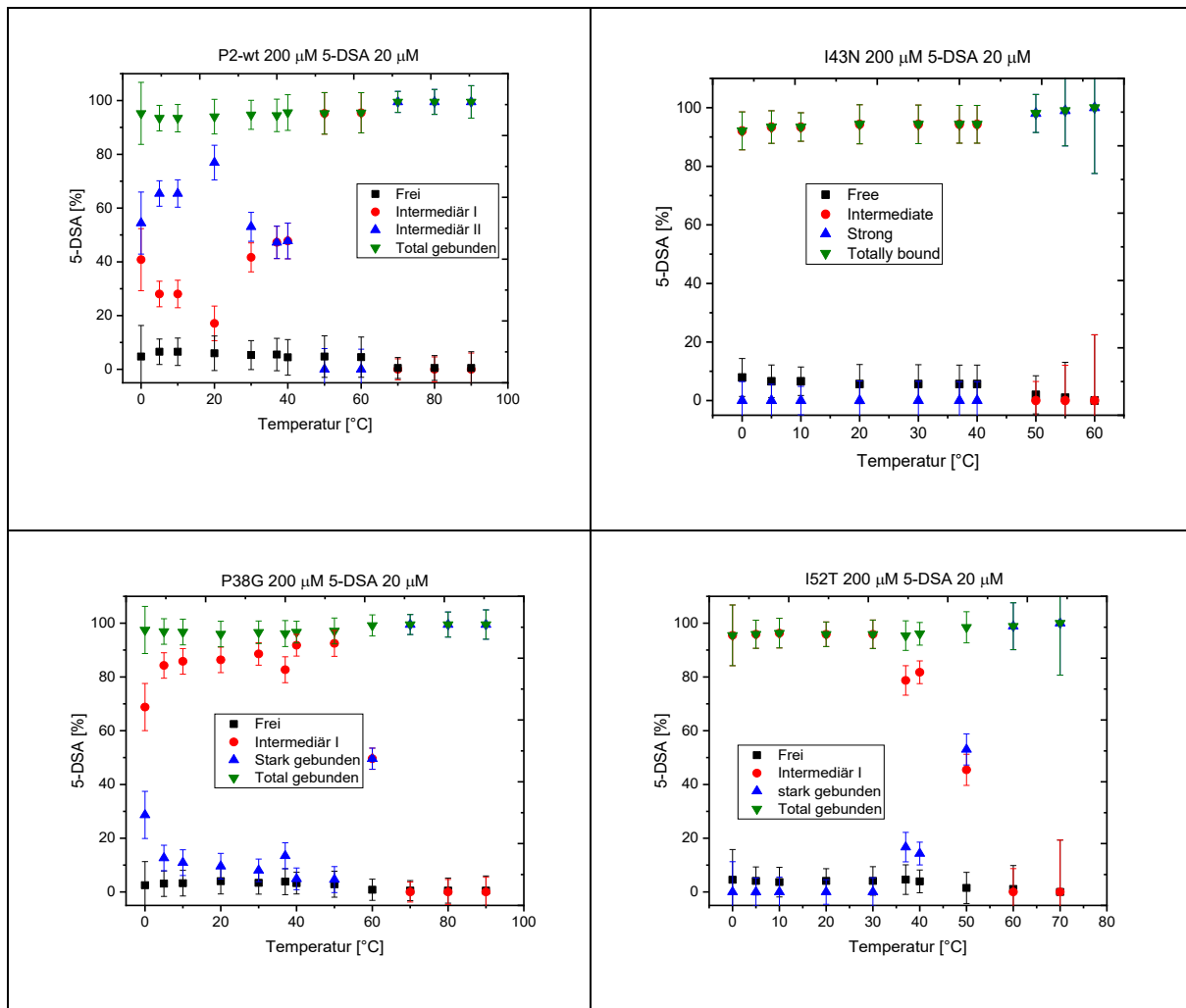


Abbildung 27 Bindungskurven der Temperaturreihen von P2; Darstellung der spektralen Komponenten aus den cwEPR-Simulationen von 0°C bis 90°C; P2 Variante je 200 µM, 5-DSA je 20µM; Signalverlust der EPR-Sonde Wildtyp: 90 °C; I43N: 60°C; I52T: 70 °C; P38G: 90 °C

3.2.5. Interpretation der EPR-Ergebnisse in Korrelation zur Mutation des P2

P2 Wildtyp

Der Wildtyp zeigt hier die physiologischen Normalvariante auf, welche die Auswertung der Daten der simulierten Spektren mittels Hill-Plots ergab: Für den angefitteten K_{d50} -Wert_(fit) wurden hierbei 11,87 µM ermittelt. Der Wildtyp besitzt keine stark gebundene

Spektralkomponente bei 37 °C, auch abseits der physiologischen Temperatur von 37 °C ist bei dem Wildtyp, anders als bei den Varianten, keine stark gebundene Spektralkomponente simulierbar. Erst bei höheren Protein-Ligand Verhältnissen (ab 100 μM zu 20 μM) ist die zweite Intermediäre Spektralkomponente die Intermediär II erkennbar, die auch bei Temperaturen abseits der physiologischen erkennbar bleibt. Diese gleicht der Hauptspezies der I43N-Variation. Dies könnte ein Hinweis auf eine veränderte Portalregion sein, die die Liganden zu einer größeren Nähe zu einander zwingt. Das Auftreten der alleinigen Intermediären Spektralkomponente bei 37 °C und die im Mittelbereich des Vergleichs liegenden K_d - und Bindungsenergiewerte weisen auf die physiologische Funktion des P2 hin. Die Fettsäuren bei 37 °C sind intermediär gebunden und die Bindung ist grundsätzlich exergonisch, jedoch bei mittleren Bindungsenergiewerten. Dies stützt die Aussage der Transportfunktion der Proteine, hierbei ist eine ausreichende Bindung der Fettsäure den Transport essenziell, während eine Freisetzung des Liganden am Zielkompartiment dennoch möglich bleibt.

I43N

Die I43N-Variation weist eine Punktmutation in Position 43 der Aminosäuresequenz auf, wobei ein Isoleucin gegen ein Asparagin ausgetauscht wurde. Die Mutation ist in der gefalteten Struktur im Bereich des β -Faltblattfasses lokalisiert. Dabei ist die Seitenkette der ausgetauschten Aminosäure Asparagin zur äußeren Lösungsmittelphase hin orientiert und ist vermutlich nicht direkt an Interaktionen im Zuge der Ligandenbindung beteiligt.^{39,101,127} Sowohl die K_{d50} -Werte als auch die Bindungsenergien liegen im gleichen Bereich wie beim Wildtyp bei 5-DSA als auch bei 16-DSA. Ebenfalls gibt es bei den 37 °C Messungen innerhalb der Konzentrationsreihe keine erkennbare stark gebundene Spektralkomponente. Jedoch ergeben sich zwei deutliche Unterschiede, so ist bei I43N nur die Spektralkomponente Intermediäre II zu simulieren, was auf eine veränderte Portalregion hindeutet. Diese veränderte Portalregion könnte bereits bei 37 °C die Liganden in eine größere Nähe bringen, diese zeigt sich mit höheren Heisenberg-Austauschfrequenzen als auch einer eingeschränkteren Rotationsdynamik. Dieser Effekt zeigt sich, anders als im Wildtyp, bereits bei niedrigeren Protein-Ligand-Verhältnissen. Ebenfalls ist Die Zunahme an total gebundenen Molekülen beim I43N gegenüber dem Wildtyp differenziert. Bei hohen Protein-Ligand-Verhältnissen ist der Wert an total gebundenen Liganden beider Proteine vergleichbar, bei niedriger Protein-Ligand-Verhältnissen (25 μM zu 20 μM) sind bei I43N nur 33 % DSA gebunden (vgl. Wildtyp 60 %), ab einem Verhältnis von 33/20 nähern sich die Werte auf 73 % (I43N) zu

71 % (Wildtyp) an. Der numerische K_d -Wert bei $20\mu\text{M}$ ist mit $29,64\ \mu\text{M}$ ebenfalls deutlich höher beim Wildtyp mit $5,42\ \mu\text{M}$. Dies zeigt bei I43N eine verringerte Ligandenaffinität bei niedrigeren Protein-Ligand-Verhältnissen auf. Dies kann sich hier die erste Ursache für das pathologische Krankheitsbild sein. Ein weiterer Unterschied bildete das Verhalten außerhalb der physiologischen Temperatur von 37°C ab, so ist bei der Variation I43N ab einer Temperatur von 50°C die stark gebundene Komponente stark ausgeprägt, während die intermediäre Spektralkomponente auf fast 0% absinkt. Möglicherweise kommt es bei dieser Temperatur zur Denaturierung des Proteins und damit zu einer Aggregatbildung o.ä. die zu reduzierter Rotationskorrelationszeit, trotz erhöhter Temperatur, führt.

I52T

Die Variation I52T trägt die Punktmutation an Position 52, bei der eine Austausch von Isoleucin gegen Threonin vorgenommen wurde. Diese Mutation ist wie beim I43N in der β -Faltblattregion lokalisiert und ist ebenfalls nicht direkt an den Wechselwirkungen mit dem Liganden beteiligt.^{39,101,127} Die K_{d50} Werte bei 5-DNA mit der I52T-Mutante sind vergleichbar zu den Werten bei I43N und beim Wildtyp zu sehen, auch die Bindungsenergie ist auf einem vergleichbaren Wert. Die K_d -Werte bei 16-DNA sind jedoch deutlich höher was mit einer niedrigeren Bindungsaffinität einhergeht. In den Simulationen der 5-DNA-Radikalsonde zeigt sich, dass I52T bereits bei geringen Proteinkonzentrationen eine stark gebundene Spektralkomponente aufzeigt. I52T bindet somit den Liganden „fester“ als der Wildtyp. Da die 16-DNA Simulationen bei 37°C keine stark gebundene Spektralkomponente ergaben, können diese Messungen keine weiteren Erkenntnisse liefern. Bei den Messungen mit 5-DNA außerhalb der physiologischen Temperatur zeigt sich bei den Temperaturen um 50°C eine Umkehrung der dominieren spektralen Komponente. Bei den Temperaturen unterhalb von 50°C dominiert die intermediäre Komponente, den höheren Temperaturen die stark gebundene.

P38G

Die Variation P38G trägt die Punktmutation an Position 38, bei der ein Austausch des Prolins gegen ein Glycin vorgenommen wurde. In der gefalteten Proteinstruktur lokalisiert sich die Mutation in einer rigiden, ungefalteten Region zwischen β -Faltblattfasc und dem α -helikalen Deckel des P2. Daher war ursprünglich nicht davon auszugehen, dass ein messbarer Einfluss

der Punktmutation auf das Bindungsverhalten zu sehen wäre. Jedoch zeigt sich deutlich, dass P38G (siehe Abbildung 25) schon bei geringen Protein-Ligand Verhältnissen eine stark gebundene Spektralkomponente ausbildet und wie in Tabelle 1 dargestellt, den kleinsten K_d -Wert im Variantenvergleich aufweist. Dies deutet auf eine deutlich höhere Affinität zum Liganden 5/16DSA hin und darauf, dass die Liganden stärker im aktiven Zentrum gebunden sind.

Die Mutation ist vergleichbar mit der FABP1-Isoform, hier ist ebenfalls die rigide Region um die Position 38 different, wodurch es zu einer veränderten Positionierung der Anionenbindungsstelle kommt.^{39,101,113} P38G vermag zwar nicht mehrere Liganden wie FABP1 zu binden – was sich in deutlich erhöhten Heisenberg-Austauschfrequenzen aufzeigen würde, dennoch hat P38G eine hohe Affinität zum Liganden.

Dies würde ebenfalls eine Begründung für eine pathogene Auswirkung dieser Variante sprechen. P38G kann durch seine hohe Affinität und die im Vergleich negativeren ΔG -Werte in der stark gebundenen Komponente, den Liganden möglicherweise nicht effizient am Zielort abgeben. Denkt man diese Argumentation weiter und geht davon aus, dass die Freigabe des Liganden am Zielort nur einen weniger negativen ΔG Wert aufweist als die Bindungsenergie. So ist, hypothetisch betrachtet, P38G aus theoretischer energetischer Betrachtung nicht in der Lage den Liganden am Zielort zu entladen.

3.2.6. Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend haben die Untersuchungen das Modell des Fettsäure-Bindungsmechanismus von P2 als Vertreter der FAPBs weiter verfeinert. Interessant ist hier u.a. das Zusammenspiel der Bindungsmodi, deren Anteil an der gesamten Komposition und die Bindungsenergie zwischen Protein und Ligand. Es zeigte sich, dass bereits Punktmutationen von Aminosäuren, welche nach jetzigem Wissensstand nicht direkt an der Bindung von Fettsäuren beteiligt sind, einen deutlichen Einfluss auf den Mechanismus und die Affinität der Bindung haben können. So konnten drei Bindungsmodi simuliert und sinnvoll im Zusammenhang des angenommenen Bindungsmechanismus interpretiert werden. Für das weitere Verständnis sind Folgeexperimente nötig. Hierbei wären *in silico*-Untersuchungen z.B. *Docking*-Experimente und MD-Simulationen hilfreich. Unter zu Hilfenahme der EPR-Daten

könnten die Bindungsmodi genauer analysiert werden, ebenfalls würden Bindungsexperimente an bereits an die Membran assoziierten P2 einen weiteren Einblick auf die natürliche Bindungscharakteristik eines membranassoziierten Transportproteins geben. Die nun vorhandenen EPR-Daten geben einen Hinweis auf das Platzangebot und die Hydrophilie in der Portalregion und in der Bindungstasche der P2 bei physiologischer Temperatur und in Pufferlösung. Zusammen mit den bisherigen Simulationsdaten¹⁰¹ und Ergebnissen der Cryo-EM³⁹ ergibt sich nun ein vollständigeres Bild der Fettsäurebindung durch P2.

3.3. Messungen an der myelinartigen Monoschicht

3.3.1. Einführung

Die Frage des Zusammenhangs zwischen Variation des P2 und dessen Auswirkungen auf das Myelin kann neben der Frage des Fettsäuretransportes auch als Frage der Membranaffinität zum Myelin betrachtet werden.

Diese Frage der Membranaffinität von komplexen Membranen soll nun im Folgenden durch drei Betrachtungsweisen untersucht werden. i) Der maximale Insertionsdruck (MIP, *maximum insertion pressure*) – der eine Aussage über die Membranaffinität des Proteins gegenüber der Monoschicht gibt. ii) Die Synergie, die eine Aussage über die positive Wechselwirkung oder Abstoßung der Lipide zum Protein gibt und schließlich iii) die Epifluoreszenzmikroskopie, die als Bildserie eine Aussage über die laterale Organisation der Lipidmonoschicht unter Einflussnahme der P2 aufzeigt.

Um die Myelinmembran (zytoplasmatische Seite des menschlichen PNS-Myelins) zu rekonstruieren (siehe Abbildung 28) wurde die von Inouye & Kirschner¹²⁸ beschriebene Lipidmischung verwendet, ch:PE:PS:PC:SM:PI – 37:22:19:9:9:4. Die zytoplasmatische Umgebung wurde mit dem HEPES/NaCl-Puffer (10 mM/150 mM) modelliert.¹⁰⁴ Die Kombination aus Puffer und Lipidmix sollte die endogene Lokalisierung des Proteins reproduzieren. Zumindest ist dies der beste Weg, um Lipidmonoschichten als Modell der „Realität“ im Myelin nahezubringen

Es ist bekannt und in der Einführung beschreiben, dass P2 generell zwei mögliche Bindungsstellen für die Interaktion mit der Membran besitzt. i) die Spitze der α -helikale Deckelregion und ii) die Regionen am Loop β 5 und β 6 befindlich Membranbindungsstellen (siehe Kapitel 3.1.2).

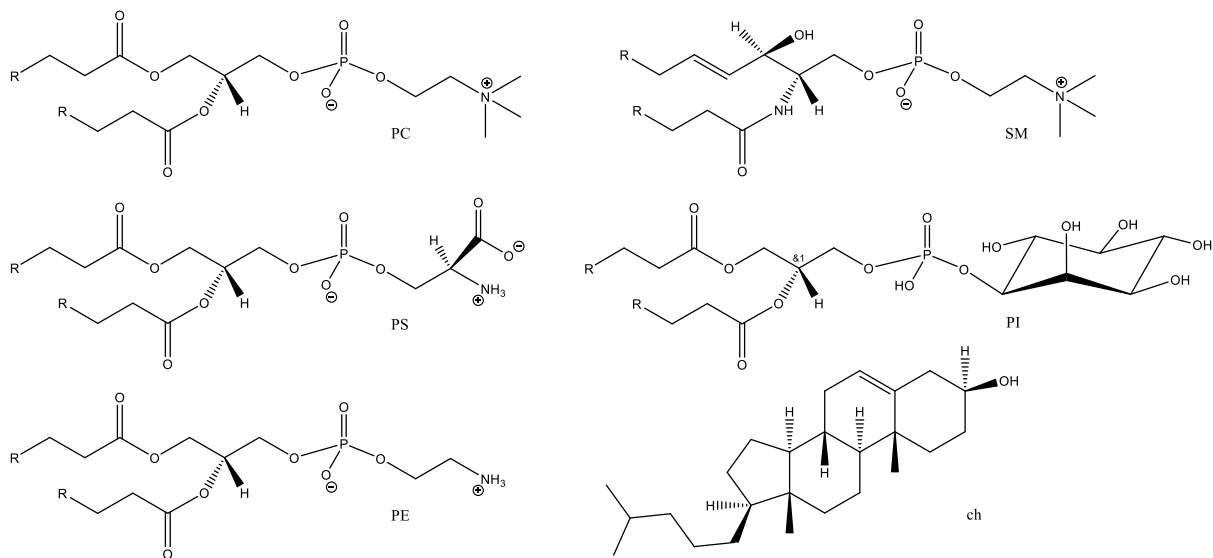


Abbildung 28 Chemische Strukturen der typischen menschlichen PNS-Membranlipide: Schweinehirn L- α -Phosphatidylcholin (PC), Schweinehirn L- α -Phosphatidylserin (PS), Schweinehirn L- α -Phosphatidylethanolamin (PE), Schweinehirn-Sphingomyelin (SM), Rinderleber L- α -Phosphatidylinositol (PI) und Schafswollcholesterin (ch); R steht für einer Lipidkette variabler Zusammensetzung. Es handelt sich um natürliche Lipide in einer Mischung mit einer durchschnittlichen Fettsäureverteilung.

3.3.2. Maximaler Insertionsdruck / *Maximum Insertion Pressure* (MIP)

Um die Interaktion zwischen P2 und dem zytoplasmatischen Myelinseite des PNS zu untersuchen, wurden Monoschichtexperimente an Pockels-Langmuir-Filmwaagen durchgeführt.^{64,129} Der MIP beschreibt den maximalen Oberflächendruck π_{INI} , an dem das Protein in die Monoschichtmembran oder auf die Oberfläche eingebaut oder adsorbiert werden kann.

$$\Delta\pi = \pi_{END} - \pi_{INI} \quad 16$$

Die Änderung der Oberflächenspannung ($\Delta\pi$, Gleichung 16) als Funktion von π_{INI} zeigt die lineare Beziehung $\Delta\pi(\pi_{ini}) = a + b \cdot \pi_{ini}$. Der MIP kann somit mit $MIP = -a/b$ berechnet werden, was sich aus der Definition von MIP ergibt: $\Delta\pi(\pi_{ini}) = 0 \text{ mN m}^{-1}$. Daher kann bei $\Delta\pi = 0$, d. h. dem Schnittpunkt zwischen der Regressionsgeraden und der Abszisse, der MIP für lipidhaltige Oberflächen abgelesen werden (z.B. in Abbildung 29 die Werte von P38G, alle weiteren Druckkurven und abgeleiteten Diagramme sind im Anhang dargestellt).

Proteine oder Peptide mit einer hohen Affinität zur Lipidmembran haben im Allgemeinen einen MIP von mindestens 30 mN/m, ein Wert, der üblicherweise als Monolayer-Bilayer-Äquivalenzdruck bezeichnet wird. Das *bovine myelin basic protein* (bMBP) hat beispielsweise

einen MIP von 42 mN/m.¹³⁰ Die Tabelle 2 fasst die MIPs und Synergien der P2-Varianten zusammen. Der Wildtyp hat mit einem MIP von ~ 31 mN/m den höchsten Wert der untersuchten Varianten und wird daher als membranaffiner als die drei anderen in dieser Studie getesteten Varianten angesehen. SPR-Studien (Oberflächenplasmonenresonanz) an immobilisierten, vereinfachten PC:PG-Membranmodellen zeigten das der Wildtyp im Vergleich zu anderen Varianten die schnellste und vollständigste Bindung an die Membranen hat, was sich in der hier gefundenen MIP-Reihenfolge widerspiegeln könnte.¹²⁷ Innerhalb der Varianten hat das P38G die geringste Membranaffinität¹³¹ gegenüber dem nativen Myelin-Membranmodell (MIP 28,5 mN/m). Bei P38G wurde das starre Prolin durch ein flexibles Glycin an einem strukturellen Gelenksegment ersetzt, das möglicherweise für die Konformationsanpassung bei der Membranbindung erforderlich ist (siehe 3.1.2).^{39,131,132} Zwar würde diese höhere Flexibilität für eine bessere Bindung an die Membran sprechen, zeigen die Ergebnisse eine schlechtere Membranaffinität

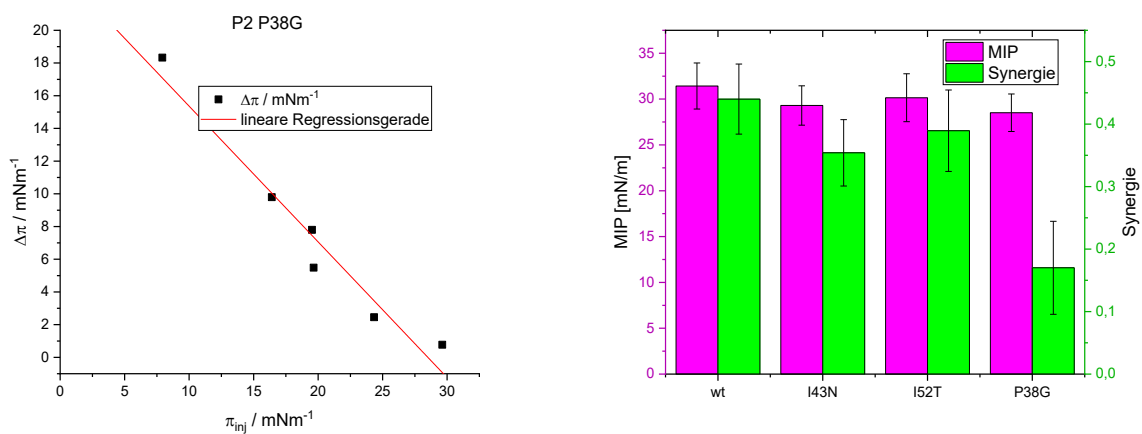


Abbildung 29 lineare Regression der Werte aus den Oberflächenadsorptionsmessungen; P38G 200 nM, bei verschiedenen initialen Oberflächendrücken.

Tabelle 2 Werte der MIP (lipidhaltige Oberfläche) und Synergie Werte des P2 und seiner Mutanten. In Klammern sind die Konfidenzintervalle (CI) angegeben

P2	WT	I43N	I52T	P38G
MIP (mN/m)	31,42 (±1,64)	29,30 (±1,20)	30,14 (±1,78)	28,50 (±1,09)
Synergie	0,44 (±0,06)	0,36 (±0,053)	0,39 (±0,07)	0,18 (±0,07)

3.3.3. Synergie

Die Synergie ist ein weiterer Indikator für die Aktivität der Protein-Oberflächen/Lipid-Grenzflächen, die aus der linearen Regression der Messungen des Langmuir-Adsorptionsfilmwaage gewonnen werden kann. Sie wird aus der Steigung der Regressionsgeraden ($\Delta\pi(\pi_{ini}) = a + b \cdot \pi_{ini}$) (Abbildung 29) abgeleitet und beschreibt die Wechselwirkungsintensität zwischen den Lipiden der Monoschicht und dem Protein.

$$synergy = b + 1 \quad 17$$

Eine positive Synergie deutet auf eine attraktive Wechselwirkung hin, während eine negative Synergie auf eine Abstoßung zwischen der Lipid-Monoschicht und dem Protein hinweist.¹³³

Wie zu erwarten, weist die Synergie zwischen den Lipiden und dem Wildtyp-Protein den höchsten Wert auf. Die CMT-Varianten I43N und I52T haben nur geringfügig niedrigere Synergiewerte, was zeigt, dass die Mutation zwar zu einer Affinitätsänderung führt, diese jedoch nur minimal ist und höchstens geringfügig über den Fehlermargen der Messung liegt (Synergien liegen alle bei etwa 0,40). Der Synergiewert für P38G ist mit 0,18 deutlich niedriger. Obwohl man immer noch von Synergie sprechen kann, ist dieser positive Effekt sehr gering. Die P38G-Mutation liegt zwischen dem α -Helix- „Deckel“ und dem β -Fass. Prolin und Glycin sind weder ionische noch sehr lipophile Aminosäuren, sodass ein Lipophilieeffekt als Erklärung ausgeschlossen werden könnte. Prolin ist deutlich starrer als Glycin, und daher wirkt sich die Mutation höchstwahrscheinlich auf die funktionelle Dynamik von P2 aus, wie bereits zuvor festgestellt wurde.^{39,131,132} In einer früheren Studie wurde in vitro eine erhöhte Lipidmembran-Stapelkapazität von P38G sowie eine erhöhte Dynamik einzelner P38G-Proteine, insbesondere

auf der 1-nm-Skala (durch elastische inkohärente Neutronenstreuung, EINS), ermittelt.¹³¹ Da die Synergie bei der P38G-Variante viel näher an Null liegt, ist die Bindung an die Monoschichten deutlich weniger bevorzugt. Ob das bessere Stapelverhalten der Lipiddoppelschicht mit der erhöhten Dynamik der α -helikalen Deckelregion zusammenhängt, die z. B. die laterale Clusterbildung verringern könnte, bleibt zum jetzigen Zeitpunkt unbeantwortet und muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

3.3.4. Epifluoreszenzmikroskopie

Die Epifluoreszenzmikroskopie wurde verwendet, um die laterale Organisation von myelinartigen Lipidmonoschichten mit und ohne P2-Varianten mit einer Auflösung im Mikrometerbereich darzustellen. Der Versuchsaufbau enthält ein Fluoreszenzmikroskop, das über den Langmuir-Trog einer Kompressionsfilmwaage montiert ist. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde Rho-B-DHPE verwendet; dieses Phosphatidylethanolamin hat eine Kopfgruppe, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B markiert ist. Rho-B-DHPE reichert sich bevorzugt in der flüssig expandierten (LE) Phase an und dient somit der selektiven Kontrastierung dieser hell erscheinenden Bereiche in den Mikroskopaufnahmen.¹³⁴ Vorversuche zeigen, dass das Rho-B-DHPE keinen signifikanten Einfluss auf das Verhalten der Monoschicht hat (Abbildung 80). Im Folgenden werden zunächst die Bilder der Messungen des reinen zytoplasmatischen PNS-Lipidgemischs mit 0,05 % Rho-B-DHPE und anschließend die Messungen in Gegenwart von P2 gezeigt.

Darüber hinaus zeigen die Experimente, bei denen zusätzlich zum Lipidfarbstoff Rho-B-DHPE das P2 und seine Varianten mit einem weiteren Protein-Farbstoff, dem Alexa-488-NHS, markiert wurden, die Lokalisierung des P2 im Monoschicht-Ensemble.

Fluoreszenzmikroskopie der PNS-Lipidmischung mit und ohne P2-Varianten

Laut Inouye & Kirschner¹²⁸ enthält die zytoplasmatische PNS-Myelinschicht 37 % Cholesterin. Dieser hohe Anteil wirkt sich verdichtend auf die Lipidmischung aus^{70,135} und beeinflusst die Bewegungsfreiheit der Phospholipid-Kohlenwasserstoffketten und damit die Gesamtfluidität der Membran. Die Phospholipide in einer solchen Monoschicht haben an der Grenzfläche eine geringere Oberfläche zur Verfügung, was zu einer Verringerung des Freiheitsgrads der Lipidbewegung führt.^{136,137} Cholesterin unterbricht auch die Kopfgruppen-Kopfgruppen-

Wechselwirkungen zwischen Phospholipiden.⁴¹ Insgesamt wird daher angenommen, dass diese Kondensationseffekte die Bildung von Lipiddomänen erleichtern, was zu Domänen führt, die mit Cholesterin, gesättigten Phospholipiden und Sphingolipiden angereichert sind, sowie zu Domänen, die an diesen Molekülen verarmt sind. Die cholesterinreichen Domänen sind dichter gepackt, neigen zu einer geringeren Fluidität,^{32,33} welche dennoch zur fluidengeordneten Phase (Lo) gehören und sind in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen als dunklere Bereiche zu erkennen (Abbildung 30). Aufgrund seiner Molekularstruktur neigt Rhod-DHPE dazu, sich in diesen Lo-Phasen kaum und in den Bereichen der LE-Phase vermehrt anzureichern.

Der Phasenübergang der Monoschichtsysteme ist druckabhängig. In den Übergangszuständen sind mehrere Domänenmuster möglich^{38,43,138} (Kap. 2.3.2). Bei niedrigeren Oberflächendrücken treten kreisförmige Domänen auf. Folgend Streifen oder eckige Domänen, die eher für höhere Oberflächendrücke innerhalb der LE-Phase typisch sind.⁷⁰ Ab einem bestimmten Oberflächendruck, hier bei ~ 12 mN/m, löst sich die Domänengrenze auf und die heterogene Monoschicht wandelt sich in eine homogene Monoschicht um, welche sich in der LC-Phase befindet. Mikroskopisch ist dies durch das Verschwinden der cholesterinreichen Domänen und zur Bildung einer grauen homogenen Oberfläche ersichtlich (Abbildung 30). Diese homogene Vermischung bleibt trotz eines weiteren Druckanstiegs aufgrund der Kompression bestehen, bis die Monoschicht kollabiert.

Der „Flickenteppich“ (Abbildung 30) aus hochgeordneten, cholesterinreichen Domänen und den niedergeordneten phospholipidreichen Domänen sind keine Einzelbilder. Über den gesamten Film hinweg kann man Bereiche beobachten, in denen die Domänen angereichert auftreten, und Bereiche, in denen es kaum oder keine dunklen Domänen gibt. Dieses „Patchwork“ ist nicht überraschend, da die Verteilung von Lipiden und Domänen auch in der Struktur der natürlichen Zellmembran inhomogen ist wie es beispielweise im 2014 aktualisierten Fluid-Mosaic-Membran-Modell (F-MMM) von Nicolson¹ oder in der Veröffentlichung von Esciba¹³⁹ im Jahr 2008 beschrieben ist. (Abbildung 5)^{2,25}

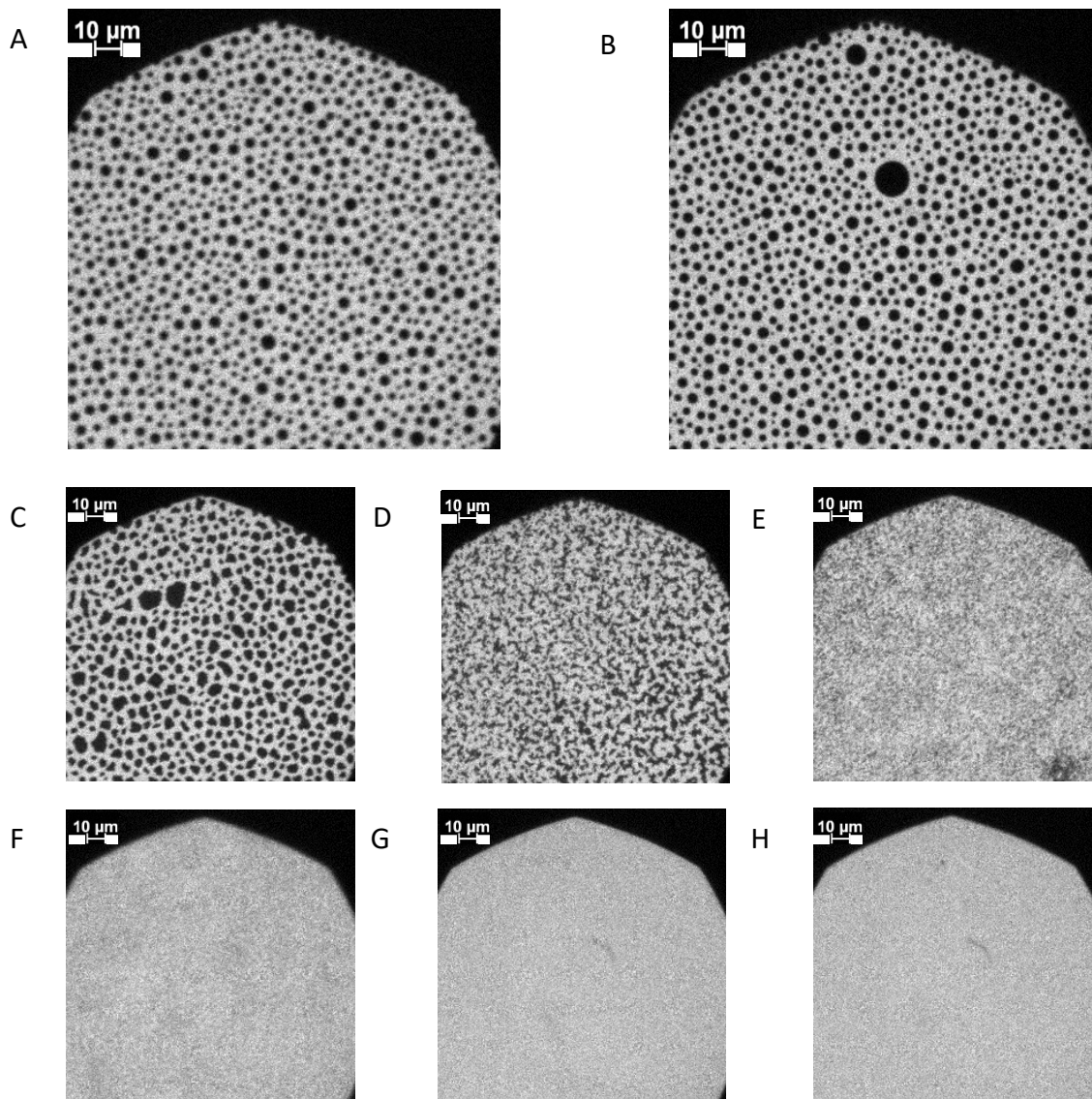


Abbildung 30 Repräsentative epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Kompressionsverhaltens der mit 0,05 mol% Rho-DHPE ersetzten PNS-Myelin-ähnlichen Monoschicht auf einer HEPES-NaCl-Puffersubphase; A: 0 mN/m; B: 1,1 mN/m; C: 11,3 mN/m; D: 11,6 mN/m; E: 12,8 mN/m; F: 25,1 mN/m; G: 33 mN/m; H: 40,52 mN/m

Monoschicht-Experimente ahmen, trotz Laborbedingungen, die Situation einer Doppelschicht oder sogar *in vivo* nach. Dieses pseudobinäre System, druckabhängiges „mischen“ und „entmischen“ der cholesterolreicher Domänen der Monoschicht, wurde bereits intensiv untersucht.^{32,43} Experimente mit TopFluor-Cholesterol, einem fluoreszenzmarkierten Cholesterol, stützten diese Annahme und zeigten, dass die Domänen überwiegend mit Cholesterol angereichert sind. Wie in Abbildung 30 verdeutlicht kommt es, ab einem circa Oberflächendruck von ~ 12 mN/m zu einem Auflösen der Domänenstruktur hin zu einem homogene Bild, welches sich bis zum Kollaps des Films erhalten bleibt.

Nach Proteininjektion und Inkubation (Abbildung 31) kann ein weiterer Effekt auf der Monoschicht beobachtet werden.¹¹⁸ Die Proteininjektion erfolgte bei angehaltener

Kompression bei 20 mN/m. Nach einer Inkubationszeit (circa 30 Minuten) haben sich aus der zuvor homogenen Monoschicht helle (Rho-B-DHPE-haltige) und dunkle Bereiche gebildet. (Abbildung 31) Diese Bereiche sind oft nicht gleichmäßig in der Ebene verteilt, sondern geclustert oder mit nur kleinen „Schleiern“ verbunden. Im direkten Vergleich mit den Aufnahmen ohne P2 kann man ableiten, dass diese „Schleier“ Aggregate von P2 auf der Monoschicht sind, ähnlich wie es für bMBP beschrieben wurden.^{43,140} Wie vorherige Studien zeigen, kann P2 DMPC/DMPG-Doppelschichten stapeln sowie die Verteilung der Lipide beeinflussen und so ein Mikromilieu aufbauen.^{103,117,118} Die „grauen Schleier“ zeigen an, dass die geclusterten Proteine die Rho-B-DHPE Moleküle lokal verdrängen und damit die Fluoreszenzemission an diesen Stellen reduzieren. Da sich diese Aggregate oder Cluster hauptsächlich an den Grenzen zwischen cholesterinreichen und -armen Regionen befinden, kann davon ausgegangen werden, dass P2 die Grenzflächenspannung auf ähnliche Weise reduziert, wie dies für MBP²⁵ beobachtet wurde. In Abbildung 31G sind zwei dunkle Domänen an drei Ankerpunkten verbunden. Diese Ankerpunkte können im Licht der Epifluoreszenzmikroskopie als Cluster von P2 identifiziert werden. Frühere Untersuchungen,^{103,117} die die Bindung von P2 an Vesikel und die Aggregation von Vesikeln sowie die Bildung von Multilagen durch Zugabe von P2 zu Lipidvesikeln zeigen, könnten somit durch Epifluoreszenzaufnahmen komplexer Lipidgemische gestützt werden.

Ähnliche Ereignisse wie bei dem Wildtyp sind auch bei den Varianten zu beobachten (P38G: Abbildung 32, I43N: Abbildung 33, I52T: Abbildung 34).

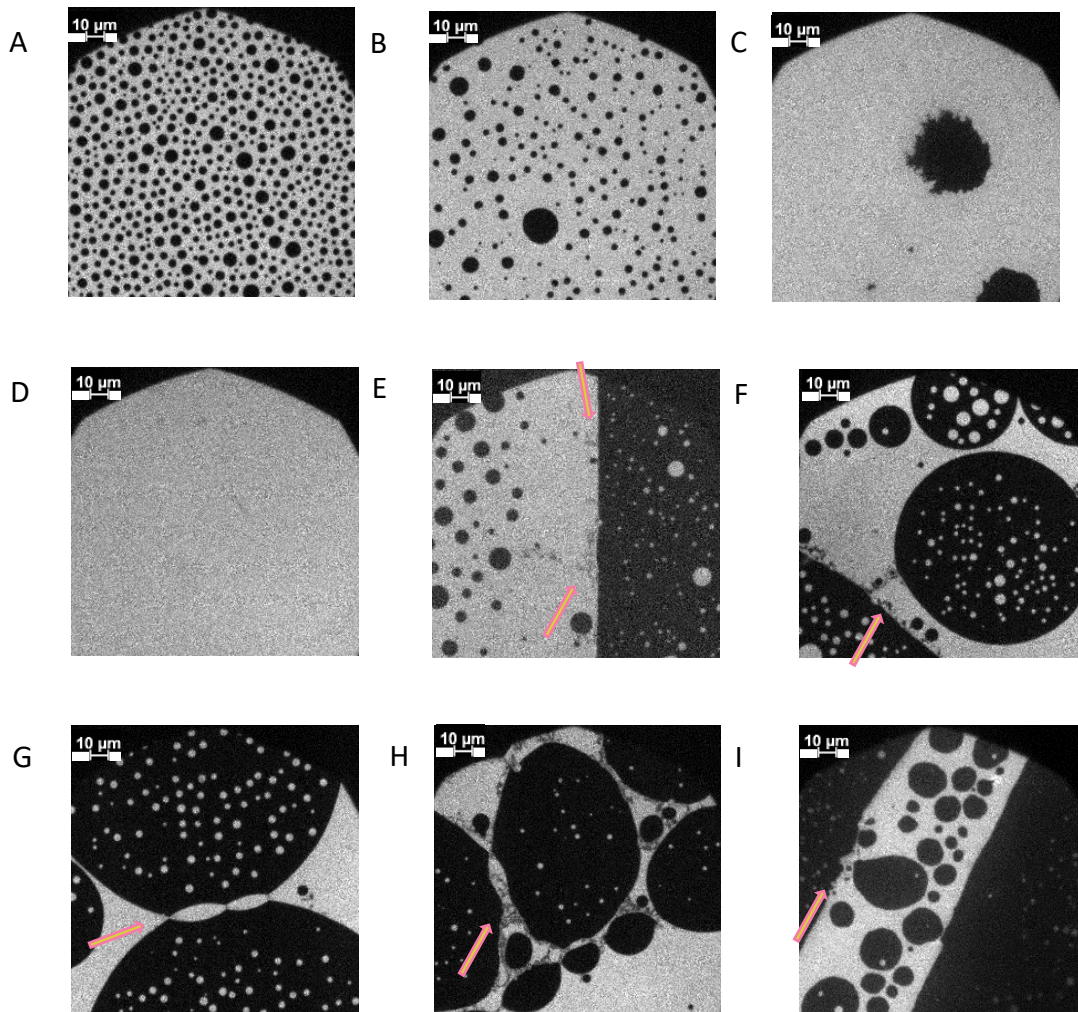


Abbildung 31 Repräsentative epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des Kompressionsverhaltens der mit 0,05mol% Rho-DHPE versetzt PNS-myelinartigen Monoschicht auf einer HEPES-NaCl-Puffersubphase und nach Zugabe von Wildtyp-P2 bei 20 mN/m und Inkubation; vor Proteininjektion: A: 3,9 mN/m; B: 11,5 mN/m; C: 13,5 mN/m; D: 20 mN/m; nach Proteininjektion und Inkubation E: 22 mN/m; F-I: ~ 25 mN/m. Proteininjektion erfolgt bei 20 mN/m, Kompression wurde angehalten, Druckanstieg erfolgt durch die Adsorption des Protein, Pfeile zeigen Regionen mit verminderter Rho-B-DHPE-Fluoreszenz („Grauschleier“) an, die auf P2-haltigen Cluster zurückzuführen sind.

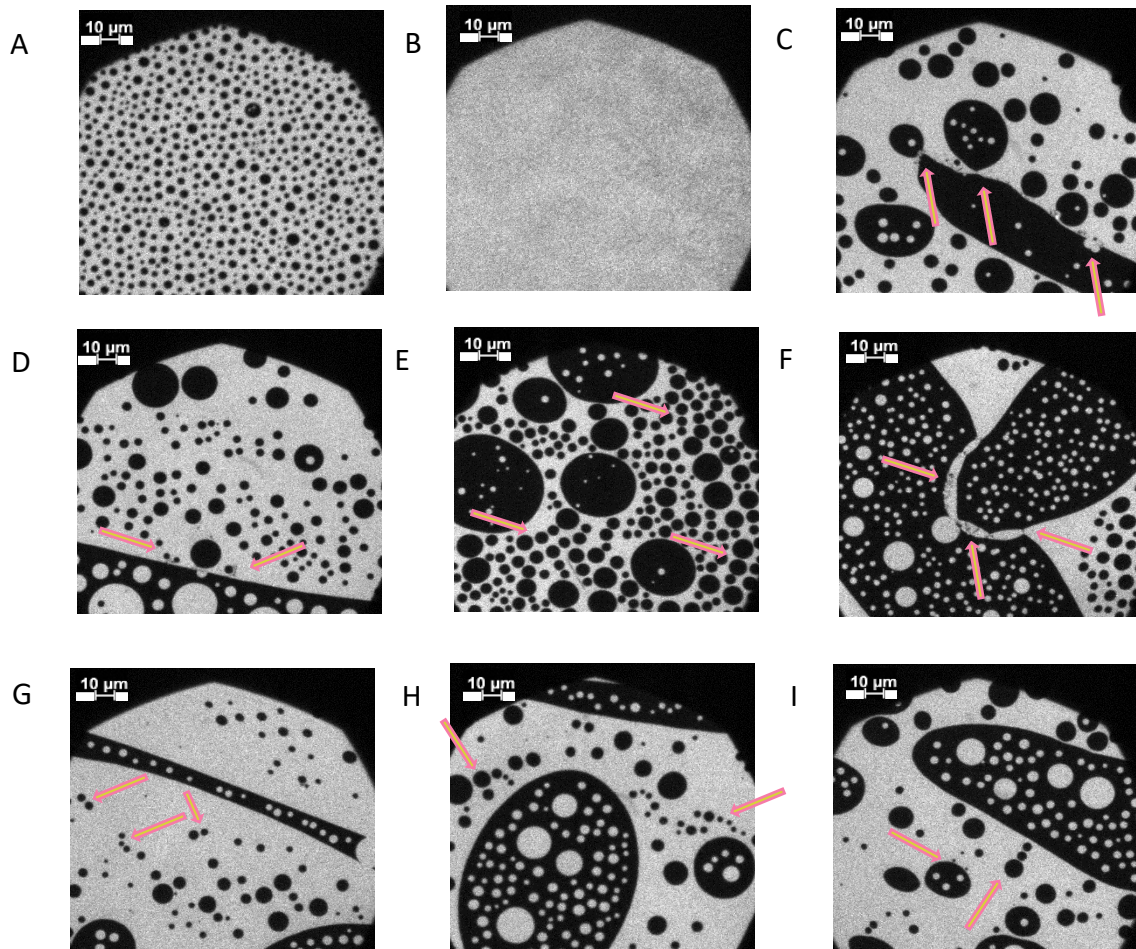


Abbildung 32 Repräsentative epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des Kompressionsverhaltens der PNS-Myelin-ähnlichen Monoschicht, gemischt mit 0,05mol% Rho-DHPE auf einer HEPES-NaCl-Puffersubphase und nach Zugabe der P2 P38G-Variante bei 20 mN/m und Inkubation; vor Proteininjektion: A: 0,6 mN/m; B: 17,19 mN/m; nach Proteininjektion: C- I: ~ 25 mN/m; Proteininjektion erfolgt bei 20 mN/m, Kompression wurde angehalten, Druckanstieg erfolgt durch die Adsorption des Protein, Pfeile zeigen Regionen mit verminderter Rho-B-DHPE-Fluoreszenz („Grauschleier“) an, die auf P2-haltigen Cluster zurückzuführen sind. In G, H, I sind auch dunkle Bereiche zu sehen, die einer Perlenkette ähneln. Diese Bereiche sind vermutlich durch Cluster von P38G

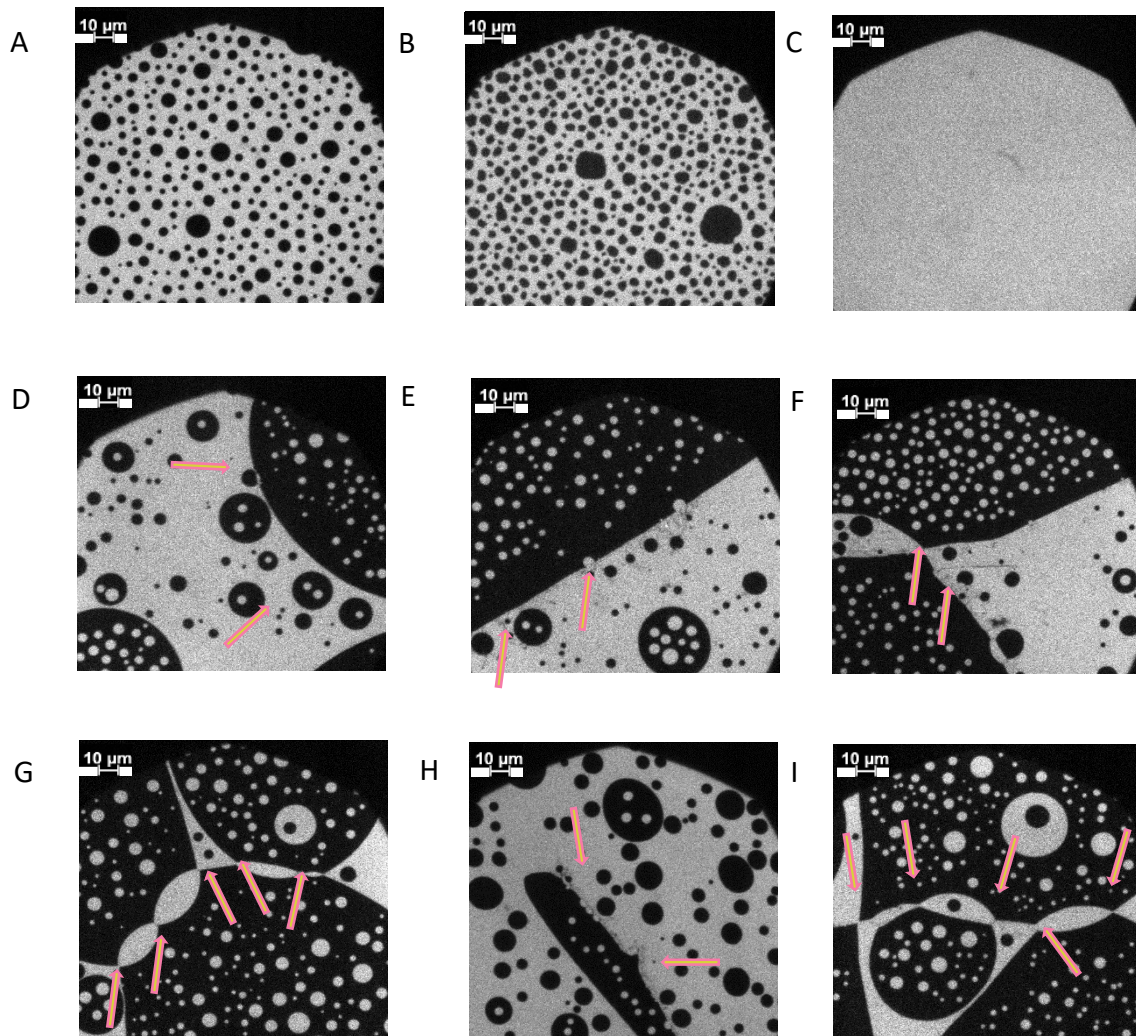


Abbildung 33 Repräsentative epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des Kompressionsverhaltens der PNS-Myelin-ähnlichen Monoschicht, gemischt mit 0,05% Rho-DHPE auf einer HEPES-NaCl-Puffersubphase und nach Zugabe der P2 I43N-Variante bei 20 mN/m und Inkubation; A: 2,78 mN/m; B: 5,45 mN/m; C: 12,43 mN/m; D: 17,42 mN/m; E - I: ~ 25 mN/m; Pfeile zeigen Regionen mit reduzierter Rho-B-DHPE-Fluoreszenz („grauer Schleier“) aufgrund von Clustern, die die jeweiligen 2-Varianten enthalten

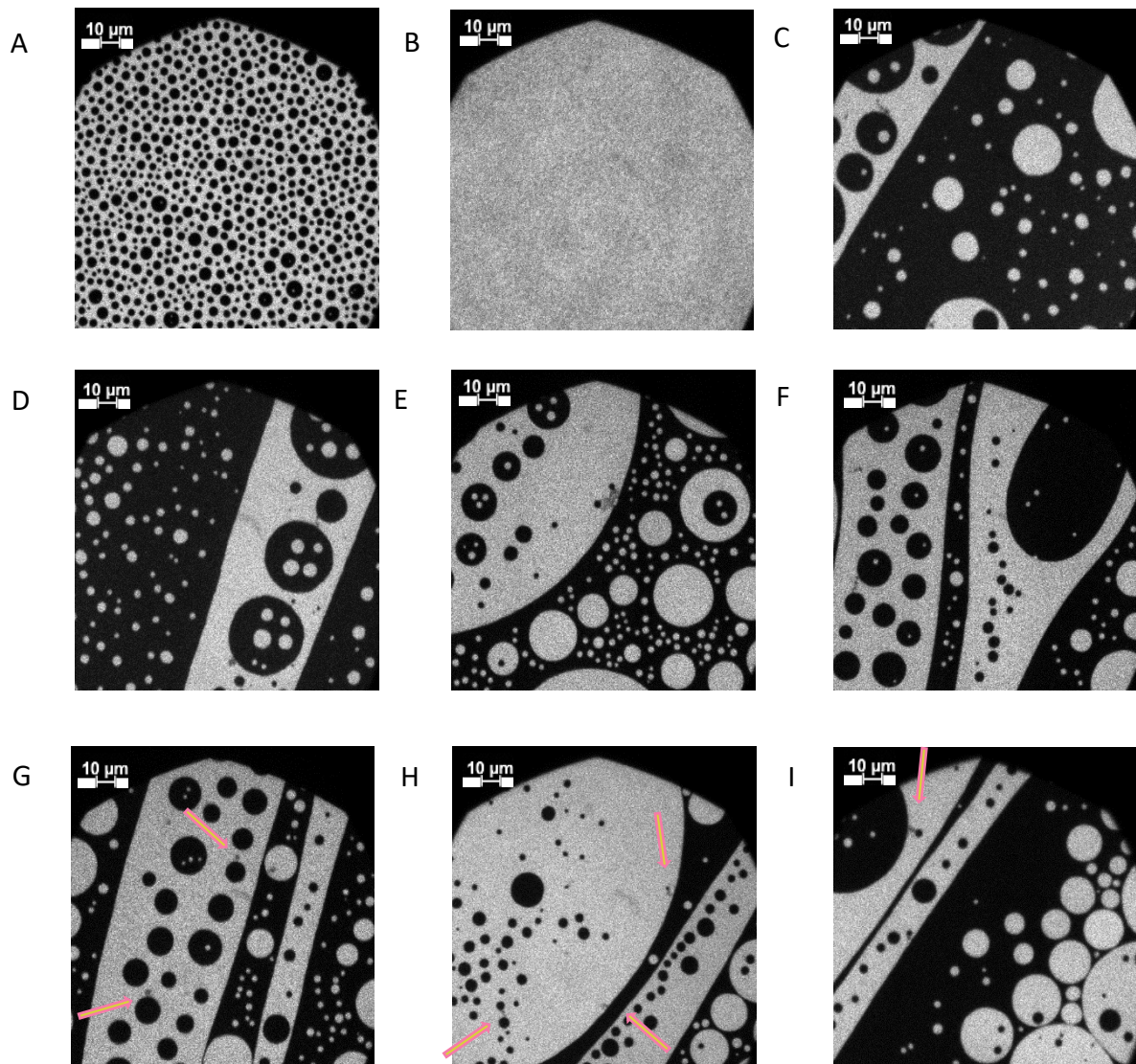


Abbildung 34 Repräsentative epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Kompressionsverhaltens der PNS-Myelin-ähnlichen Monoschicht, gemischt mit 0,05% Rho-DHPE auf einer HEPES-NaCl-Puffersubphase und nach Zugabe der P2 I52T-Variante bei 20 mN/m und Inkubation; vor Proteininjektion: A: 5,52 mN/m; B: 9,02 mN/m; nach Proteininjektion: C- I: ~ 25 mN/m. Proteininjektion erfolgt bei 20 mN/m, Kompression wurde angehalten, Druckanstieg erfolgt durch die Adsorption des Protein, Pfeile zeigen Regionen mit verminderter Rho-B-DHPE-Fluoreszenz („Grauschleier“) an, die auf P2-haltigen Cluster zurückzuführen sind.

Fluoreszenzmikroskopie von fluoreszenzmarkierten P2-Varianten in der Lipidmischung des PNS

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, wurde P2 an den Grenzflächen zwischen Lipid-Domänen nachgewiesen, ein Ergebnis, das an den „grauen Schleier“ aus geclustertem MBP erinnert.^{43,140} Die Markierung oder „Färbung“ von Lipiden in einer Monoschicht oder als Ganzes ermöglicht nur dann eine Erkennung, wenn ausreichend Farbstoff verdrängt wird, beispielsweise durch hochgeordnete Domänen oder Proteincluster. Ein einzelnes Protein, insbesondere ein kleines Protein wie P2 (14,8 kDa)¹⁴¹ mit einem maximalen Durchmesser von 4–5 nm, kann jedoch mit herkömmlicher Lichtmikroskopie nicht einzeln erkannt werden. Um kleine Proteinaggregate sichtbar zu machen und die Wechselwirkungen zwischen Protein und Grenzschicht genauer zu charakterisieren, wurde P2 mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 markiert. Dieser Farbstoff wurde ausgewählt, weil Rho-B-DHPE in der Lipidmonoschicht in der LE-Phase noch eine schwache Fluoreszenz bei Einstrahlung des blauen Lichtbereiches zeigt, was einen geeigneten Hintergrund für die Proteindetektion bietet (siehe Kapitel 2.3.3). Um die Auswirkungen der Markierung auf das System zu minimieren, wurden nur 10 % von P2 durch das Alexa-488-Konjugat ersetzt. So konnte der durch „graue Schleier“ indirekt nachgewiesene Proteincluster durch die P2-Fluoreszenzmarkierung eindeutig und aktiv identifiziert werden. (Abbildung 35)

Die Zweifarbf-Fluoreszenzdaten untermauern und erweitern die bereits genannten Ergebnisse: P2 bindet vorzugsweise an die Domänengrenzen zwischen den phospholipidreichen und den cholesterinreichen Domänen. Dies deutet darauf hin, dass die hochgeordneten, cholesterinreichen Domänen vom P2-Protein nicht bevorzugt werden. Sowohl das Wildtyp P2 als auch alle Varianten scheinen die Grenzlinie zwischen der LE- und der LC-Phase zu stabilisieren, was für die Funktion von P2 bei der Myelinisierung relevant sein könnte.

Abbildung 35 zeigt Beispiele für Messungen mit fluoreszierendem Rho-B-DHPE und markiertem P2 für alle Varianten. Der grüne Kanal (547 nm, hier Falschfärbung in gelb) zeigt helle phospholipidreichen und dunkle cholesterinreiche Domänen, wobei die grauen Clusterstrukturen P2 darstellen. Der blaue Kanal (486 nm, hier Falschfärbung in violett) zeigt in hellen Punkten das Alexa-488-Konjugat und in den Flächen schimmernd das Rho-B-DHPE. Die Fluoreszenzdetektion bestätigt die Lokalisierung von P2 an der Grenzlinie zwischen den Domänen, die durch das Protein miteinander verbunden zu sein scheinen. Im kombinierten Bild stimmen die „Schleier“ im fluoreszierenden Rho-DHPE mit den hellen Bereichen im Alexa-

488-markierten P2 überein, was einen starken Hinweis auf die Lokalisierung von P2 in diesen Bereichen liefert.

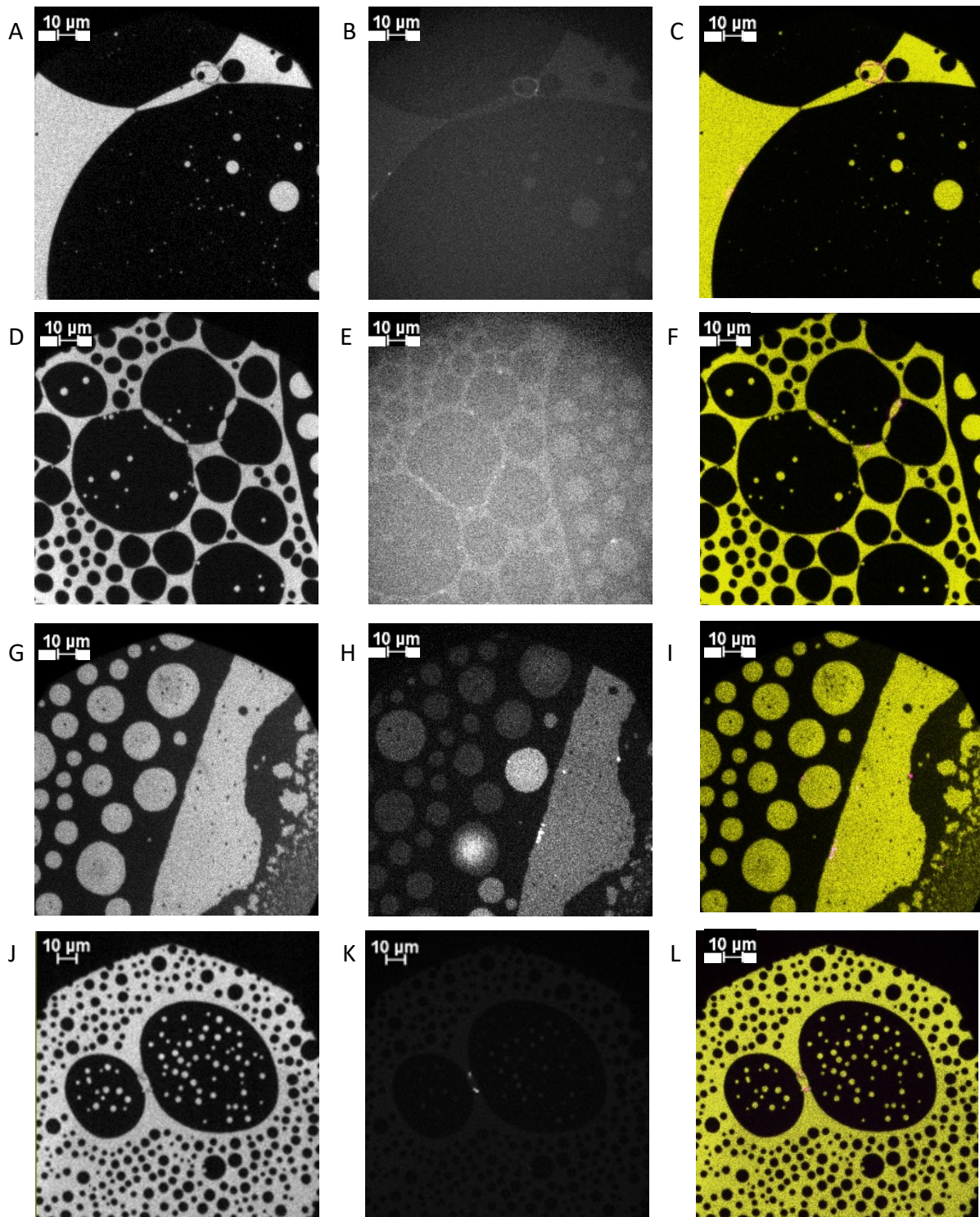


Abbildung 35 Zweifarb Experiment von P2-Varianten an PNS-myelinähnliche Membran adsorbiert. Epifluoreszenz-Filmwaage-Mikroskopie, A, B, C: P2 wt; D, E, F: P38G; G, H, I: I52T; J, K, L: I43N; A, D, G, J grüner Kanal; B, E, H, K: blauer Kanal in PNS- Monoschichten bei 25 mN/m; C, F, I, L: Kombinationenbild (Falschfarbendarstellung)

Netz/Cluster Bildung durch das P2

Während der Messreihe war der Wildtyp P2 der einzige, der großflächige Clusterstrukturen bildete. Die Krankheitsvarianten zeigten hauptsächlich kleinere Cluster oder lokalisierte Verflechtungen. Die kleinen Netzwerkstrukturen verbanden maximal drei Lipiddomänen miteinander, nur der Wildtyp P2 zeigte Netzwerkstrukturen über mehrere Domänen (Abbildung 36). Diese Beobachtung wurde über mehrere Messungen bestätigt. Um auszuschließen, dass eine Verunreinigung oder ein Tensid für diese Vernetzung verantwortlich war, wurden diese Experimente mit markiertem P2 wiederholt. Wie in Abbildung 37 dargestellt, kann markiertes P2 innerhalb des beobachteten Netzwerks lokalisiert werden. Diese Netzwerkstruktur blieb über die Dauer der Messung stabil. Eine Fusion der Domänen war nicht nachweisbar. Dies könnte die Funktion von P2 bei der Vernetzung von Membranblättchen belegen, die auch einer der stabilisierenden Faktoren für die Myelinscheide sein könnte. Diese Messreihe kann daher als weiterer grundlegender Beweis für die Fähigkeit von P2 herangezogen werden, die Eigenschaften und Morphologie von Lipidmembranen zu beeinflussen.^{142,143}

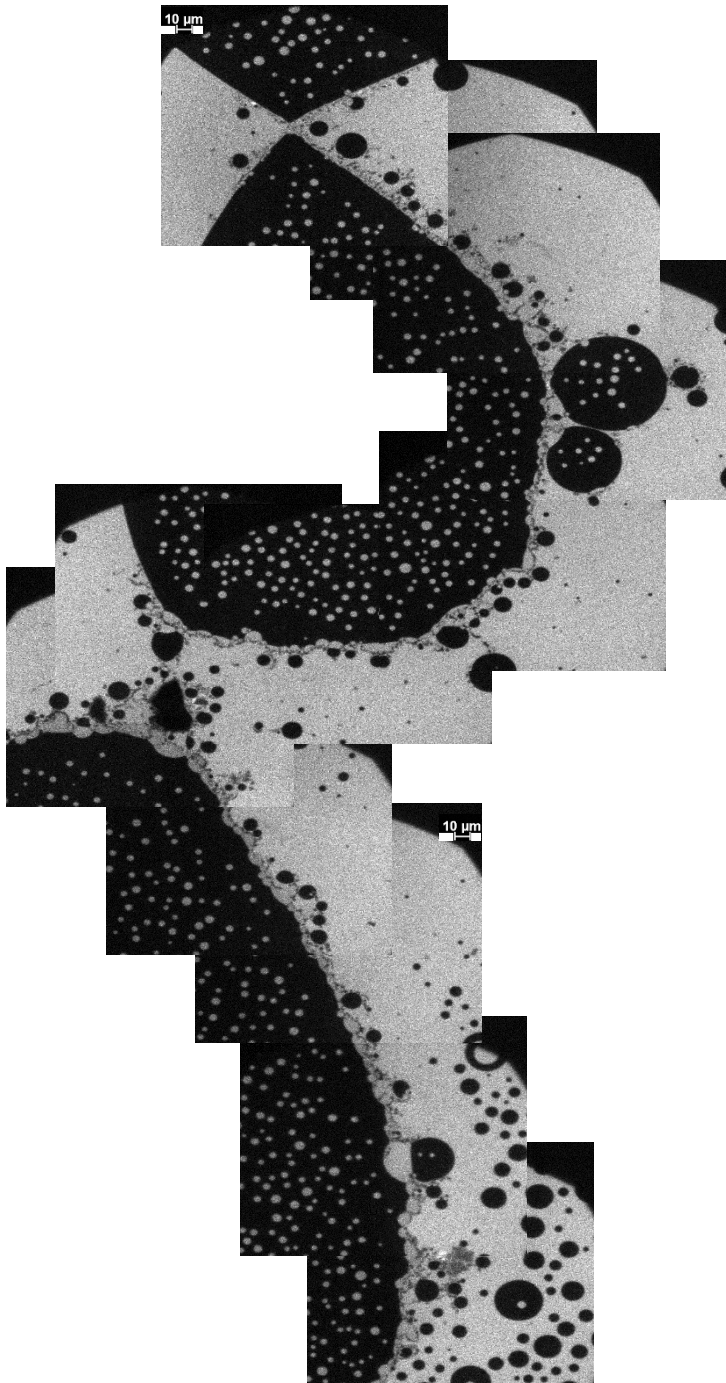


Abbildung 36 Epifluoreszenzmikroskopie von Wildtyp-P2 – Die Bilderserie bzw. das Bildermosaik veranschaulicht der komplexen Vernetzung der jeweiligen Domänen durch das Protein. Die Aufnahmen wurde im grünen Kanal mit dem Lipid Fluoreszenzfarbstoff Rho-B-DHPE 0,05mol% aufgenommen.

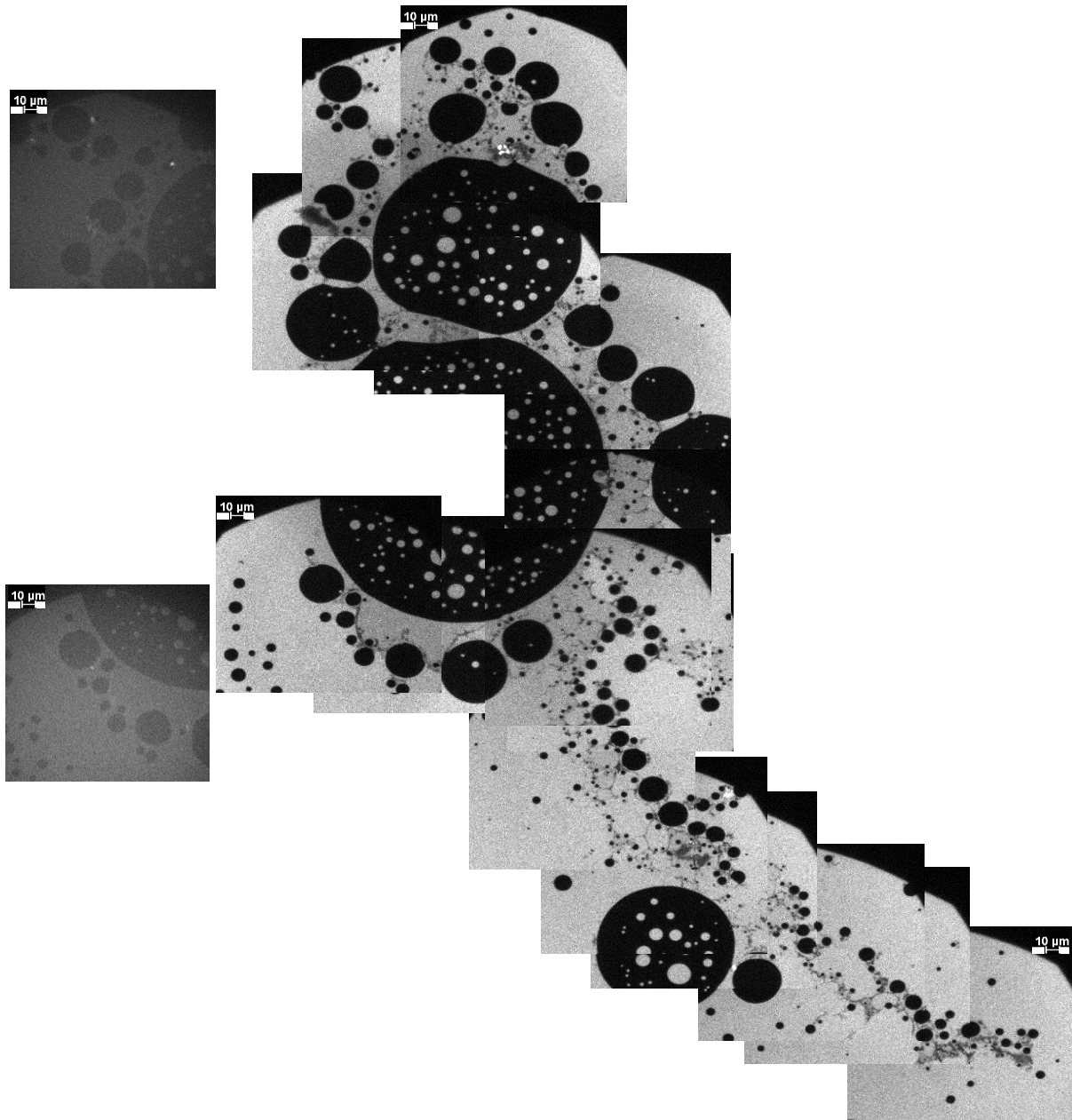


Abbildung 37 Epifluoreszenzmikroskopie von Wildtyp-P2 – Bilderserie zur Veranschaulichung der komplexen Vernetzung der jeweiligen Domänen durch das Protein. Links sind zwei Abbildungen zeigen ausschnittsweise Aufnahmen aus dem Alexa488-fluoreszenzmarkiertem P2-Konjugat im blauen Kanal, die wiederum die Koinzidenz von „grauen Schleiern“ in Rho-B-DHPE-Fluoreszenz mit Regionen, die markiertes P2 enthalten, anzeigen. Das rechte Bildmosaik zeigt die Gesamtheit der Aufnahme auf, P2 Wildtyp bildet einen zusammenhängenden, Domänen verbindenden Cluster

3.3.5. Zusammenfassung und Korrelation der Mutanten

Das vorliegende Kapitel zeigt, dass P2 nicht nur an einfache Modell-Lipidmembranen

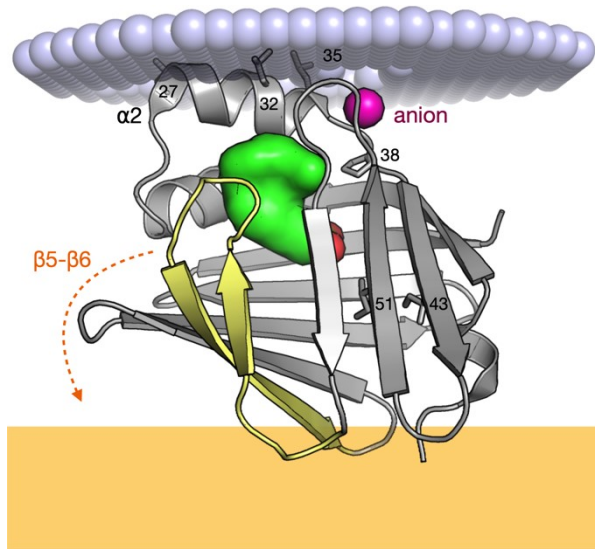


Abbildung 38 Modell für P2 zwischen zwei Membranen. Der helikale Deckel und die anionenbindende Stelle interagieren mit der Membran oben (blaue Kugeln), während der β -Fass, einschließlich der Konformationsänderung in der $\beta 5$ - $\beta 6$ -Schleife, an die untere Membran (orange) bindet. Die Positionen der Leu-Reste 27, 32 und 35 an der Außenseite von Helix 2, Pro38 sowie die CMT-Mutationsstellen 43 und 51 sind durch Zahlen gekennzeichnet.

der Gelenkregion zwischen der α -Helix-Deckel- und der β -Faltblatt-Fassstruktur ersetzt wird, ist bemerkenswert (Abbildung 38). Es ist bekannt, dass die Membranbindung strukturelle Veränderungen in P2 induziert, die hauptsächlich die teilweise Entfaltung des α -helikalen Deckels^{101,131} und die Öffnung der $\beta 5$ - $\beta 6$ -Schleife umfassen. P38G wurde in vorherigen Studien als dynamischer als der Wildtyp P2 mit veränderten Membranbindungseigenschaften bezeichnet.^{39,131,132}

Die veränderte Membranaffinität der P38G-Varianten, die durch Monoschichtmessungen beobachtet wurde, in Verbindung mit den Messungen zu Membranbindungsaktivität,^{101,131} kann auf eine erhöhte Proteinflexibilität zurückgeführt werden, die verbesserte Lipidwechselwirkungen ermöglicht. Daher deuten die kombinierten Daten aus Laulumaa¹³¹ und den Monoschichtmessungen darauf hin, dass P38G eine schnellere Kinetik, aber geringere thermodynamische Eigenschaften aufweist. Dies impliziert, dass P38G sich schneller mit der Membran verbindet und von ihr löst, aber insgesamt eine geringere Affinität aufweist. Die Bedeutung der α -helikalen Deckelregion wurde auch bei anderen FABPs (FABP3, 4, 5)¹²⁵ in

5,39,101,131,132 sondern auch an komplexe, naturnahe Lipidmonoschichten adsorbiert. Hierbei wurde ein deutlicher Unterschied zwischen dem Wildtyp und seinen Mutanten beobachtet. Die Varianten mit einzelnen Mutationen in den β -Faltblatt-Regionen wiesen nur geringfügige Abweichungen bei der Bindung an die Membran auf. Dies stimmt mit früheren Erkenntnissen überein,¹⁰¹ dass die β -Faltblätter der Fassregion nur bedingt an der Bindung an Lipidmembranen beteiligt sind.

Im Gegensatz dazu weist die P38G-Mutante erhebliche Unterschiede bei der Bindung an Lipidmonoschichten auf. Diese Punktmutation, bei der Prolin durch Glycin in

Lösung und bei der Interaktion mit Fettsäuren beobachtet. Bei diesen drei FABPs wurde eine Verbindungsstelle an der Außenseite des Proteins in der Nähe des α -helikalen Deckels identifiziert. Im zellulären Kontext könnten diese Mutanten möglicherweise den Fettsäuretransport durch Beschleunigung der Membranassoziation verbessern, während sie gleichzeitig die Membranstapelung negativ beeinträchtigen, welche jedoch für die „feste“ permanente Struktur der Myelinscheide von entscheidender Bedeutung ist.

Die P38G-Mutation in der Region zwischen dem α -helikalen Deckel und dem β -Faltblatt hat selbst in der komplexen, naturnahen Membran einen erheblichen Einfluss auf die Membranaffinität. Weitere Filmwaageexperimente z.B. Zweifarb-Experimente mit weiteren P2-Variationen würden Aufschluss über die Wechselwirkung zwischen der Lokalisierung der Mutation und der Membranaffinität geben. Hierfür wären Mutationen im α -helikalen Deckel oder an anderen Mutationsstellen in verschiedenen Regionen des Proteins von großer Bedeutung. Es sind eine Reihe von CMT-Krankheitsvarianten^{127,142} und strukturbasierte Mutationen¹²⁶ bekannt, diese sollten in eine solche Studie einbezogen werden. Da alle Experimente zur Interaktion mit Lipidmembranen hier und in früheren Arbeiten mit dem menschlichen P2-Protein durchgeführt wurden, ist es wichtig zu betonen, dass Mutationen im *PMP2-Gen* die Ursache für die CMT-Erkrankung beim Menschen sind und dass im Gegensatz zur Maus die myelinisierenden Zellen des menschlichen Gehirns das P2-Protein exprimieren. Dementsprechend hatte die Maus, der PMP2 fehlt, zwar einen milden Phänotyp, aber P2 könnte ein Beispiel für ein Protein sein, das für das Verständnis der Unterschiede zwischen Mäusen und Menschen relevant ist.^{104,118,127,128,131,144}

Ein weiterer Ansatz, um natives Myelin auf molekularer Ebene zu verstehen, besteht darin, die Systemkomplexität weiter zu erhöhen. In dieser Arbeit wurde eine Affinität zu komplexen Membranen aufgezeigt, welche sich mit früheren Veröffentlichungen an einfacheren Membranen deckt.^{39,101,104,127,131} Da P2 jedoch nicht allein in der Myelinscheide vorkommt, wäre eine Kombination der Myelinproteine MPB/P1⁴³ und P0, möglicherweise unter Zuhilfenahme von Nanodiscs,¹⁴⁵ mit P2 eine erhebliche Weiterentwicklung des Systems. Dementsprechend wurden bereits Studien¹⁴³ veröffentlicht, die sich mit der möglichen Synergie und Konkurrenz zwischen diesen Proteinen befassen. Allen drei dieser Proteine ist die Funktion gemeinsam, Lipiddoppelschichten im PNS-Myelin zu stapeln, obwohl sie keine verwandte Struktur aufweisen. In Folgestudien zu komplexen Proteolipidsystemen würde nicht nur die einzelne Protein-Lipid-Interaktion – einschließlich Krankheitsvarianten –

nachgewiesen, sondern auch die synergistischen oder antagonistischen Effekte der Myelinproteine auf Protein-Lipid-Interaktionen. Weitere Forschungen mit zunehmender Proteinkomplexität in Myelinmodellsystemen sind derzeit im Gange und werden in Zukunft berichtet.

3.4. Zusammenfassung / Ausblick

Das vorliegende Kapitel widmet sich der vertieften Analyse der beiden physiologischen Funktionen des P2-Proteins: der Fettsäurebindung und der Membranassoziation. Anhand detaillierter Untersuchungen des Bindungsmechanismus zwischen P2 und Fettsäuren konnte gezeigt werden, dass selbst Punktmutationen in Proteinregionen, die nach aktuellem Wissensstand nicht direkt an der Ligandenbindung beteiligt sind, einen spürbaren Einfluss auf die Bindungsaffinität ausüben. Darüber hinaus wurde differenziert, in welchen Bindungsmodi die Fettsäuren von P2 und seinen Mutanten aufgenommen werden. Besonders auffällig war die P38G-Mutante, die einen hohen Anteil stark gebundenen 5-DSA aufwies. Diese erhöhte Affinität könnte in vivo die Abgabe der Fettsäure an das Zielkompartiment behindern – ein möglicher Hinweis auf pathophysiologische Konsequenzen solcher Mutationen im Fettsäuretransport.

Auch hinsichtlich der Membranbindung zeigte sich ein differenziertes Bild: Je nach Mutation variiert die Affinität von P2 zur naturnahen Lipidmembran erheblich. Die Messungen an Lipidmonoschichten verdeutlichten, dass insbesondere P38G – mit der Mutation in der Gelenkregion zwischen α -helikalem Deckel und β -Fasstruktur – eine deutlich geringere Membranaffinität aufweist. Die epifluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass zwar alle Proteinvarianten in der Lage sind, Lipidmonoschichten zu beeinflussen und Domänenbildung zu induzieren, jedoch nur der Wildtyp ein großflächiges, netzartiges Domänenmuster aufbauen kann. Diese Fähigkeit könnte für die Stabilisierung der Myelinscheide eine entscheidende Rolle spielen und liefert potenzielle Erklärungsansätze für krankheitsassoziierte Effekte bestimmter Mutationen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden damit eine wichtige Grundlage für weiterführende Forschungsansätze. Molekulardynamik-Simulationen (MD) und Docking-Studien könnten das Verständnis des Fettsäurebindungsmechanismus weiter vertiefen, insbesondere im Zusammenspiel mit den experimentellen cwEPR-Daten. Letztere liefern bereits konkrete

Hinweise auf das strukturelle Platzangebot und die Hydrophilie in der Portalregion von P2 – beides entscheidende Faktoren für die Ligandenbindung. Zukünftige Experimente unter Verwendung von Nanodiscs würden es ermöglichen, nicht nur das isoliert P2, sondern auch dessen Zusammenspiel mit weiteren Myelinproteinen wie MBP und P0 in naturnahen Membrankomplexen zu untersuchen. Eine Erweiterung des Mutationsspektrums – insbesondere um Varianten in anderen funktionellen Regionen des Proteins – würde zudem neue Perspektiven auf deren Einfluss auf die Lipidbindung und Membranintegration eröffnen. Dadurch ließen sich Mutationsauswirkungen sowohl in cwEPR-Analysen als auch in Monoschicht-Experimenten systematisch erfassen und ein umfassenderes Verständnis der Rolle von P2 und seinen Mutationen zu gewinnen.

4. Ryanodin-Rezeptor Sonden Synthese und Untersuchung

Dieser Abschnitt thematisiert den transmembranären Ryanodinrezeptor(RyR) Kanal sowie die Synthese von EPR-aktiven Liganden des RyR-Kanals und die cwEPR-Analyse dieser EPR-aktiven Liganden. Teile dieser Thematik wurden von Frau Jana Krüger im Rahmen ihrer Bachelorarbeit vertieft.

Schwerpunkt ihrer Arbeit waren die Synthesen, sowie der Charakterisierung der entstandenen Produkte mittels der Methoden der IR, NMR. Das Abstecken und Planung der Thematik, sowie der Ausarbeitung der Synthesen und Analytischen Methoden oblag mir. Die durchgeführten Arbeiten Frau Krügers erfolgten unter meiner Anleitung und direkten Aufsicht. Die nach der Synthese der Liganden erfolgte cwEPR Analytik wurde ebenfalls von mir durchgeführt.

4.1. Einführung

Die maligne Hyperthermie (MH), ist eine schwer diagnostizierbare Situation innerhalb einer intensivmedizinischen Behandlung (Operation bzw. Intensivstation). Die MH zeigt eine stark erhöhte Muskelaktivität und erhöhten Muskelmetabolismus, welche sich klinisch zunächst in einem Rigor der quergestreiften Muskulatur, folgend einer Tachykardie und bei weiterem Verlauf fortwährenden Erhöhung der Körperkerntemperatur darstellen. Diese Kerntemperaturerhöhung ist potentiell letal. Sie wird je nach Stadium zunächst mit Eis, zur direkten Kühlung des Körpers (Luminal oder auf Körperoberfläche)¹⁴⁶ behandelt und zusätzlich mit der Gabe des Arzneimittels Dantrolen, eine Hydantion-Derivat, wobei Dantrolen, als spezielles Arzneimittel, nur durch Fachärzte angewendet werden darf. Dantrolen blockt hierbei umgehend die RyR-Kanäle, die für die kontrollierte Calciumionfreisetzung in das Zelllumen verantwortlich sind.¹⁴⁷ Die MH ist eine autosomal-dominant Erbkrankheit, welche über ein Genomscreening oder mittels Muskelbiopsie und dem Halothan-Coffein-Kontrakturtest (ICVT – in-vitro Muskelkontrakturtest)¹⁴⁸ bei familiäre Prädisposition diagnostiziert werden kann.¹⁴⁹

Tabelle 3 klinische Symptome des malignen Hypertonie und deren Ursache im Muskel

Einteilung	Symptome
Erhöhte Muskelaktivität	Generalisierte erhöhter Muskeltonus (Rigor) Muskelspasmus nach Succinylcholin (Trismus) Erhöhte Kreatinkinase Myoglobinämie Myoglobinurie
Erhöhte Metabolismus	Hyperkapnie Tachykardie Azidose

Die unkontrollierte Freisetzung von Calciumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Lumen der Quergestreiften Muskelzelle führt zu einem unkontrollierten Muskeltonus, der sich folgend in dem beschriebenen Rigor oder Tremor, welcher die Hyperthermie verursacht, manifestiert. Wie kommt es nun zu dieser Fehlregulation dieses regulatorischen Ions (Calciumion). Im Normalzustand wird das Calcium nach Trigger aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) in das Sarkoplasma über die RyR-Kanäle freigesetzt. Das Calciumion übernimmt nun als Modulator die Aufgabe die Muskelkontraktion auszulösen in dem es an das Troponin, das Regulatorprotein zwischen Aktin und Myosin, bindet. Der RyR-Kanal besteht aus einem Homotetramer, somit aus vier gleichen RyR-Proteinen, die einer Kleeblatt-Struktur ähneln und über eine Transmembrandomäne mit dem Lumen des SR verbunden sind.

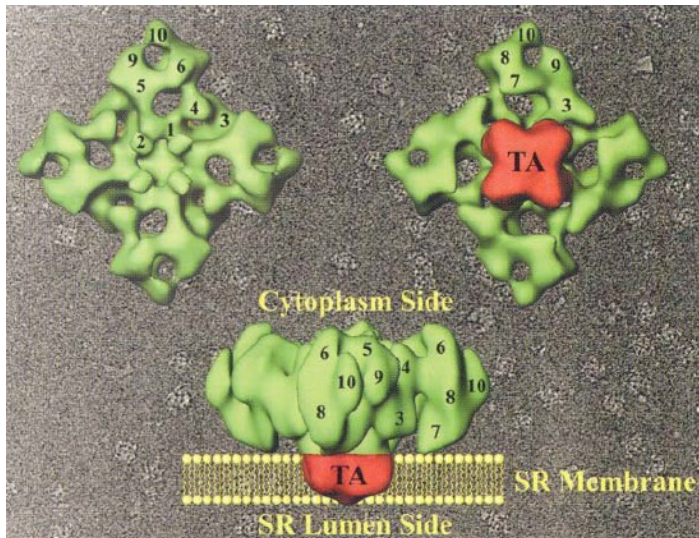


Abbildung 39 Kryoelektronenmikroskopische dreidimensionale Rekonstruktion des RyR1-Kanals. Links oben: Draufsicht, rechts oben: Ansicht von unten, mittig: Seitenansicht des Proteins in der Membran, der transmembranöse Aufbau (TA) zeigt in Richtung des sarkoplasmatischen Retikulums¹⁵⁰

Bei Säugetieren lassen sich drei Typen von RyR-Kanälen unterscheiden:

- RyR-I, welcher Teil der Skelettmuskulatur ist;
- RyR-II, welcher im Herzmuskel zu finden ist; und
- RyR-III, welches ebenfalls Teil der quergestreiften Muskulatur ist,¹⁵¹ aber auch im Gehirn, in der Leber und den Nieren vorzufinden ist.¹⁵²

Die natürlichen Trigger für diesen RyR-Kanal ist eine Stimulation durch den benachbarten Dihydropyridin-Rezeptor (DHPR), das Calciumion selbst, Adenosindiphosphat (ADP) oder andere endogene Substanzen, z.B. Hormone. Die externen Trigger sind das Namensgeber Ryanodin, Coffein, Theobromin sowie weitere Xanthine.¹⁵³⁻¹⁵⁶ Auch triggern einige Arzneistoffe, hier sind insbesondere die inhalativen Narkotika z.B. Halothan oder das Muskelrelaxanz Succinylcholin zu erwähnen. Diese Triggerstoffe setzen am Kanal an und öffnen bzw. verschieben die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals. Es erfolgt eine unkontrollierte Calcium-Homöostase. Um mittels EPR die Aktivitäten mit und am RyR-Kanal zu messen, benötigt man einen EPR aktiven Liganden, der ebenfalls die Eigenschaft der Kanalbeeinflussung besitzt. Der Fokus dieses Kapitels liegt auf der Synthese der EPR-aktiven Liganden, da keine kommerziell erhältlichen Produkte zur Verfügung standen. Aufgrund der guten Beschaffbarkeit und Handhabbarkeit der Xanthin Derivate, wurden zunächst Synthesewege eruiert und umgesetzt. Später erfolgte die Analyse der EPR-aktiven Xanthin-Derivate. Auf Grund der schweren Verfügbarkeit des RyR-Proteins konnte die Testung der EPR-

aktiven Xanthin-Derivate am RyR-Protein im Rahmen dieser Dissertation leider nicht mehr durchgeführt werden.

4.2. Synthese der EPR aktiven Xanthin Derivate

4.2.1. Theoretische Vorbetrachtungen

Der RyR-1 Kanal hat eine Affinität zu den oben erwähnten endogenen Substanzen. Ebenfalls besitzt er eine Affinität für natürliche und synthetische Alkaloide und Methylxanthin-Derivate^{153–156} insbesondere für Coffein-, Theophyllin-, Theobromin-Derivate. Hier ist das Xanthin-Grundgerüst von entscheidender Bedeutung, da der Uracil-Körper allein keinen Bindungseffekt zum Kanal aufweist. Rousseau¹⁵⁶ zeigte in ihrer Studie das 1,3-Dimethyluracil (Abbildung 40, rechts), welches nur einen Teil des Xanthin-Grundkörpers enthält, nicht in der Lage ist, an den Kanal zu binden. Dies lässt darauf schließen, dass der Imidazol-Ring, welcher die Struktur vervollständigt, für die Bindung notwendig ist. Da nicht exakt bekannt ist, welcher Teil des Moleküls für die Bindung an den Kanal verantwortlich ist, wurden zur Untersuchung N-Methyl-Xanthinderivate verwendet, die an verschiedenen Positionen mit einem Spin-Label versehen wurden. Zur Veranschaulichung ist ein Xanthin-Grundkörper mit den variablen Substituenten sowohl für natürliche als auch künstliche hergestellte Xanthinverbindungen dargestellt. Der genaue Aufbau dieser ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

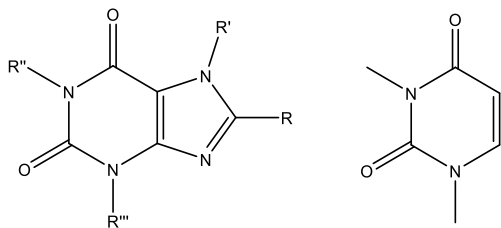


Abbildung 40 Links XanthinGrundkörper mit variablen Substituenten, rechts: 1,3-Dimethyluracil

Tabelle 4 Aufbau verschiedener natürlich vorkommender und synthetischer Xanthinderivate

Name	R	R'	R''	R'''
Coffein	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃
Theophyllin	H	H	CH ₃	CH ₃
Theobromin	H	CH ₃	H	CH ₃
Paraxanthin	H	CH ₃	CH ₃	H
3,7-Dimethyl-1-propargylxanthin	H	CH ₃	CH ₂ CCH	CH ₃
3-Isobutyl-1-methyl-xanthin	H	H	CH ₃	C(CH ₃) ₃
7-Isobutyl-1-methyl-xanthin	H	C(CH ₃) ₃	CH ₃	CH ₃
8-(2-Hydroxyethylamino)-coffein	NH-CH ₂ -CH ₂ -OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃

Aus Publikationen von Klosa¹⁵⁷ und Krugmann¹⁵⁸ ist bekannt, dass 8-Bromcoffein (8-BC), ein Brom-Derivat des Coffeins, eine Affinität zum RyR-Kanal besitzt und ähnliche pharmakodynamische Eigenschaften wie Coffein ausübt. Ebenfalls zeigen Experimente von Meissner¹⁵³ das selbst sterisch anspruchsvolle Derivate eine Freisetzung von Calciumion induzieren können, wie die natürlichen Xanthine. Somit wurde das Xanthin-Grundgerüst als Ausgangspunkt für die EPR-Sondendarstellung verwendet und jeweils EPR-aktive Derivate aus den Xanthinen: Coffein, Theophyllin, Theobromin dargestellt.

Für Coffein wurde analog zu 8-BC die Position 8 Verknüpfungspunkt als gewählt, bei Theophyllin die Position 7 im Xanthin-Grundgerüst. Für Theobromin wurde die Position 1 gewählt, da dieses Stickstoffatom ausreichend acide ist, um an dieser Stelle Reaktionen zu ermöglichen. Somit ergeben sich zwei Derivate mit veränderten Imidazolgruppen und ein Derivat mit unveränderter Imidazolgruppe im Gegensatz zum natürlich vorkommenden Xanthin. Für die Darstellung der Sonden war ein *Spacer* zwischen EPR-Sonde und Xanthin-Grundkörper notwendig. Zwar kann es durch den größeren Abstand zwischen beiden Molekülteilen es zu einer Verschlechterung der Analyse kommen, (Rotationsdynamik wird durch die variable Kohlenstoffkette verändert bzw. kann die mögliche Bindung des Xanthin-Gerüsts nicht weitergeben). Jedoch war dieser Schritt notwendig, i) da nur Kohlenstoff basierte Substituten als pharmakologische aktiv deklariert wurden,^{153,156} Heteroatome des TEMPO würden zu einer deutlichen Veränderung der Hydrathülle um das gesamt Molekül beitragen und könnten damit die Affinität verändern. Jedoch bedeutender ist ii), das TEMPO bzw. die hier verwendeten Carboxy-TEMPO und Hydroxyl-Tempo (TEMPOL), bei den für die Kopplung an das Xanthingerüsts notwendigen Temperaturen in polaren Lösungsmittel nicht

stabil sind. Für die Planung musste dabei beachtet werden, welche Reaktionsschritte hohe thermische Aktivierung benötigen und welche Reaktanden temperaturempfindlich sein könnten. So sind beispielsweise für Reaktionen am Xanthingerüst hohe Temperaturen von Vorteil, um die Reaktionszeit zu verkürzen und ungewollte Nebenreaktionen zu unterdrücken.¹⁵⁸ Die zuvor betrachteten Xanthinderivate sind dabei in einem Temperaturbereich bis 200 °C problemlos stabil. Als Referenz können dazu die Schmelzpunkte betrachtet werden: 8-Bromocoffein schmilzt bei 209 °C,¹⁵⁹ Theophyllin bei 275 °C¹⁶⁰ und Theobromin bei 345 °C¹⁶¹, ohne dass eine Zersetzung eintritt. Um die Spin-Label nur milden Temperaturen auszusetzen, wurden daher im ersten Schritt die Xanthinderivate bei den benötigten Reaktionsbedingungen alkyliert und im zweiten Schritt die Spin Label bei milden Bedingungen mit den Alkylketten gebunden. Die verwendeten Reaktionssettings und theoretischen Überlegungen wurden durch Vortests bestätigt: die Radikalaktivität war in den Vortests durch die Kombination aus Temperatur und Co-Reagenzien auf einen nicht messbaren Wert gesunken, auch eine Reaktivierung war nicht mehr erfolgreich. Somit wurde, wie oben beschrieben, die Synthese als eine zwei stufige Synthese für die Darstellung der EPR aktiven Xanthin Sonde zusammengesetzt.

In Stufe 1 erfolgte die Kopplung des *Spacers* über eine nukleophile Substitution an das Xanthin-Grundgerüst.

In Stufe 2 erfolgte die Darstellung/Kupplung der TEMPO Derivate über eine Steglich-Veresterung bzw. eine Williamson-Ether Synthese.

Stufe 1: Kopplung des Spacer an das Xanthin-Grundgerüst

Für die coffeinbasierte Sonde, wurde als Edukt das 8-Bromocoffein verwendet, da Brom bzw. das Bromid eine gute Abgangsgruppe ist ($pK_s = -9$).^{162,163} Die Kupplung erfolgt mit einem Amino-Ethanol bzw. Amino-Propanol in einem polaren Lösungsmittel. Da Amine unter den gewählten Bedingungen eine deutliche höhere Affinität zur Substitution am Brom-Derivat haben als der Alkohol ist eine Dimerisierung oder andere Nebenprodukte/Nebenreaktionen vernachlässigbar.

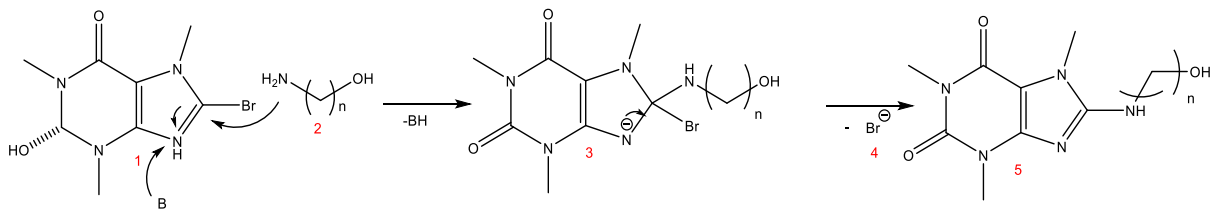


Abbildung 41 Mechanismus der Aminierung des 8-Bromcaffeins (1) durch einen Aminoalkohol (2), mit dem anionischen Zwischenprodukt (3), einem Bromid-Ion als Abgangsgruppe (4) und (5) den Produkten (RYR-1,RYR-2)

Für das Theophylinderivat wurde ein Brom-Ethanol verwendet, hier erfolgt die nukleophile Substitution des Bromethanols durch das Stickstoffatom in Position 7 des Xanthin Körpers. Da das Bromid-Ion durch seine Größe (und im Verhältnis dazu geringen Ladung) zu den weichen Ionen¹⁶⁴ zählt, sind besonders polare aprotische Lösungsmittel geeignet, um es zu stabilisieren und damit seine Abgangstendenz zu erhöhen.¹⁶⁵

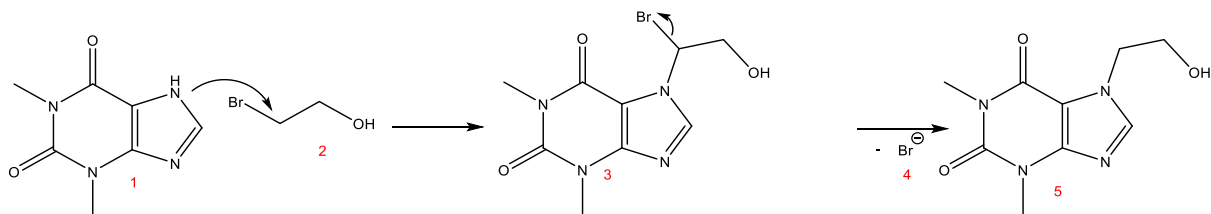


Abbildung 42 Mechanismus der Aminierung des Bromethanol durch das Theophyllin mit dem anionischen Zwischenprodukt, einem Bromid-Ion als Abgangsgruppe und dem Produkt RYR-3

Für beide oben genannten Substitutionsreaktionen waren polare bzw. protische polare Lösungsmittel und Temperaturen von 120-140 °C notwendig. Im Falle von 8-Bromcaffein (8-BC) kam es durch die Kopplung zur Darstellung einer Guanidin-Gruppe, welche als starke Base bekannt ist und nur über eine hohe energetische Einwirkung aufgespalten werden kann.

Für Theobromin-Derivat: konnte nicht der gleiche Weg wie bei Theophyllin gefahren werden, da der Stickstoff an Position 1 durch die benachbarten elektronenziehenden Carbonyl-Gruppen so deaktiviert war, dass die Reaktion mit Brom-Ethanol nicht erfolgreich verlief. Die Abänderung der Reaktionsbedingungen zwang eine Neubewertung des Spacers und des Tempo-Derivates. Mittels Verwendung von 1-Brom-2-Chlorethan konnte nun Produkt in hinreichender Menge darstellt werden. Die Verwendung eines heterogene Doppelhalogendialkans erlaubt die selektive Kupplung bei Beibehaltung der höheren Temperaturen und höheren Reaktionskonzentrationen, jedoch benötigt dieses ein striktes Einhalten der weiteren Reaktionsbedingungen. Sodass das sekundäre Amin auf den α -Kohlenstoff beginnt und das Bromid als bessere Abgangsgruppe diese Reaktion befördert. Das

weniger nukleophile Chlor verbleibt dann für den zweiten Teilschritt der Synthese am Produkt. Die Wahl auf ein heterogenes Doppelhalogenalkan ist darauf zurück zu führen, dass die Halogene einander einen Elektronen ziehenden Effekt ausüben, somit sind die mittelständigen Kohlenstoffatome nochmals stärker partiell positiv, was deren Reaktivität erhöht.

Stufe 2: Kupplung der TEMPO-Derivate via Steglich Veresterung bzw. Williamson Ether Synthese

Coffein / Theophyllin - Derivate

Steglich-Veresterung

Die von Neises und Steglich¹⁶⁶ publizierte und als Steglich-Veresterung bekannt gewordene Reaktion stellt eine schonende Form der Veresterung von Alkoholen und Carbonsäuren dar. Anders als die von Fischer¹⁶⁷ beschriebene Veresterung kommt die Steglich-Veresterung ohne starke Säuren, insbesondere Mineralsäuren und ohne hohe Temperaturen aus.^{162,168} Durch die Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) als Carbonsäureaktivator und 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) als Hilfsbase können selbst empfindliche und sterisch anspruchsvolle Veresterungen bei milden Temperaturen stattfinden.^{169,170}

Hierbei bildet das DCC mit der Carbonsäure zunächst ein O-Acylisoharnstoff aus, dieser reagiert mit dem DMAP zu einem N-N'-Dicyclohexylharnstoffanion und einem N-Acylpyridiniumion.^{169,170} Dieser ist eine „aktive Carbonsäure“ und somit reaktiver als die alleinige Carbonsäure. Somit kann der Alkohol leichter nukleophil angreifen. Das tetraedrische Zwischenprodukt spaltet sich bei erfolgreicher Reaktion in eine N-N'-Dicyclohexylharnstoffanion und den gewünschten Ester. DMAP tritt hier klassisch nach Definition als Katalysator auf und steht für einen weiteren Zyklus zur Verfügung, das entstandene Reaktionswasser kann unter Bildung eines N-N'-Dicyclohexylharnstoffes vom DCC aufgenommen werden. Übliche Lösungsmittel für die beschriebene Reaktion sind aprotische, polare Lösungsmittel wie z.B. DMF, THF.

Um Nebenproduktbildung und ein Abreagieren zu minimieren, wurde bei der Zugabe des DCC (in DMF gelöst), das Gemisch von DMF und Carbonsäure (Carboxy-TEMPO) auf 0°C heruntergekühlt. Nach vollständiger Zugabe des gelösten DCC erfolgte das langsame

erwärmen auf Raumtemperatur und langsamen Zutropfens von in DMF gelösten Xanthin-Derivaten. Nach ausreichender Reaktionszeit wurde die Reaktion nach bekannten Schemata aufgearbeitet.

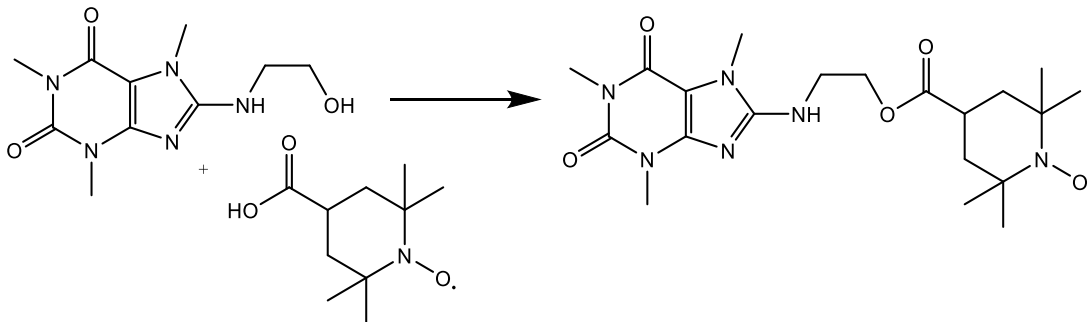


Abbildung 43 Reaktionsschema einer Kopplung nach Steglich Reaktion von RYR-1 und Carboxy-TEMPO zum EPR-aktiven Produkt, RYR-5; allgemeingefasste Steglich-Reaktion ist im Anhang zu finden.

Theobromin Derivat

Williamson-Ether Synthese

1851 beschrieb A. Williamson^{171,172}, die nach ihm benannte Reaktion eines Bromalkans mit einem Alkoholat. In „Über die Theorie der Etherbild“¹⁷¹ berichtet er über diese neuartige Synthese, welcher er auf dem Weg zur Synthese neuer Alkohole entdeckte. Zuvor war es nur möglich Ether, insbesondere symmetrische Ether über die Reaktion zweier Alkohole unter Einbeziehung von konzentrierter Schwefelsäure zu dehydratisieren. Die Williamson-Ether Synthese gilt heute zu den meist verwendeten Etherdarstellungsmethoden unter Laborbedingungen und besitzt, nach wie vor eine große Relevanz. Der grundlegende Mechanismus liegt einer S_N2 -Reaktion zugrunde. Hierbei deprotoniert eine starke Base den beteiligen Alkohol. Dieses Alkoholat greift folgend den partiell positiv geladenen Kohlenstoff eines Halogenalkans an. Das Halogenid, häufig und hier verwendet, das Bromid-Ion, verlässt als beste Abgangsgruppe den Intermediatzustand, wodurch ein Ether entsteht.^{173,174} Für Ethersynthesen dieser Art bietet sich oft der Edukt-Alkohol als Lösungsmittel an. Alternativ kann die Reaktion in einem aprotischen, polaren Lösungsmittel, wie DMF oder DMSO durchgeführt werden.

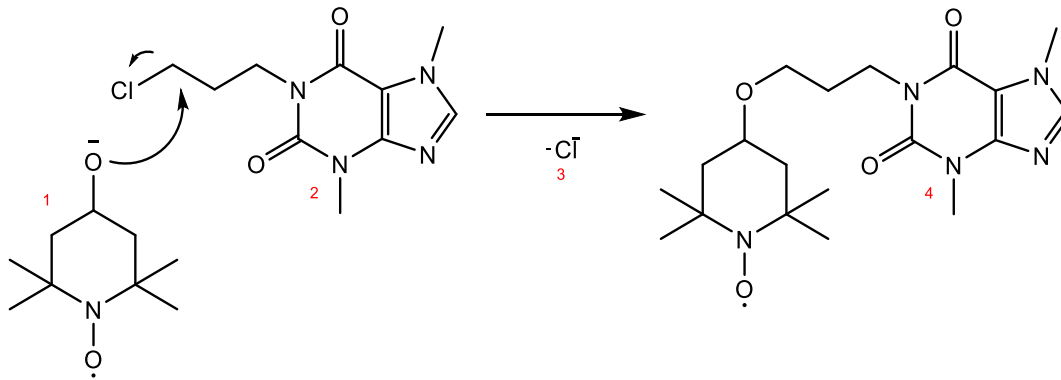


Abbildung 44 Mechanismus der Williamson-Ethersynthese mit dem angreifenden Alkoholat-Ion (1), dem Halogenalkan (RZR-4) (2), dem Chlorid-Ion (3), als Abgangsgruppe und dem Ether (4) als Produkt, RZR-8

Üblicherweise erfolgt über eine starke Base (Alkalimetallen, Alkalimetallhydride, Alkalimetallbasen) die Bildung des Alkoholats mit dem Alkohol als Lösungsmittel, dem wird tropfenweise das Halogenalkan dazugegeben und unter trocknen Bedingungen sowie üblicherweise inerte Atmosphäre, unter Rückfluss gekocht.

Da Hydroxyl-TEMPO (TEMPOL) als bei Raumtemperatur in fester Form ist, kann es für die folgenden Reaktionen nicht als Lösungsmittel verwendet werden, somit ist ein weiteres Lösungsmittel notwendig z.B.: DMF. So wurde die folgenden Synthesen nach dem Schema von Lösen des TEMPOL und der Zugabe von Natriumhydrid als starke Base unter Einhaltung der Temperatur das Halogen-Xanthin-Derivat ebenfalls ins DMF gelöst hinzugegeben.¹⁷³ Nach einer ausreichenden Reaktionszeit wurden die Reaktionen nach bekanntem Schema aufgearbeitet.

4.2.2. präparativer Abschnitt

Die detaillierten Syntheseschritte werden im Anhang beschrieben. Dort befindet sich ebenfalls die dazugehörige Syntheseanalytik. (siehe Anhang Kapitel 8.2.)

Aus der präparativen Synthese ergeben sich vier, EPR-aktive Xanthin Derivate. RZR,5, RZR-6, RZR-7, RZR-8. Diese sind in der folgenden Tabelle und Abbildung gezeigt.

Tabelle 5 Abkürzung, IUPAC Bezeichnung der synthetisierten EPR aktiven RyR-Liganden

Abkürzung	IUPAC	EPR-Aktive Sonde	Xanthin-Derivat
RYR-5	2-((1,3,7-trimethyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8yl)amino)ethyl-2,2,6,6-tetra-methylpiperidine-1-oxyl-4-carboxylate;	Carboxy-TEMPO	Coffein
RYR-6	2-((1,3,7-trimethyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8yl)amino)propyl-2,2,6,6-tetra-methylpiperidine-1-oxyl-4-carboxylate	Carboxy-TEMPO	Coffein
RYR-7	3-((1,3,7-trimethyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)amino)propyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl-4-carboxylate	Carboxy-TEMPO	Theophylin
RYR-8	1-(3-((2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)oxy)propyl)-3,7-dimethyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6dione	Hydroxyl-TEMPO	Theobromin

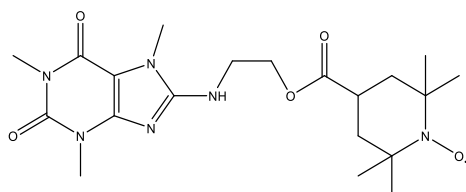
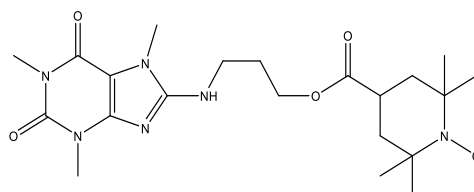
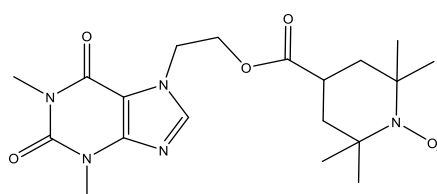
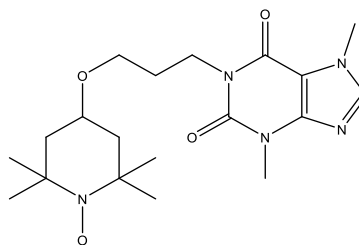
RYR-5**RYR-6****RYR-7****RYR-8**

Abbildung 45 EPR aktive Xanthinderivate: A 2-((1,3,7-trimethyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8yl)amino)ethyl-2,2,6,6-tetra-methylpiperidine-1-oxyl-4-carboxylate; **RYR-5**; B 2-((1,3,7-trimethyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8yl)amino)propyl-2,2,6,6-tetra-methylpiperidine-1-oxyl-4-carboxylate; **RYR-6**; C 3-((1,3,7-trimethyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)amino)propyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl-4-carboxylate; **RYR-7**; D 1-(3-((2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)oxy)propyl)-3,7-dimethyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6dione **RYR-8**

4.3. EPR Analytik der EPR aktiven Xanthin Derivate

Nach erfolgreicher Synthese und Syntheseanalytik der EPR aktiven Xanthin-Derivate, behandelt der folgende Abschnitt die Charakterisierung der Derivate mittels cwEPR-Spektroskopie. Um die relevanten Parameter für folgende Proteinanalytik auszuloten und die nötigen cwEPR X-Band / Q-Band Simulation durchzuführen.

In verschiedenen Publikationen^{175,176} ist bereits dokumentiert, dass die Rotationsdynamik eines Systems mit steigender Viskosität abnimmt. Dies ist das Ergebnis der eingeschränkten Bewegungsfreiheit der Moleküle, die sich durch eine zunehmende Raumbelastung oder durch die Interaktion mit anderen viskositätserhöhenden Molekülen ergibt. Im Gegensatz zu Polymeren, die ihr Lösungsmittel innerhalb ihrer Struktur aufnehmen oder an sich binden, was zu einer erhöhten Viskosität führt, ist das niedermolekulare Glycerol dafür bekannt, dass es in wässrigen Medien ein „träges Netzwerk“ durch H-Brückenbildung mit Wasser und anderen Glycerolmolekülen bilden.^{177,178} Diese Eigenschaft des Glycerols wird in der EPR-Spektroskopie gerne genutzt, um die Rotationsdynamik neuer oder innovative EPR-Sonden zu untersuchen. Die meisten Sonden zeigen bei hohen Rotationsgeschwindigkeiten isotrope Rotationen, jedoch differenzieren sich die Eigenschaften der Sonden mit zunehmender Rotationsverlangsamung. Das Hinzufügen von Glycerol stellt hierbei eine effektive und reproduzierbare Methode dar, die zur Rotationsverlangsamung durch Viskositätserhöhung führt. Im Folgenden wird dargestellt, wie sich die Rotationsdynamik der Xanthin-Derivate im Vergleich zu den Edukt-EPR-Sonden mit steigendem Glycerolanteil verändert.

Des Weiteren geben die durchgeführten Messungen Aufschluss darüber, welchen Einfluss eine Erweiterung des Spacers oder Veränderungen der Verknüpfungsposition am Grundkörper des Xanthins auf Rotationsverschiebungen haben können.

4.3.1. Senkung der Rotationskorrelationszeit (τ_c) bei Zugabe von Glycerol

Wie erwartet, zeigt sich durch Erhöhung der Glycerolkonzentration eine Verlangsamung der Rotation der EPR-Sonden. Die Unterschiede manifestieren sich in der Stärke dieser Verlangsamung sowie in einer interessanten Erscheinung bei einer Sonde, dem Auftreten einer zweiten Rotationsspezies, wie es z.B. in Abbildung 46 zu sehen ist.

Zunächst zeigen die EPR Sonden TEMPOL und Carboxy-TEMPO nur einen moderaten Einfluss der Glycerols auf deren Rotationsdynamik, welches sich in einem τ_c von 17,9 ps bei 0% zu

122,8 ps bei 60% bzw. bei Carboxy-TEMPO von 24,7 ps auf 182,71 ps widerspiegelt. Die Sonden sind sehr kompakt und haben somit die Möglichkeit bei den engen Packungsverhältnissen bei 60% Glycerolanteil sich ausreichend frei in alle Raumrichtungen zu bewegen.

Die Abbildung 46 und Tabelle 6 zeigt die Rotationskorrelationszeiten τ_c in Abhängigkeit des Glycerolanteils der EPR aktiven Xanthin-Derivate. Hier ist im Verlauf erkennbar, dass die durch die höhere Glycerolkonzentration bewirkte erhöhte Viskosität, die die Rotationsdynamik der Sonden verlangsamt. Des Weiteren ist zu sehen, dass diese Beeinflussung je nach Sonde unterschiedlich ausgeprägt ist. RYR-8 Theobromin an TEMPOL rotiert deutlich schneller als die Theophyllin- bzw. Coffein-Derivate, dennoch zeigt es eine Verlangsamung der Rotation durch das Glycerol um der Faktor 12,5 (RYR-8 X-Band; 0% Glycerol 45,24 ps; 60% Glycerol 565,5 ps). RYR-8 ist nicht nur größer als TEMPOL, es besitzt am Xanthin-Grundkörper einige heterogene Atome, welche als Wasserstoffbrückenbindung (HBB) Donoren bzw. Akzeptoren am HBB Netzwerk des Wasser-Glycerol-Netzwerkes^{177,178} teilnehmen können.

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei den auf Coffein basierenden Sonden RYR-5 und RYR-6. Der Einfluss ist hier ebenfalls deutlicher zu erkennen, als bei der reinen Sonde (Carboxy-TEMPO). Diese Eigenschaft kann ähnlich wie bei RYR-8 der Molekülgröße und dem -aufbau als auch den Heteroatomen im Molekülgerüst zugeschrieben werden. Insgesamt ist jedoch die Rotation um den Faktor 5,48 gehemmt. (RYR-5 X-Band, 0% Glycerol 130,63 ps; 60% Glycerol 715,90 ps). Dies ist eine bedeutendere stärkere Hemmung der Rotation als bei RYR-8 (0% Glycerol 562 ps). Ein Grund dafür könnte die Rotationseinschränkung der Esterbindung sein bzw. die Tatsache, dass die Carbonyl-Gruppe im Ester selbst als HBB-Donor aktiv sein kann. Somit wäre diese Wechselwirkung deutlich näher an der Nitroxid-Gruppe als sie es bei der Etherverbindung RYR-8 wäre.

Das Theophyllin-Derivat RYR-7 zeigt hier eine Besonderheit. Für die Simulation des RYR-7 mussten zwei spektrale Komponenten genutzt werden, daraus kann geschlossen werden, dass sich die Sonde in zwei Rotationsspezies befindet. Diese Trennung in zwei spektrale Spezies erfolgt, wenn die einzelnen Sonderspezies unterschiedliche Umgebungen vorfinden und detektieren. Hierbei können charakteristische EPR-Spektroskopische Parameter wie z.B. A-Tensor, die Linienbreite, D-Tensor, Eulerwinkel oder Heisenberg-Effekt differenziert sein. In dem hier vorliegenden Fall liegt die Differenz in den D-Tensoren und der Adaption der Linienbreite, somit in dem Rotationmodus der Sonden, vor. Das bedeutet, dass die einzelnen

Spezies eine ähnlich polare Umgebung vorfinden, die sich jedoch deutlich in ihrer Fluidität unterscheidet. Wie aus anderen Studien^{177,178} bekannt, bilden Wasser/Glycerol-Gemische Cluster-Systeme aus. Diese Cluster unterscheiden sich in der Konzentration von Wasser und Glycerol im jeweiligen Bereich. Die Wassercluster können als geordnete Strukturen, welche fast ausschließlich aus Wassermolekülen bestehen, bezeichnet werden. Die Glycerolcluster bilden ebenfalls Strukturen mit hoher Konzentration an Glycerol aus, die über dem generellen Mischungsverhältnis liegen. Zudem liegt eine dritte Komponente von amorphen Gebieten vor, in der Wasser und Glycerol durchmischt sind. Das RYR-7 detektiert für diese Gebiete jeweils eine ähnliche Hydrophilie bzw. HBB-Struktur, jedoch je nach Gebiet eine unterschiedliche Viskosität.

Dies zeigt die Abbildung 46, im X-Band steigt die Rotationskorrelationszeit der zweiten spektralen Komponente (langsamen Komponente) überproportional an (241,29 ps bei 0%, 1568,39 ps bei 60%), während die erste spektrale Komponente (schnelle Komponente) von 116,18 ps bei 0% auf 241,29 ps bei 60% nur moderat ansteigt. Ähnliches zeigt sich im Q Band, hier kommt es jedoch erst im Bereich von 20% zu 40% Glycerolanteil zu einer Aufspaltung der spektralen Komponenten. Das Q-Band Spektrometer reagiert durch die höhere Messfrequenz (34 GHz) auf schnellere Regime empfindlicher, somit werden die schnellen Rotationen deutlicher angezeigt als die langsameren. Da jedoch im X-Band von 20% zu 40% ein deutlicher Sprung der zweiten Komponente von τ_c 313,67 ps zu 1045,6 ps verzeichnet werden kann, lässt dies die Vermutung zu, dass sich erst ab einer Konzentration von über 20% Glycerolanteil großflächige Glycerol-Cluster ausbilden, die hinreichende Konzentration der EPR-Sonde enthalten um eine Signalveränderung zu bewirken.

RYR-7 ist offensichtlich als einzige Sonde in der Lage diese Cluster durch Speziestrennung zu detektieren. RYR-5, RYR-6, RYR-8 verblieben hingegen vollständig im spektralen Einkomponentensystem, welches als Querschnitt der gesamten Probenumgebung angesehen werden kann.

RYR-7 ist ähnlich den RYR-5, RYR-6, mit einem Ethyl-Spacer und dem Carboxy-TEMPO aufgebaut, der Spacer sitzt an Position 7 der Xanthin-Körpers. Wodurch die Imidazol Gruppe zwar alkyliert wurde, jedoch das Ringsystem in Takt geblieben ist. Somit bleibt eine gewisse Basizität des Stickstoffs an Position 9 erhalten. Dieser kann am HBB-Netzwerk teilnehmen, das aus der Reaktion entstandene Guanidin des RYR-5, RYR-6 ist trotz seiner Position im Molekül weiterhin als starke Base zu deklarieren. In Wasser wäre somit die Bildung einer großen

Hydrathülle, in welcher das gesamte Molekül nun eingehüllt ist, durchaus denkbar. Diese Hülle bewirkt, dass die Sonde ggf. unempfindlicher gegenüber den Einflüssen der Lösungsmittel-Cluster ist.

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass die Sonden auf die Zugabe von Glycerol jeweils mit einer Rotationsverlangsamung oder, wie später ausgeführt, durch die Veränderung des Rotationsmodus reagieren.

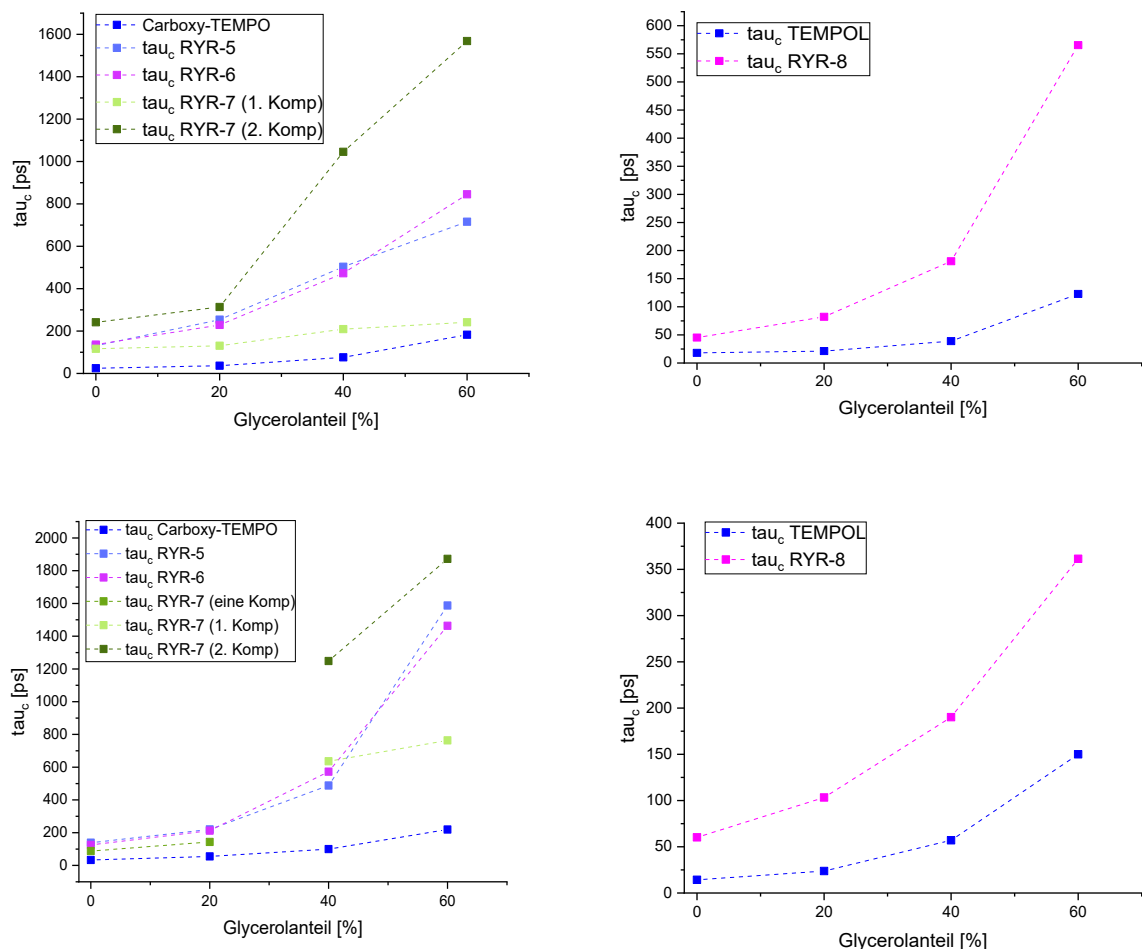


Abbildung 46 Plots der τ_c – Korrelationszeit τ_c gegen Glycerol Konzentration. A X band; Carboxy-Tempo und Xanthin-Sonden mit Carboxy-Tempo Spinlabel; B X-Band TEMPOL und Xanthin-Sonde mit TEMPOL-Spinlabel; C Q band; Carboxy-Tempo und Xanthin-Sonden mit Carboxy-T

Tabelle 6 spektraler Anteil RYR-7 in X und Q Band

Glycerolanteil	0 %	τ_c	20%	τ_c	40%	τ_c	60%	τ_c
Schnelle, 1. Komponente	66,7	1,16E-10	54,5	1,30E-10	36,4	2,09E-10	25	2,41E-10
Langsamere 2. Komponente	33,3	2,41E-10	45,5	3,13E-10	63,4	1,0E-9	75	1,56E-9

4.3.2. Einfluss der Spacerlänge auf die Rotationsdynamik

In diversen Affinitätsmessungen zwischen EPR-Sonden und Proteinen wurde deutlich, dass bereits ein Unterschied in der Kettenlänge von einem Kohlenstoffatom ausreichen kann, um die Akzeptanz des Proteins gegenüber dem Liganden zu beeinflussen.^{122,179} Vor diesem Hintergrund und der Überlegung, dass die Variation der Spacerlänge auch einen Einfluss auf die Eigenrotation des Liganden haben könnte, wurden für die Untersuchungen am RYR-Kanal zwei Varianten des EPR-Coffein-Derivats einbezogen. Zum einen eine Variante mit einem Ethyl-Spacer zwischen Position 8 des Xanthingrundgerüsts und dem Carboxy-Tempo. Zum anderen eine Variante mit einem Propyl-Spacer zwischen Xanthingrundgerüst und Carboxy-TEMPO.

Wie in den Grafiken (Abbildung 46) zu sehen ist, sind die beiden Coffein-Derivate sehr ähnlich, was durch die durchgeführten Simulationen (Matlab, EasySpin) untermauert wurde (siehe Anhang). Für die Sonden konnte nahezu der gleiche Parametersatz verwendet werden, wie im Anhang detailliert aufgeführt. An dieser Stelle soll jedoch der Fokus auf den D-Tensoren liegen. Diese sind im Parametersatz gleich oder ähnlich, weisen jedoch geringfügige Unterschiede in ihrer Rotationskorrelationszeit von τ_c auf (siehe Tabelle 7).

Es lässt sich keine sichere Ableitung ziehen, dass RYR-5 (Ethyl-Spacer) möglicherweise schneller rotiert als RYR-6 (Propyl-Spacer). Es zeigt sich auch, dass die Moleküle um die D_{zz} -Achse am schnellsten rotieren. Die z-Achse, die durch die N-O-Linie verläuft, ist eine theoretische Achse (d-Frame), die mithilfe der Euler-Hilfswinkel in das reale System (g-Frame) überführt werden muss. Die Simulationen mit Carboxy-Tempo hatten die Euler-Tensoren $[0 \ 50 \ 0]$, wodurch die NO-Achse um 50° um die y-Achse gekippt wurde, wie es in Abbildung 47 dargestellt. Der Rotationskegel zeigt, dass das Tempo-Derivat hier die größte Rotationsfreiheit besitzt und sich somit am schnellsten um seine Achse drehen kann.

Somit lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die Sonden als äquivalent betrachtet werden können und eine Veränderung der Spacerlänge kaum Auswirkungen auf die Messergebnisse hat. Dies schließt jedoch nicht aus, dass bei weiterführenden Protein-EPR-Sonden-Messungen die Spacerlänge einen Einfluss auf die Akzeptanz der Sonde durch das Protein haben könnte oder es zu Veränderungen in der Bindungsaffinität kommen könnte.

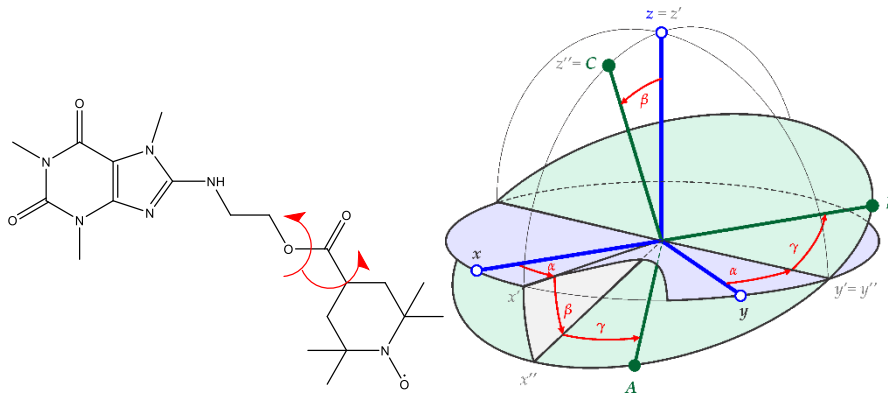


Abbildung 47 Links: schematische Darstellung der Rotationsfreiheiten an der Estergruppe von RYR-5; Rechts: schematische Darstellung des spektralen (d-Frame) zum reellen System (g-Frame) über die Eulerhilfswinkel, dargestellt von xyz (d-Frame) in ABC (g-Frame)¹⁸⁰

Tabelle 7 D Tensoren von Carboxy-TEMPO und den Carboxy-TEMPO Derivaten RYR-5, 32,42. jeweils in realen Verhältnis und im relativen Verhältnis

	reales Verhältnis			relatives Verhältnis			β -Eulerwinkel
	D_{xx}	D_{yy}	D_{zz}	D_{xx}	D_{yy}	D_{zz}	
RYR-5 0% Gly.							
X Band	7,50E8	7,50E8	3,68E9	1	1	4,9	50°
Q Band	7,12E8	7,12E8	3,42E9	1	1	4,8	50°
RYR-6 0% Gly.							
X Band	7,20E8	7,20E8	3,52E9	1	1	4,9	50°
Q Band	7,87E8	7,87E8	3,78E9	1	1	4,8	50°
RYR-7 0% Gly.							
X-Band 1. Komp.	2,7E8	2,7E9	4,05E9	1	10	15	50°
X-Band 2. Komp.	1,3E8	1,3E9	1,95E9	1	10	15	50°
Q-Band, ≤ 20% Gly.	3E8	3E9	7,5E9	1	10	25	50°
Q-Band, ≥ 40% Gly. 1. Komp.	4,8E7	4,8E7	7,8E9	1	1	162,5	50°
Q-Band, ≥ 40% Gly. 2. Komp.	4,2E7	4,2E7	1,35E9	1	1	32,1	50°
Carboxy-TEMPO							
X Band	4,4E9	8,1E9	8,5E9	1	1,8	1,9	50°
Q Band	3,3E9	1,2E10	3,3E9	1	3,6	1	50°

4.3.3. Einfluss der Spacerposition auf die Rotationsdynamik

Tatsächlich kann nicht nur die Länge des Spacers, sondern auch der Anknüpfungspunkt an das Grundgerüst einen entscheidenden Einfluss auf die Rotationen und die Wechselwirkungen mit der Umgebung haben, folglich auch einen Einfluss auf eine spätere Protein-Ligand-Interaktion. Dies wird besonders deutlich beim Vergleich von RYR-7 und RYR-5. Beide weisen einen Ethyl-Spacer auf, jedoch erfolgt die Verknüpfung mit dem Xanthin-Gerüst an unterschiedlichen Positionen. Diese Variation stellt eine zusätzliche variable Einflussgröße dar. Während das RYR-5, Coffein-Derivat, (Substitution an Position 8) eine rhombische Rotation aufweist, ($D_{xx} = D_{yy} < D_{zz}$), zeigt das RYR-7, Theophylinderivat (Substitution an Position 7), eine anisotrope Struktur $d_{xx} \neq D_{yy} \neq D_{zz}$, wie es in Tabelle 7 zu sehen ist. Somit kann man postulieren, dass der Anknüpfungspunkt an Position 7 im RYR-7 zu einem Taumeln des Moleküls führen könnte, welches sich in dieser anisotropen Rotation widerspiegelt. Im Theobromin-Derivat, dem RYR-8 liegt der Anknüpfungspunkt an Position 1 und somit am Purin- statt am Imidazolbereich des Xanthin-Grundgerüsts. Die Rotation liegt hier im rhombischen System, hier ist jedoch die D_{xx} -Achse als schnellste Achse zu betrachten, dies liegt am verwendeten TEMPOL, welches im Gegensatz zum Carboxy-TEMPO und der daraus resultierenden Esterverbindung nicht um 50° gekippt ist, sondern auch am nicht verwendeten Euler Hilfswinkel. Sowohl Carboxy-TEMPO, als auch RYR-5, RYR-6, RYR-7 sind mit je einem β -Eulerwinkel von 50° simuliert worden. Dies entspricht einem Kippen der NO-Achse über y um 50° .

4.3.4. Einfluss der EPR-Sonde auf die Rotationsdynamik

Der dritte variable Parameter in dieser Betrachtungsserie ist die verwendete EPR-Sonde an sich. Während für RYR-5, RYR-6, und RYR-7 jeweils Carboxy-TEMPO verwendet worden ist, wurde für RYR-8 aus synthetischen Gründen TEMPOL genutzt. Sowohl beim reinen Carboxy-TEMPO, als auch bei den daraus synthetisierten Derivaten ist jeweils die Dzz-Achse die am schnellsten rotierende Achse. Zudem musste ein β -Euler von 50° berücksichtigt werden. Es kommt somit durch das Vorhandensein des Xanthins am Carboxy-TEMPO nicht zu einer grundlegenden Veränderung des Rotationsmodus. Ob dies am Spacer oder an der erhöhten Rotationsfreiheit der Esterbindung liegt ist hier nicht zu erkennen.

Wie Lajzerowicz-Bonnetau¹⁸¹ beschrieb, kann sich bei Nitroxidsonden in Abhängigkeit ihrer Molekülpartner ihr Rotationsmodus ändern. Bei TEMPOL und dessen Derivat (RYR-8) ist dies hier geschehen, hier kippt die schnellste Achse und entsprechend der β -Eulerwinkel.

Für eine mögliche Erklärung muss man die Konformationstheorie des Cyclohexanrings zur Hilfe nehmen. Bereits Hunold⁸ setzten die Grenzkonformation der EPR-Radikale in Zusammenhang mit ihrem Rotationsmodus. TEMPO in Wasser bevorzugt die Sesselkonformation, TEMPONE die Twist-Ring Konformation. Das hier verwendete TEMPOL ist durch seine Kohlenstoffhybridisierung dem TEMPO ähnlicher als dem TEMPONE mit dessen Carbonyl-Gruppe. Da für TEMPO in Wasser und TEMPOL in Wasser ein typischer β -Eulerwinkel von 50° bei schnellster Rotation um Dzz-Achse angenommen wird,¹⁸² kann daher vermutet werden, dass das TEMPOL ebenfalls die Sesselkonformation bevorzugt. Diese Präferenz könnte daher rühren, dass die Methylgruppen an Position 3 und 5 somit voneinander wegzeigen. Ebenso bietet diese Konformation der Alkoholgruppe, sowie der Nitroxidgruppe den meisten Platz.

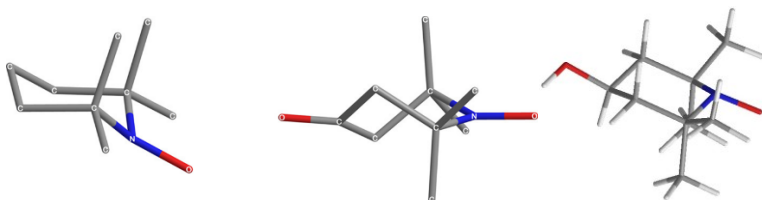


Abbildung 48 Strukturformel in der bevorzugten Ringkonformation von TEMPO (links); TEMPONE (mitte) und TEMPOL (rechts) Struktur gemäß den X-Ray Daten von Hunold⁸

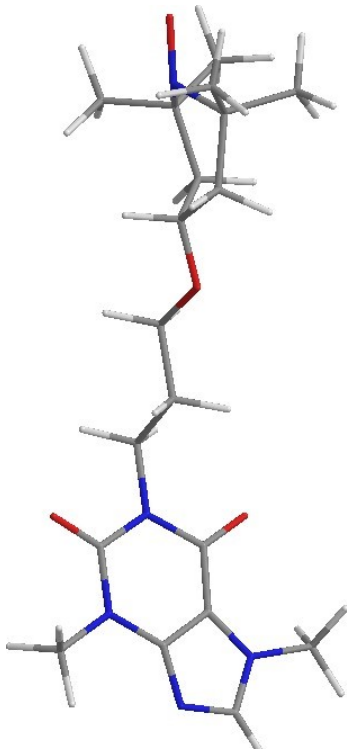


Abbildung 49 grafische Darstellung des energetischen Minimums des RyR45, Berechnung Chem3D, TEMPOL-Körper in verzerrter Wannenkongformation

Im Gegensatz dazu ist im Theobromin-Derivat RYR-8 das TEMPOL über eine Etherbindung an den Spacer und das Xanthin-Grundgerüst gebunden. Dadurch ist es den Wechselwirkungskräften, z.B. des Xanthins zugänglich. Hier ist insbesondere die Rotationseinschränkung durch die Etherbindung sowie die Raumbeanspruchung bzw. elektrostatische Wechselwirkung dieses Teilmoleküls zu beachten (Abbildung 49). Die TEMPOL-Gruppe ist nicht mehr in der zuvor beschriebenen Sesselkongformation, sondern in einer eher verzerrten Wannenkongformation.

Dadurch sind nun die NO-Achse der Nitroxidgruppe und die Alkoholgruppe nicht mehr wie bei Sesselkongformation typisch parallel zu einander, (samt typischen β -Eulerwinkel 50°). Stattdessen drängt sich die Nitroxidgruppe in selbige Richtung, vom Xanthin-Grundkörper abwendend, um ausreichend Raumfreiheit zu erlangen.

Die EPR-spektroskopischen Daten zeigen diese verzerrte Wannenkongformation durch die Verschiebung des Rotationsmodus. Das Derivat RYR-8 hat in den Simulationen die schnellste Achse auf der Dxx-Achse bei einer Eulerkomposition von [0 0 0]. Das bedeutet, dass der d-Frame und der g-Frame übereinanderliegen. Ebenso bedeutet dies, dass das Molekül entlang der NO-Achse am schnellsten rotiert. Da nun die Nitroxid- und Alkohol-Gruppe auf einer Rotationsachse liegen und die Methylgruppe einen größeren Abstand zum Xanthin-Gerüst haben, kann das TEMPOL-Molekül um die Etherbindung rotieren, wie im cwEPR als über Dxx bei einem β -Euler Winkel von 0° verdeutlicht wird.

Tabelle 8 D-Tensoren von TEMPOL und dem TEMPOL-Derivat RYR-8. im realen Verhältnis und im relativen Verhältnis

	Reales Verhältnis			Relatives Verhältnis			β- Euler
	D _{xx}	D _{yy}	D _{zz}	D _{xx}	D _{yy}	D _{zz}	
RYR-8 0% Gly.							
X Band	8E9	2,5E9	2,5E9	1	0,31	0,31	0
Q Band	5,85E9	1,17E10	1,17E10	1	2	2	50
TEMPOL							
X Band	6,54E9	1,8E9	1,8E9	1	0,27	0,27	0
Q Band	8E9	8E9	2,5E10	1	1	3,125	50

4.4. Zusammenfassung/Ausblicke

Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier neuartige, EPR-aktive Xanthin-Derivate erfolgreich synthetisiert und charakterisiert, mit dem Ziel, langfristig die Bindung und Aktivität am Ryanodinrezeptor (RyR) mittels EPR-Spektroskopie untersuchen zu können. Die Derivate basieren auf Coffein, Theophyllin und Theobromin und wurden gezielt an verschiedenen Positionen funktionalisiert, um unterschiedliche Spacerlängen, -positionen und EPR-Sonden (Carboxy-TEMPO, TEMPOL) zu integrieren. Aufgrund der Komplexität und Verfügbarkeit des RyR-Kanals konnte eine direkte Affinitätsmessung noch nicht realisiert werden. Dennoch liefern die Ergebnisse der cwEPR-Messungen in Glycerol-Mischungen wichtige Informationen über die Rotationsdynamik der Sonden in viskosen Medien und erlauben Rückschlüsse auf strukturelle und Rotations-Eigenschaften dieser.

Insbesondere zeigte das Theophyllin-Derivat RYR-7 zwei spektrale Komponenten in den EPR-Spektren, was auf eine unterschiedliche Wechselwirkung mit Lösungsmittelclustern schließen lässt. Auch der Einfluss der Spacerlänge sowie der Position des Spinlabels auf die Rotationscharakteristika konnte klar differenziert werden. Die erarbeiteten Xanthin-Derivate bilden charakterisierte Grundlage für weiterführende EPR-Affinitätsstudien am RyR-Kanal. Künftige Arbeiten sollten sich auf die funktionelle Replikation des RyR-Proteins in geeigneten Membransystemen konzentrieren, um spezifische Protein-Ligand-Wechselwirkungen untersuchen zu können. Parallel dazu könnten molekulardynamische Simulationen oder Docking-Studien helfen, die exakte Bindungsstelle und Konformation der Sonden zu modellieren. Aufgrund der vielseitigen Affinität von Xanthinen zu weiteren physiologisch

relevanten Zielstrukturen – wie Adenosinrezeptoren, HERG-Kanälen oder zentralnervösen Modulationszentren – ist zudem ein erweitertes Anwendungsspektrum dieser Sonden über den RyR hinaus denkbar. Damit könnten die hier entwickelten Moleküle perspektivisch nicht nur zur RyR-Forschung, sondern auch zur Charakterisierung anderer Ionenkanal- oder Rezeptorvermittelter Prozesse beitragen.

5. Analyse der nanodiscbildenden Polymere

5.1. Einführung

In den letzten Jahren wurden bemerkenswerte Fortschritte bei der Entwicklung und dem tieferen Verständnis von Lipidmodellmembransystemen gemacht, die Alternativen zu klassischen Liposomen darstellen. Polymergekapselte Nanodiscs, auch bekannt als native Nanodiscs, Lipodisks oder Polymer/Lipid-Partikel, gelten als eines der vielversprechendsten Systeme zur Untersuchung von Lipid/Lipid-, Lipid/Protein- und Protein/Protein-Wechselwirkungen. Dies liegt vor allem an der geringen Größe dieser Nanodiscs und ihrer Kompatibilität mit vielen gängigen biochemischen, funktionellen und strukturellen Methoden.^{47,48,183,184} Ein weiterer Vorteil der Nanodisc-bildenden Polymere ist ihre Fähigkeit, Lipide sowie Zielproteine direkt aus nativen Membranen zu lösen. Die Verwendung dieser Polymere ermöglicht es, Membranproteine ohne herkömmliche Detergenzien, die labile Proteine denaturieren können, zu untersuchen.^{47,48,57,183} Trotz ihrer weiten Verbreitung ist das Verständnis, zu den grundlegenden Prinzipien der Wechselwirkungen zwischen Polymeren und kleinen oder mittelgroßen amphiphilen Molekülen z. B. Lipide, nicht so tiefgehend entwickelt wie ihre Anwendungsgebiete. Die kontinuierliche paramagnetische Elektronenresonanzspektroskopie (cwEPR) ist eine leistungsfähige Technik, um solche strukturellen, dynamischen und funktionellen Eigenschaften der Polymere auf molekularer Ebene lokal zu analysieren.^{185–187} In der vorliegenden Arbeit werden drei Arten von nanodiscbildenden Polymeren durch ihre nicht-kovalenten Wechselwirkungen mit EPR-aktiven Nitroxidradikalen charakterisiert. Bei diesen amphiphilen Polymeren handelt es sich um ein 2:1 Styrol/Maleinsäure- Copolymer (SMA (2:1)), ein Diisobutylen/Maleinsäure- Copolymer (DIBMA)^{49,188} und ein zwitterionisches Styrol/Maleinsäureamid-Sulfobetain-Copolymer (SMA-SB), das sich von SMA (2:1) ableitet. Die Strukturen und Eigenschaften der untersuchten Polymere sind in Abbildung 50 und Tabelle 9 dargestellt. Die ausgewählten Spinsonden sind in Abbildung 52 aufgeführt. Diese variieren in ihrer chemischen Struktur und können daher, unterschiedliche nicht-kovalente Wechselwirkungsmuster, Mikropolaritäten sowie nanostrukturierte Bereiche erfassen.^{21,58,189–191}

Im Folgenden werden die Wechselwirkungen zwischen den gezeigten Spinsonden (Abbildung 52) und drei Nanodisc-bildenden Polymeren (Abbildung 50 und Tabelle 9) mittels cwEPR-

Spektroskopie bei X- und Q-Band-Frequenzen charakterisiert. Der EPR-basierte Blick auf die Polymersysteme wird ergänzt durch dynamische Lichtstreuung (DLS) und elektrophoretische Lichtstreuungsexperimente (ELS). Durch die Kombination aller Ergebnisse können wir eine nanoskopische Interpretation der vorherrschenden Interaktionsmuster in den Polymer-Nanodisc-Systemen erhalten. Diese detaillierte Aufschlüsselung der Interaktionsmuster kann dazu beitragen, die Eigenschaften der Polymere für die Bildung von Lipid-Nanodiscs besser zu verstehen und sogar zu optimieren.

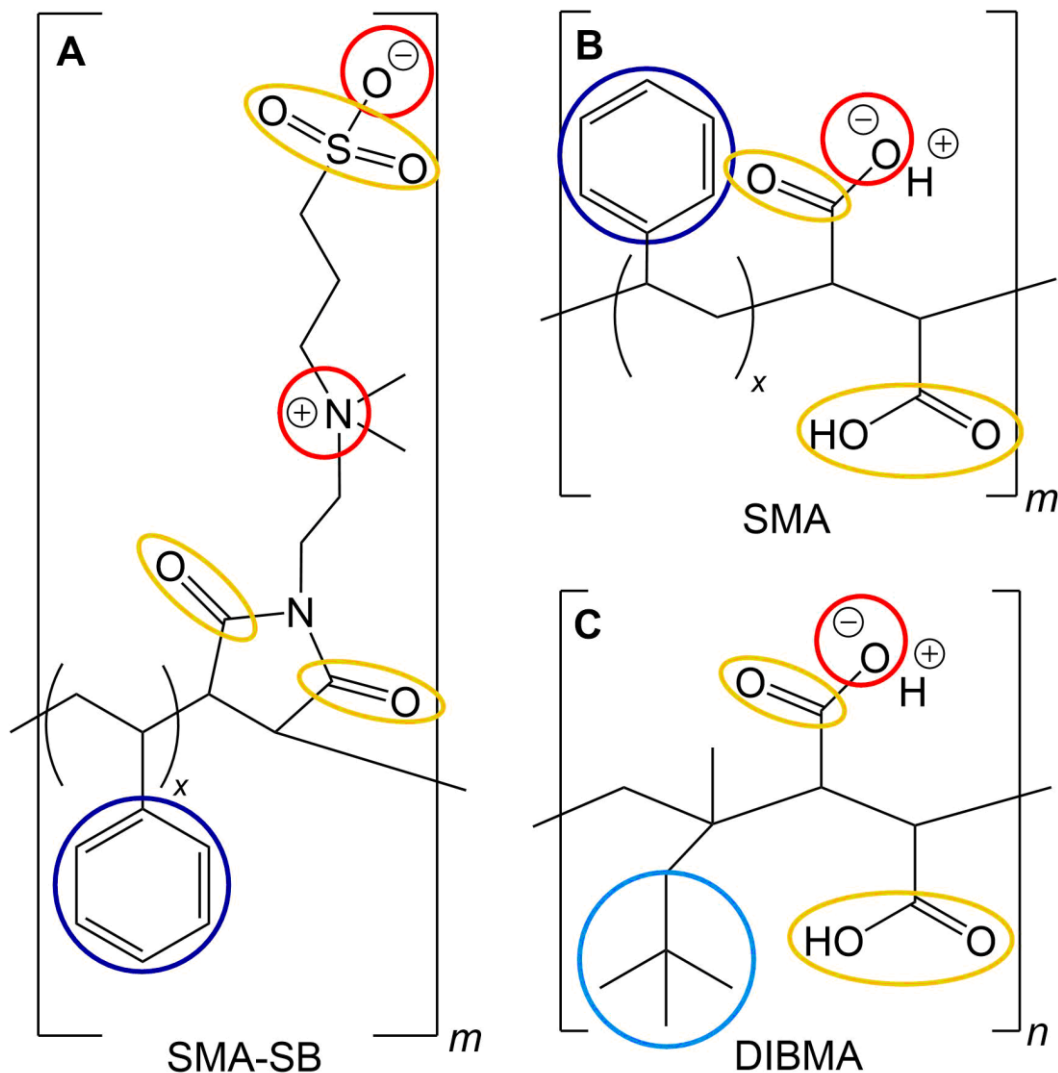


Abbildung 50 Molekulare Strukturen der untersuchten nanodisc-bildenden Polymere A) SMA-SB und B) SMA mit $x = 2,2$, $m \approx 8$ sowie C) DIBMA mit $n \approx 37$. Die Farben markieren verschiedene mögliche Wechselwirkungsstellen wie folgt: rot, ionische Wechselwirkungen; gelb, Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol/Dipol-Wechselwirkungen; dunkelblau, π/π -Wechselwirkungen; hellblau, van-der-Waals-Wechselwirkungen

Tabelle 9 Eigenschaften der untersuchten nanodiscformenden Polymere

Polymer	Monomerverhältnis	Mn	Hauptinteraktion mit Nitroxidradikal
SMA	2,2:1	2,7 (vollständig konvertiertes Polymer)	Coulomb, HBB, Dipol, π/π
DIBMA	2,2:1	4,15	Coulomb, HBB, Dipol, π/π
SMA-SB	1:1	8,4	Coulomb, HBB, Dipol, van der Waals

5.2. Dynamische Lichtstreuung

Vor der Charakterisierung der Polymere auf molekularer Ebene mittels EPR-Spektroskopie wurde ihr Solvatationsverhalten mit Dynamischer Lichtstreuung (DLS) und kontinuierlich überwachter Phasenanalyse-Lichtstreuung (cmPALS) untersucht, wobei letztere auf der Technik der elektrophoretischen Lichtstreuung (ELS) beruht. Zunächst wurde die DLS aller Polymere in Wasser in denselben Konzentrationen gemessen, wie in den späteren EPR Experimenten. Die so ermittelten massengewichteten Größenverteilungen sind in der Abbildung 51A dargestellt. Die entsprechenden Autokorrelationsfunktionen befindet sich in (Abbildung 140, Anhang). Während SMA-SB und DIBMA eine steile Intensitätskorrelationsfunktion aufweisen, was auf eine unimodale und enge Größenverteilung hinweist, verhielt sich SMA anders. Für SMA fanden wir zwei Populationen unterhalb eines hydrodynamischen Radius von 10 nm. Im Gegensatz dazu wies SMA-SB nur eine Population zwischen 1 und 10 nm auf und DIBMA aggregierte deutlich stärker, was zu einem hydrodynamischen Radius von ≈ 250 nm führte. Wobei nur ein kleiner Teil des DIBMA Aggregate mit einem Radius von weniger als 50 nm bildete. Für SMA-SB erschien daher eine genauere Betrachtung seiner temperaturabhängigen Aggregation notwendig. SMA-SB ist ein zwitterionisches sulfobetainhaltiges Polymer mit einer Ammonium- und einer Sulfonateinheit in jedem Maleinsäureamidmonomer (Abbildung 50). Polymere dieser Struktur neigen bei niedrigeren Temperaturen zur Phasentrennung, d. h. sie besitzen in Wasser häufig eine kritische Lösungstemperatur (UCST).^{192,193} Unterhalb dieser Temperatur kollabieren die zwitterionischen Seitenketten von SMA-SB aufgrund intra- und intermolekularer Kettenassoziation und verlieren so ihre Wasserlöslichkeit. Dies führt zu einer makroskopischen Phasentrennung in Wasser, wodurch sich die

Intensitätskorrelationsfunktion von SMA-SB stark zu langsameren Abklingzeiten verschiebt (Abbildung 141) und die Transmission der Probe abnimmt (Abbildung 51B). Aufgrund der starken Abnahme der Proben-Transmission mit abnehmender Temperatur korreliert die UCST dieser Polymere mit einem makroskopisch beobachtbaren Trübungspunkt.¹⁹³ Aufgrund dieses UCST-Verhaltens von SMA-SB wurden die Lichtstreuungsergebnisse von DIBMA und SMA bei 20 °C mit denen von SMA-SB bei 50 °C verglichen, d. h. bei einer Temperatur oberhalb des Trübungspunktes. Für die spätere Anwendung dieses Polymere (SMA-SB) in Lipidpartikeln ist ein rein wässriges System nicht geeignet. Die Solubilisierung von Lipiden wird üblicherweise bei hoher Ionenstärke durchgeführt, um die Coulomb-Reibung zwischen anionischen Lipiden und Polymeren zu verringern und so physiologischere Bedingungen nachzubilden.^{47,57} Daher wurde die DLS der Polymere in salzhaltiger TRIS-gepuffertes Lösung gemessen, wie in Abbildung 51A und Abbildung 140 dargestellt. Für alle untersuchten Polymere in gepufferten Lösungen wurde eine unimodale Größenverteilung mit hydrodynamischen Radien unter 10 nm beobachtet. Es wurden keine temperaturabhängigen Transmissionsmessungen für SMA-SB in diesem System durchgeführt, da das zwitterionische Polymer keine Phasentrennung in Gegenwart der verwendeten Salzkonzentrationen aufwies. DIBMA, SMA und SMA-SB wurden im Anschluss mit elektrophoretischer Lichtstreuung untersucht, um Erkenntnisse über die effektive Ladung in Form des ζ -Potenzials der Polymere in Lösung zu gewinnen. Während SMA und DIBMA Maleinsäureeinheiten enthalten, sind diese in SMA-SB vollständig amidiert. Die beobachteten ζ -Potenziale sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, dass i) SMA und DIBMA wesentlich negativere ζ -Potenziale aufweisen als SMA-SB und ii) eine höhere Ionenstärke die Größe des ζ -Potenzials der beiden anionischen Polymere verringert. Die letztgenannte Beobachtung ist auf die Adsorption entgegengesetzt geladener Ionen an der geladenen Polymeroberfläche sowie auf eine verstärkte Ladungsabschirmung bei erhöhter Ionenstärke zurückzuführen. Der Unterschied im ζ -Potential zwischen den beiden anionischen Polymeren ergibt sich hauptsächlich aus ihrer unterschiedlichen Partikelgröße. DIBMA aggregiert in beiden Lösungsmitteln im Vergleich zu SMA zu größeren Partikeln, was vermutlich zu einer stärkeren Adsorption der Gegenionen führt und damit ein geringeres ζ -Potential zur Folge hat. Während die Größe des ζ -Potenzials von SMA und DIBMA mit zunehmender Ionenstärke abnimmt, wechselt das ζ -Potential von SMA-SB von positiv in Wasser zu negativ in Salzpuffer. Das UCST von SMA-SB verschwindet jedoch bis zu einer Salzkonzentration von 100 mM nicht vollständig.

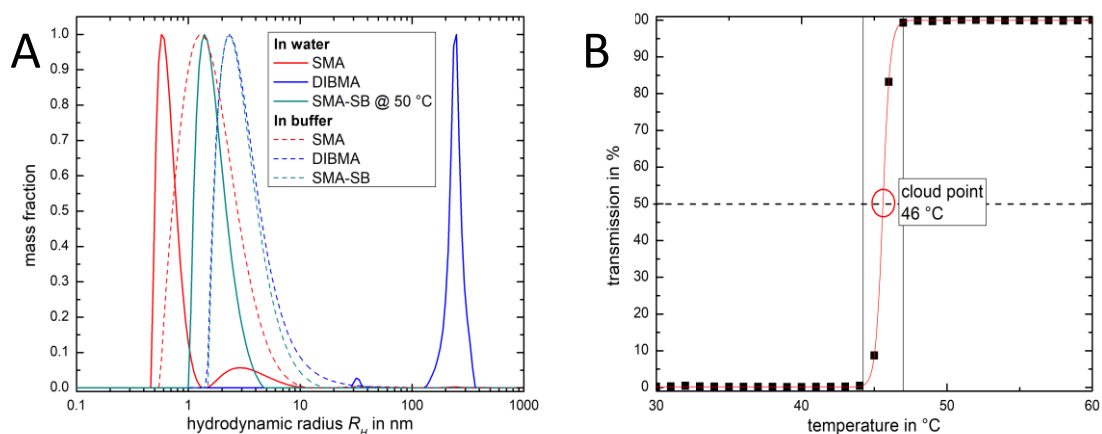


Abbildung 51 A) Massengewichtete Partikelgrößenverteilung für die reinen Polymer-Lösungen von SMA und DIBMA, gemessen bei 20 °C und SMA-SB dargestellt bei 50 °C (oberhalb seiner UCST) in Wasser (durchgezogene Linien) sowie in wässriger Pufferlösung (alle bei 20 °C, gestrichelte Linien); B) Temperaturabhängige Transmission von SMA-SB für die Trübungspunktbestimmung

Tabelle 10 Ergebnisse der cmPALS; ζ Potential von SMA, DIBMA und SMA-SB in Wasser und wässrigem Tris Puffer

Polymer	Wasser		Wässriger TRIS Puffer mit 300 mM NaCl	
	Hydrodynamischer Radius [nm]	ζ potential [mV]	Hydrodynamischer Radius [nm]	ζ potential [mV]
SMA	0,6	-52,0	2,2	-24,0
DIBMA	235,0	-36,3	3,7	-13,8
SMA-SB	1,7	21,3	4,6	-10,8

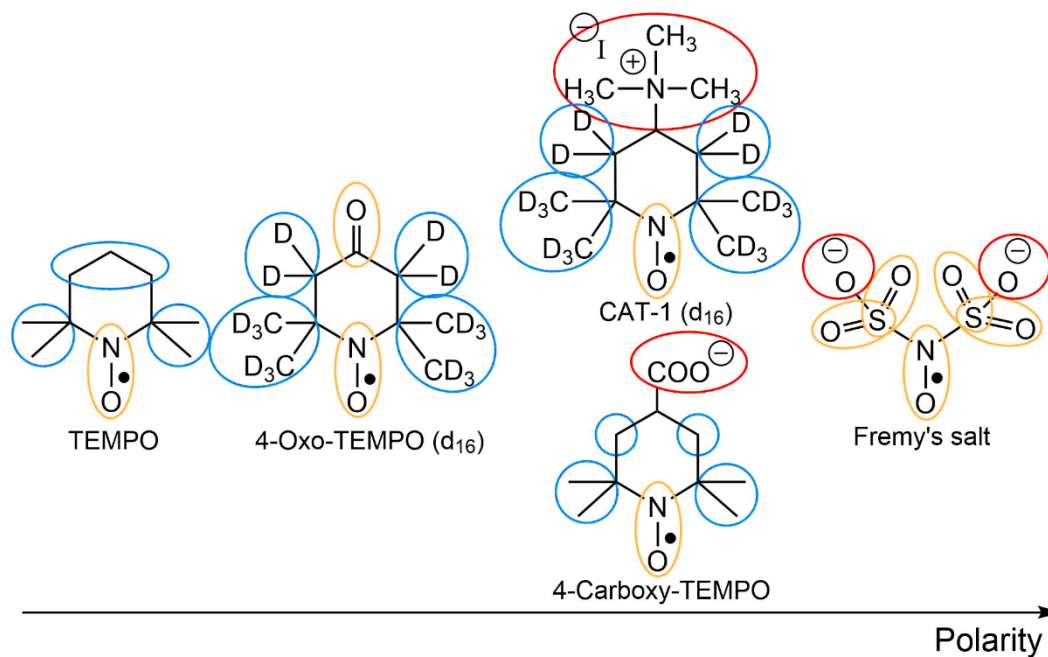


Abbildung 52 Vergleich ausgewählter Spinsonden hinsichtlich ihrer Polarität und Größe, angepasst aus Jeschke¹⁸⁵. Die Farben markieren ähnliche Wechselwirkungsstellen wie in Abbildung 50.

5.3. cwEPR Analytik

Die folgenden Abschnitte beleuchten die Ergebnisse der *continuous wave* Elektronenspinresonanzspektroskopie (cwEPR) Messungen. Zu Beginn stehen zunächst die Wechselwirkungsmuster der Spinsonden in den jeweiligen Polymermischungen bei zwei verschiedenen Mikrowellenfrequenzen im Fokus. Anschließend werden die Auswirkungen wässriger Pufferlösungen mit hohem Salzgehalt, die für die Solubilisierung der Lipide durch die drei Polymere benötigt werden, auf die jeweiligen nichtkovalenten Wechselwirkungen, die in den cwEPR-Spektren nachgewiesen wurden, diskutiert. Schließlich werden temperaturabhängige Messungen bei X-Band-Frequenzen dargestellt und vertieft, um insbesondere das UCST-Verhalten von SMA-SB im Vergleich zu negativ geladenem SMA und DIBMA zu untersuchen. Die wichtigsten EPR-Parameter, die bei der Analyse verwendet werden, sind: i) der isotrope *g*-Wert, der Fingerabdruck des jeweiligen Radikals, der auch für Wasserstoffbrückenbindungen empfindlich ist, ii) die isotrope ¹⁴N-Hyperperfinkopplungskonstante a_{iso} , die ein Maß für die Umgebungspolarität um die Sonde herum ist, und iii) die Rotationsmobilität, die im Falle einer schnellen, eher isotropen Rotation am einfachsten durch die isotrope Rotationskorrelationszeit τ_c beschrieben werden kann.^{189,194}

Tabelle 11 Vergleich des Anteils der vollständig hydratisierten, "hydrophilen" TEMPO-Spezies (f) für jedes Polymer mit reinem TEMPO (als Referenzwert) in Wasser bei 20 °C

Probe	TEMPO	SMA	DIBMA	SMA-SB
f [%]	76	88	65	70

5.3.1. Interaktionsmuster bei X- und Q-Band Frequenzen

Aufgrund ihrer chemischen Struktur zeigen die verwendeten Spinsonden verschiedene Arten von Wechselwirkungen in Gegenwart der jeweiligen Systeme. Dazu gehören π/π -Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Coulomb- und Dipol/Dipol-Wechselwirkungen sowie van der Waals und hydrophobe Wechselwirkungen.¹⁹⁵ Die mono- und dianionischen Spinsonden 4-Carboxy-2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxyl (4-Carboxy-TEMPO) und Dinatriumnitrosodisulfat (Fremys Salz) sowie die kationische Tetraalkylammonium-TEMPO-Spezies (4-Trimethylammonium-2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxyl (CAT-1)) sind in der Lage, an Coulomb-Wechselwirkungen teilzunehmen. Zu beachten ist, dass alle ionischen Spinsonden als Salze verwendet wurden und die entsprechenden Gegenionen hier nicht explizit erwähnt werden, weitere Details dazu finden sich im Materialien & Methoden Teil.

4-Oxo-2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxyl (4-Oxo-TEMPO) wiederum kann mit seiner Carbonylgruppe über dipolare Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen wechselwirken, während das stark amphiphile TEMPO (2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxyl) als dipolares Molekül agieren oder über Van-der-Waals-Kontakte seines Alkyrings interagieren kann. Dieses Portfolio an verfügbaren Spinsonden ermöglicht es, verschiedene Wechselwirkungsmodi zwischen den untersuchten Polymeren und kleinen Molekülen mit Hilfe der cwEPR nachzuweisen. Das TEMPO Nitroxidradikal trägt keine chemische Modifikation an der 4-Position des Piperidylrings und bildet daher den Referenzpunkt für unsere Untersuchungen. TEMPO ist die hydrophobste Spinsonde in unseren Messungen, besitzt aber mit ihrem recht großen Dipolmoment ($\mu = 3,14$ D) dennoch einen amphiphilen Charakter.^{20,196} TEMPO ist ebenfalls nicht in der Lage mit den Styrol-Einheiten des SMA bzw. SMA-SB π -Komplexe auszubilden oder über Coulombkräfte mit den Polymerrückgrat zu interagieren.

TEMPO:

Abbildung 53 A, B zeigt die cwEPR-Spektren für reines TEMPO in wässriger Lösung sowie mit allen drei Polymeren bei beiden verwendeten Mikrowellenfrequenzen. Bei X-Band Frequenzen ($\nu \approx 9,4$ GHz) unterschieden sich die Werte der isotropen Hyperfeinkopplung a_{iso} der reinen Spinsonde und in den Polymermischungen nicht signifikant, was auf eine ähnliche Polaritätsumgebung der Nitroxidradikale in allen untersuchten Systemen hinweist. Die Rotationsbeweglichkeit τ_c von TEMPO wurde durch die Anwesenheit der Polymere nur geringfügig beeinflusst, wie es in Abbildung 142A und Tabelle 34 gezeigt wird. Die Linienbreite der aufgezeichneten Spektren war bei TEMPO, das in Gegenwart von SMA-SB gelöst wurde, größer als bei den anderen Proben. Zu beachten ist, dass alle SMA-SB-Proben über die UCST erhitzt werden mussten, um die EPR-Kapillaren zu füllen und sie in das Spektrometer zu stellen. Die tatsächliche Messtemperatur von 20°C lag unter dem UCST-Wert von 46°C, was die Selbstassoziation und die Bildung von Ionenpaaren zwischen den zwitterionischen Seitenketten von SMA-SB förderte, was sich wiederum auf ihre Wechselwirkungen mit der Spinsonde auswirkte.^{197,198} Diese Selbstassoziation wurde ebenfalls durch DLS nachgewiesen, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben (Abbildung 51). Eine signifikante Änderung zeigte sich beim isotropen g -Wert. Mit SMA gelöstes TEMPO wies bei X-Band Frequenzen einen viel niedrigeren g_{iso} -Wert von 2,00555 im Vergleich zu einer reinen wässrigen Spinsondenlösung (2,00587) auf, während DIBMA und SMA-SB keine derartige Veränderung bewirkten. Da sich der a_{iso} -Wert nicht veränderte, kann die Drift des g_{iso} -Wertes nicht einfach durch eine polarere Umgebung erklärt werden. Vielmehr scheint es, dass sich die Protizität der Spinsonde als Reaktion auf die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Sauerstoff der Nitroxidgruppe und den beiden Maleinsäureeinheiten von SMA, von denen bei pH 7 noch etwa eine protoniert ist, verändert hat.⁵⁴ Die Tatsache, dass der Sauerstoff in N-O als Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor fungiert, verringert die Varianz zwischen g_{xx} ($g_{\text{iso}} = 1/3(g_{xx} + g_{yy} + g_{zz})$) und g_e für ein freies Elektron.¹⁸⁶ DIBMA zeigte diesen oben genannten Effekt nicht, obwohl dieses Polymer ebenfalls Maleinsäureeinheiten enthält.

Basierend auf den isotropen Werten der hyperfein Kopplung (Abbildung 58), könnte dies ein Grund dafür sein, dass TEMPO den Bereich der Isobutyl-Einheiten in DIBMA stärker bevorzugt, aber immer noch von genügend Wassermolekülen umgeben ist, um ein ähnliches Polaritätsprofil im Vergleich zu SMA mit seinen Styrol-Einheiten zu zeigen. TEMPO Q-Band-Spektren als reine Spinsonde zeigten ein auffälliges Merkmal, das bei niedrigeren

Mikrowellenfrequenzen nicht beobachtet wurde. Neben vollständig solvatisierten Molekülen weist amphiphiles TEMPO in Wasser eine zweite spektrale Komponente auf. Diese zweite Komponente stellt TEMPO Moleküle dar, die von einer wässrigen Solvatationshülle mit deutlich geringerer Polarität und reduzierter Rotationsmobilität umgeben sind (Abbildung 142B). Die Ursache für die Bildung dieser zweiten Spezies mit einer wässrigen Solvatationshülle geringerer Polarität (ALPSS, aqueous lower-polarity solvation shell) wird in Hunold näher beschrieben²⁰ Dieses Phänomen ist nur bei TEMPO und nicht bei seinen Derivaten ersichtlich (Abbildung 143). Durch die Verwendung eines höheren Magnetfeldes verbessert sich die spektrale Auflösung für Parameter wie den g-Tensor, was eine andere Sichtweise auf die Rotationsbewegung ermöglicht.^{194,199} Nachfolgend liegt der Fokus auf dem Verhältnis zwischen diesen beiden verschiedenen "Arten" von TEMPO-Spezies (ALPSS vs. vollständig solvatisiert) im Zusammenhang mit den drei getesteten Polymeren. Die Anteile der hydrophilen (d. h. vollständig gelösten) Spinsonde in jeder Probe, die aus einer Simulation der Spektren extrahiert wurden, sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Ähnlich wie bei den X-Band Ergebnissen wird deutlich, dass die SMA-Probe im Vergleich zu DIBMA und SMA-SB ein anderes Verhalten zeigt. Die bevorzugte Bildung der hydrophilen TEMPO-Spezies in SMA kann mit der erwähnten Vorliebe der Spinsonde für die Wechselwirkung mit dem Maleinsäure-Regime korreliert werden, während in DIBMA die Isobutyleneinheit bevorzugt wird (Abbildung 58). In SMA-SB hat das Polymer den geringsten Einfluss auf die Population der beiden TEMPO-Spezies. Diese Tatsache stimmt mit der Annahme überein, dass unterhalb der UCST die zwitterionischen Seitenketten stärker miteinander wechselwirken als mit dem Nitroxidradikal oder anderen Gastmolekülen. Außerdem begann SMA-SB direkt nach dem Befüllen der Kapillare mit der vorgewärmten Probe zu aggregieren und auszufallen. Bei der Messung bei Raumtemperatur (unter UCST) bleiben hauptsächlich reine TEMPO-Radikale in Lösung.

Deuterierte Nitroxid-Radikale:

Bei der Spinsonde 4-Oxo-TEMPOd6 wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mischungen mit den drei Polymeren festgestellt (Abbildung 143 und Tabelle 35). Das kationische Nitroxidradikal CAT-1 kann in Anbetracht seiner Ladung und seiner Rolle als starker Elektrolyt verschiedene Umgebungen abtasten, wenn es mit den Polymeren gemeinsam gelöst wird, dies hauptsächlich aufgrund von Coulomb-Wechselwirkungen. Die entsprechenden Spektren bei X- und Q-Band Frequenzen sind in Abbildung 53C und D

dargestellt. Hervorzuheben ist, dass vollständig deuteriertes CAT-1 verwendet wurde, wodurch die Linienbreite der aufgezeichneten cwEPR-Daten erheblich reduziert ist. Der Grund dafür liegt in einer starken Reduzierung der unaufgelösten Hyperfeinkopplungen, die von den Methylwasserstoffkernen herrühren.^{200,201} Bei der Kombination von CAT-1 mit SMA zeigen die Spektren bei beiden Mikrowellenfrequenzen eine verringerte Rotationsbeweglichkeit der Spinsonde (Abbildung 144). Die positiv geladene Spinsonde zeigt deutliche Coulomb-Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Maleinsäure-Regime von SMA, wie es in Abbildung 58 zu sehen ist. Die Rotationskorrelationszeit für CAT-1 ist mit dem Polymer etwa viermal höher als in reinem Wasser (Tabelle 36). Mit DIBMA, das ebenfalls negativ geladene Maleinsäuremonomereinheiten enthält, waren die Mobilitätseinschränkungen für CAT-1 weniger ausgeprägt. Hier stieg τ_c nur um einen Faktor von $\approx 2,2$ an. Dieser Trend stimmt mit den ermittelten ζ -Potentialwerten aus den cmPALS-Studien (Tabelle 10) überein, bei denen SMA einen größeren absoluten Wert und damit eine ausgeprägtere Interaktion mit der Spinsonde aufzeigt. Darüber hinaus wurde jeglicher Einfluss der unterschiedlichen Kettenlänge von SMA und DIBMA minimiert, indem die Polymerkonzentration so eingestellt wurde, dass das Verhältnis von Spinsonde zu mittlerer Wiederholungseinheit für alle Polymere ähnlich war, d. h. (2/1 Styrol/Maleinsäure), (1/1 Diisobutylen/Maleinsäure) und (2/1 Styrol/Maleinsäureamid) für SMA, DIBMA bzw. SMA-SB. Das zwitterionische SMA-SB hatte keinen Einfluss auf das Rotationsverhalten von CAT-1, was wiederum mit dem ermittelten elektrokinetischen Potenzial dieses Polymers übereinstimmt. Darüber hinaus untermauert dies die Interpretation, dass die Polymerketten von SMA-SB es bevorzugen, unterhalb des UCST elektrostatisch miteinander zu interagieren.

Negativ geladene Nitroxidradikale:

Ähnlich wie das neutrale 4-Oxo-TEMPO zeigt auch das negativ geladene 4-Carboxy-TEMPO (Abbildung 145) keine zusätzlichen und signifikanten Änderungen von g_{iso} und a_{iso} in den aufgezeichneten cwEPR-Spektren. Bei einfacher Betrachtung der Ladungen sollte die Spinsonde durch SMA und DIBMA abgestoßen werden, was die unveränderte Mobilität der Sonde erklärt.

Bei SMA-SB beeinträchtigte der positiv geladene sekundäre Ammoniumbereich die Rotationsfreiheit von 4-Carboxy-TEMPO nicht. Die Selbstassoziation des Polymers unterhalb der UCST könnte die Spinsonde daran hindern, diese positiv geladenen Bereiche auf dem Polymer zu erreichen. Neben 4-Carboxy-TEMPO wurde auch Fremys Salz als negativ geladene

und sogar dianionische Spinsonde verwendet. Fremys Salz besitzt kein Ringsystem wie die TEMPO-Derivate. Dieses Fehlen von anderer magnetischer Kerne neben dem Stickstoff eliminiert unaufgelöste Hyperfeinkopplungen, was wiederum zu sehr schmalen Linien führt (Abbildung 53E,F). Aufgrund des fehlenden Ringsystems und damit der fehlenden Methylgruppen an den Positionen 2 und 6 ist Fremys Salz weniger stabil als die anderen verwendeten Spinsonden.^{196,202} Um auswertbare X-Band cwEPR-Spektren von Fremy's Salz gemischt mit SMA-SB zu erhalten, waren mehrere Versuche nötig, die vor allem auf einen schnellen Transfer der erhitzten Probe in die jeweiligen Kapillaren abzielten. Außerdem musste oberhalb der UCST von SMA-SB gearbeitet werden, um eine homogene Probe zu erhalten, welche kurz vor den Messungen abgekühlt wurde. Aufgrund der starken Coulomb-Wechselwirkung und einer daraus resultierenden Erhöhung der lokalen Konzentration des Fremys Salzes (Abbildung 58 und Abbildung 146) wurde die Disproportionierung des Radikals gefördert (als Hauptweg des chemischen Zerfalls²⁰²). Diese begründet die verringerten Temperaturstabilität von bis zu etwa 40 °C (Abbildung 147 und Abbildung 148). Die starke dynamische elektrostatische Bindung^{203,204} zwischen Fremys Salz und SMA-SB führte zu einer deutlichen Verringerung der Rotationsmobilität der Spinsonde. Um die aufnehmbaren Spektren des Fremys Salzes zu simulieren, wären weitere Untersuchungen erforderlich, die im Rahmen der aktuellen Arbeit leider nicht durchgeführt werden konnten. Die Tatsache, dass diese Spinsonde starke Wechselwirkungen mit SMA-SB aufzeigt, wurde durch Messungen in wässriger Pufferlösung bestätigt. Hingegen war kein Erwärmungsprozess bei den Polymeren SMA und DIBMA erforderlich, so dass CW-EPR Spektren mit Fremys-Salz bei beiden Mikrowellenfrequenzen gemessen werden konnten. Ähnlich wie bei 4-Carboxy-TEMPO wird die Rotationsmobilität von Fremys Salz durch diese Polymere aufgrund der Abstoßung gleichartiger Ladungen nicht beeinflusst, was ebenfalls in Abbildung 58 gezeigt wird. Der Rückgang von g_{iso} , bei X-Band Frequenzen der für die TEMPO-Derivate in SMA Lösung konsistent war, war für Fremys Salz nicht ersichtlich (Tabelle 38). Der dianionische Charakter sowie die spezifische Struktur dieser Spinsonde verhindern wahrscheinlich die Wasserstoffbrückenbildung zwischen der NO-Gruppe und den Maleinsäureresten.²⁰⁵

5.3.2. Der Einfluss von Puffersalzen auf die Interaktionsmuster

Wie bereits beschrieben, sind nahezu physiologische Puffer- und Salzkonzentrationen für die Solubilisierung der Lipide durch die drei Polymere erforderlich. Die Auswirkungen der

zugesetzten Puffer und Salze auf SMA, DIBMA und SMA-SB wurden bereits mit den entsprechenden DLS- und ELS Messungen diskutiert. Mit Hilfe der cwEPR ist es möglich, zwischen Spinsonden-Ensembles zu unterscheiden, die sich in ihrer Rotationszeitskala oder Polarität differenzieren. So können wir nun Variationen in der lokalen Umgebung, die durch verschiedene spektrale Komponenten der EPR-Spektren erkennbar sind, mit Werten wie dem ζ -Potenzial korrelieren, die über die gesamten Ensembles aller Molekülarten in den Proben gemittelt werden. Ähnlich wie bei den cwEPR-Messungen in Wasser sind die deutlichsten Veränderungen bei den geladenen Nitroxidradikalen CAT-1 und Fremys Salz sowie bei TEMPO in seinem spezifischen Solvatationsverhalten (Abbildung 54) zu beobachten. Das negativ geladene 4-Carboxy-TEMPO zeigt keine signifikanten Änderungen in den aufgezeichneten Spektren sowohl bei den X- als auch bei den Q-Band-Frequenzen in Pufferlösungen (Abbildung 152). Die nicht aufgelösten Hyperfein-Wechselwirkungen für diese Spinsonde führten zu größeren Linienbreiten, die die Auflösung der spektralen Veränderungen aufgrund lokal unterschiedlicher Wechselwirkungsmuster weitgehend überdecken. Bei TEMPO lag der Fokus auf Messungen, die bei Q-Band-Frequenzen durchgeführt wurden (Abbildung 54B), um die beiden unterschiedlich solvatisierten Nitroxid-Spezies aufzeigen zu können (Abbildung 149, für alle Spektren). Die Zugabe von TRIS-Puffersalzen destabilisierte die durch das Wasser gebildete Umgebung mit geringerer Polarität um die radikalischen Moleküle und reduzierte somit den Anteil der ALPSS-TEMPO-Spezies auf 10 %. Eine Zugabe von antichaotropen oder kosmotropen Verbindungen wie Natriumchlorid würden den gegenteiligen Effekt hervorrufen.²⁰ Die Polymere DIBMA und SMA-SB beeinflussten den Gesamteffekt der Puffersalze offenbar nicht, da sie eine ähnlich ausgeprägte (d. h. kleine) ALPSS-TEMPO-Komponente in den jeweiligen cwEPR-Spektren zeigten. Alleinig SMA schien jedoch die "hydrophoben" Wechselwirkungen in der wässrigen Pufferlösung zu stabilisieren, wodurch der Anteil von ALPSS TEMPO auf 40 % anstieg. Aktuell ist es differenziert, den Hauptgrund für die forcierte Bildung der ALPSS-TEMPO-Spezies zu erkennen. Es könnte sein, dass der hohe Puffersalzgehalt vorzugsweise mit den Maleinsäureresten in SMA interagiert, was dazu führen könnte, dass TEMPO in fast "reinen" Wasserbereichen solvatisiert wird, welches zu den obengenannten ALPSS-TEMPO-Spezies führt. Die ALPSS-TEMPO-Spezies, die im Q-Band mit den Polymeren beobachtet wird, ist nicht auf eine direkte Wechselwirkung von TEMPO mit dem Polymer zurückzuführen, wie es häufig bei typischen thermoresponsiven Polymeren zu sehen wäre.¹⁸⁹ Wenn diese "hydrophoberen" Spezies auf Polymer-TEMPO Wechselwirkungen

zurückzuführen wären, wäre ihre Mobilität und Relaxation so eingeschränkt, dass dies bereits bei X-Band-Frequenzen ersichtlich wäre. Da dies nicht zu beobachten war, könnte die polymerinduzierte Verschiebung des Verhältnisses von "Bulk"-Wasser zu ALPSS-Wasser als ein Nebeneffekt des zugesetzten Salzpuffers gesehen werden. Vorstellbar wäre, dass die vermutlich bevorzugte Wechselwirkung von Puffersalzen mit den Maleinsäuren im SMA auch zu einer hohen Konzentration von Ionen in der Nähe der aromatischen SMA-Ringe führt, die den Maleinsäureresten benachbart sind. So können die Ionen auch als "Abschirmung" der aromatischen Reste gegenüber des TEMPOs angesehen werden.

Um ein besseres Verständnis der Zugänglichkeit geladener Reste in SMA, DIBMA und SMA-SB in salzhaltiger TRIS-Pufferlösung zu erhalten, muss außerdem die cwEPR Eigenschaften der Spinsonden CAT-1 (Abbildung 151) und Fremys-Salz (Abbildung 153) in diesen Puffern untersucht werden. Die Rotationsmobilität des positiv geladenen Radikals CAT-1 war im Vergleich zu den Messungen in Wasser weniger eingeschränkt, wenn es mit SMA oder DIBMA mitgelöst wurde (Abbildung 54C). Für diese Polymere auf Maleinsäurebasis, verringerte sich τ_c im X-Band, um etwa 45 % im Fall von SMA und 31 % für DIBMA. Die zugesetzten Puffersalze schirmten teilweise die negative Ladung der beiden Polymere ab, was sich bereits in weniger negativen ζ -Potentialwerten (Tabelle 10) widerspiegelt. Diese Abschirmung reduziert die Coulomb-Wechselwirkungen zwischen der Spinsonde und den Maleinsäureresten zusätzlich. In Lösungen mit DIBMA war CAT-1 beweglicher, was ebenfalls mit dem oben genannten elektrokinetischen Potenzial korreliert. Da SMA-SB in der wässrigen Tris-Pufferlösung ebenfalls ein negatives ζ -Potential besitzt, war die Rotationsmobilität von CAT-1 in gepufferten SMA-SB-Lösungen gleichfalls reduziert. Der Einfluss war jedoch noch schwächer ausgeprägt als bei DIBMA. Ein Vorteil der Verwendung hoher Salzkonzentrationen ist das Verschwinden des UCST-Verhaltens von SMA-SB als Folge der Ladungsabschirmung. Gepufferte SMA-SB-Lösungen mussten daher nicht erhitzt werden, um eine homogene Lösung zu erhalten, so dass cwEPR-Spektren mit Fremys-Salz mit einem ausreichenden Signal-Rausch-Verhältnis aufgenommen werden konnten (vgl. Abbildung 54E,F; Abbildung 147). Wie erwartet, interagierte die positiv geladene Ammoniumkomponente in SMA-SB elektrostatisch mit dem negativ geladenen Nitroxidradikal und verringerte dadurch dessen Rotationsmobilität. Diese eingeschränkte Mobilität war nur bei X-Band-Frequenzen sichtbar. Bei höheren Frequenzen (Q-Band) waren die Rotationskorrelationszeiten für das Fremys Salz mit und ohne Polymer gleich. Dies deutet auf eine eher dynamische Bindung hin, ähnlich

einem "territorial gebundenen" Ion, wie es in dem von Manning eingeführten Konzept der Gegenionenkondensation beschrieben wird, das durch EPR-Spektroskopie gemessen und quantifiziert werden kann.^{203–206}

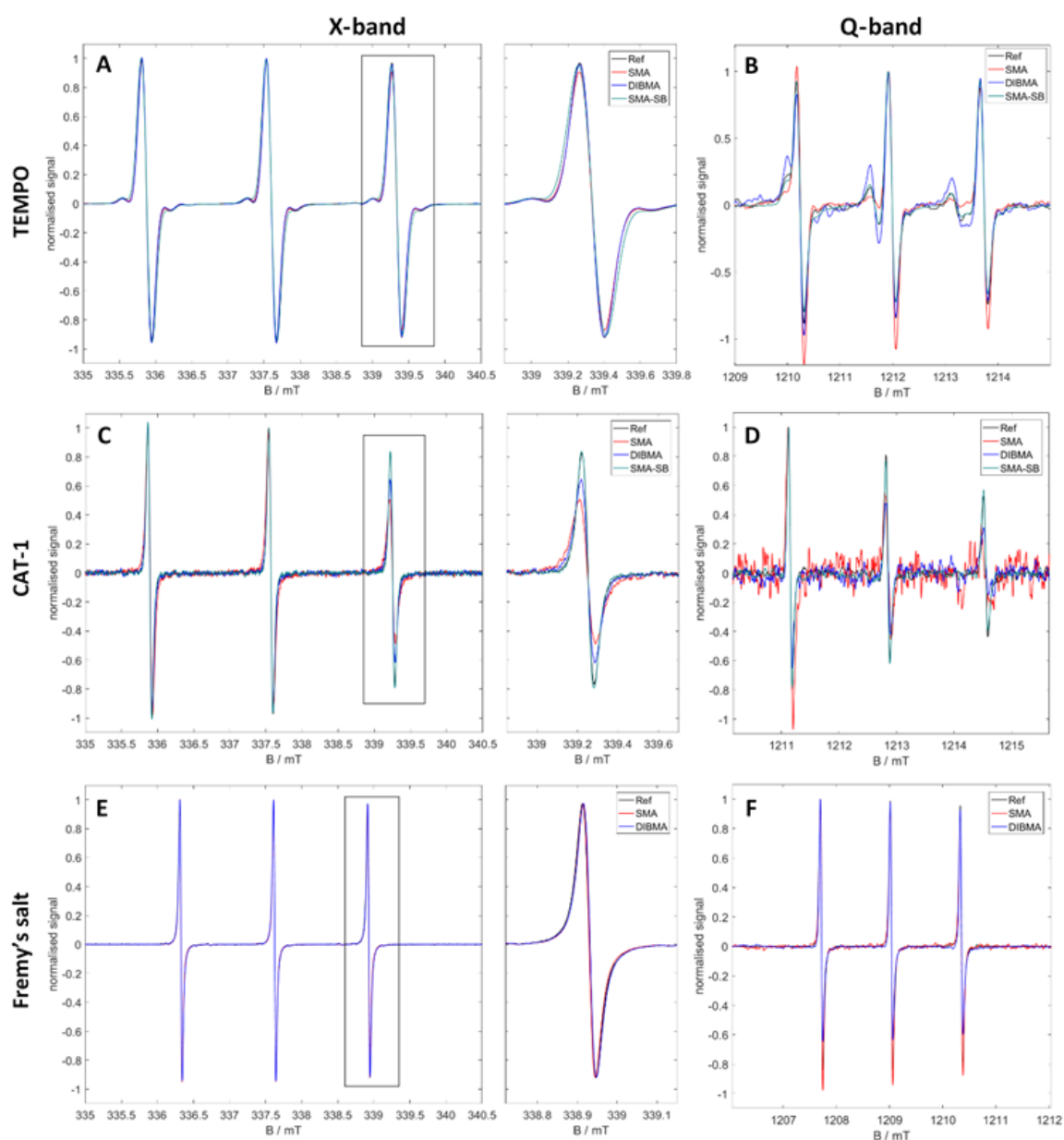


Abbildung 53 CW-EPR-Spektren bei 20 °C von A,B) TEMPO, C,D) CAT-1, und E,F) Frey's salt in Wasser (Referenzmessungen) sowie mit SMA, DIBMA, bzw. SMA-SB. A, C, E) Die X-Band-Spektren zeigen die vollständigen Spektren und heben die Hochfeld-Peaks hervor. B, D, F) Bei Q-Band-Frequenzen werden nur die vollständigen Spektren dargestellt

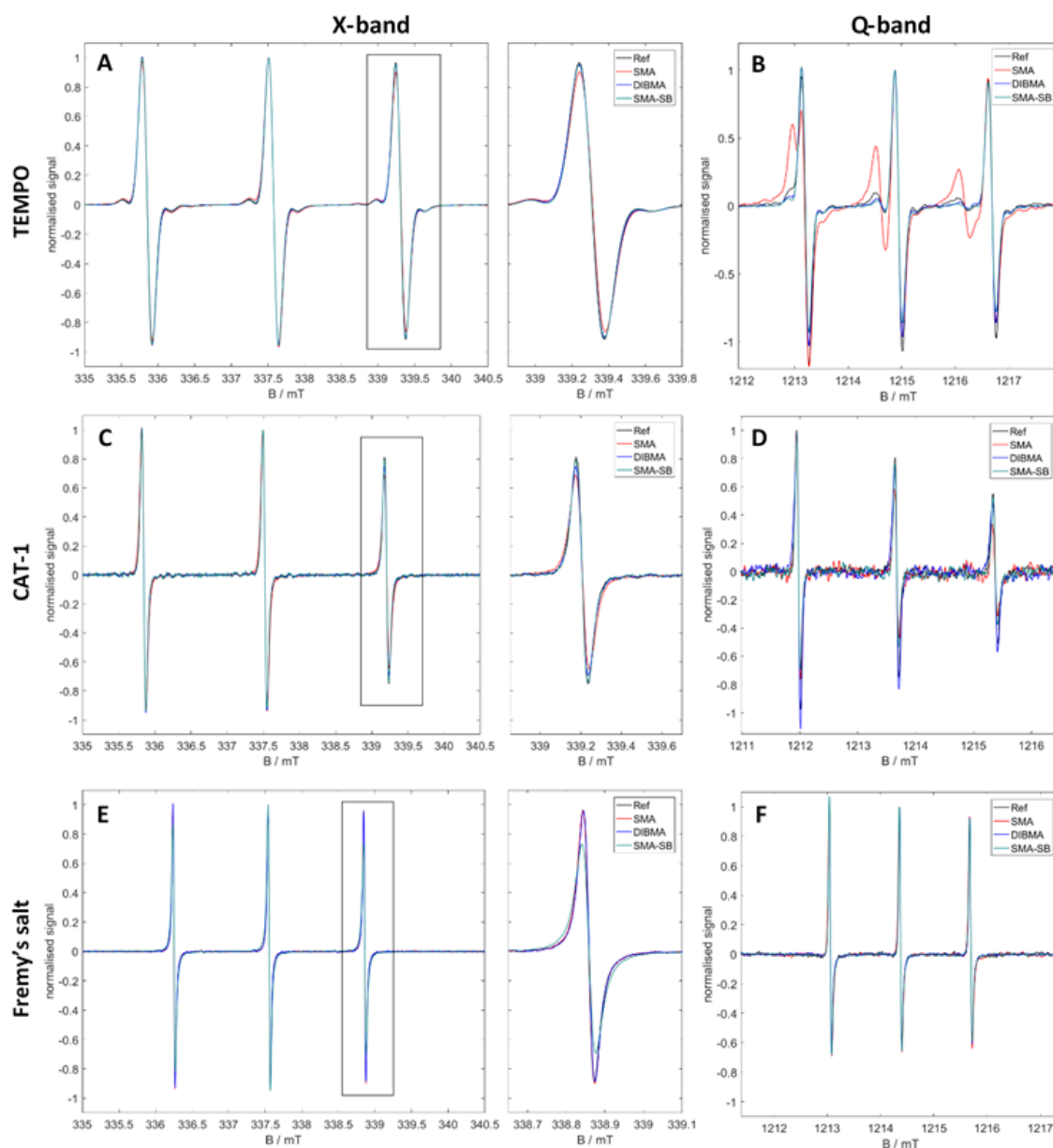


Abbildung 54 CW-EPR-Spektren bei 20 °C von A,B) TEMPO, C,D) CAT-1, und E,F) Frey's salt in wässriger Pufferlösung sowie mit SMA, DIBMA, bzw. SMA-SB. A, C, E) Die X-Band-Spektren zeigen die vollständigen Spektren und heben die Hochfeld-Peaks hervor. B, D, F) Bei Q-Band-Frequenzen werden nur die vollständigen Spektren dargestellt

5.3.3. Einfluss der Temperatur auf die Parameter der Spinsonde

Im Folgenden wird die Temperaturabhängigkeit der cwEPR-Spektren der Nitroxid-Spin-Sonden in allen Polymerlösungen behandelt. Dabei liegt der Fokus auf den Messungen von wässrigen Proben bei X-Band-Frequenzen (Abbildung 154-120) und von wässrigen Pufferlösungen (Abbildung 162-130). SMA-SB ist ein UCST-Polymer, d. h., es ist makroskopisch in einer einzigen Phase gelöst, fällt aber unterhalb seiner Phasenübergangstemperatur aus. Bei dem Erreichen der kritischen Lösungstemperatur von SMA-SB entfalten sich die Polymerseitenketten aus ihrem aggregierten Aggregatzustand, die intramolekularen

Ionenpaare werden aufgebrochen und bilden aufgelöste Spulen. Diese können nun mit kleinen Molekülen in der Lösung interagieren. Der durch die EPR-Spektroskopie erkannte Trübungspunkt, kann die nanoskopische Entfaltung von Seitenketten schon bei niedrigeren Temperaturen erkennen als das markoskopisch fokussierte DLS, welches den makroskopischen Trübungspunkt erst bei 46°C ermittelt.¹⁹¹

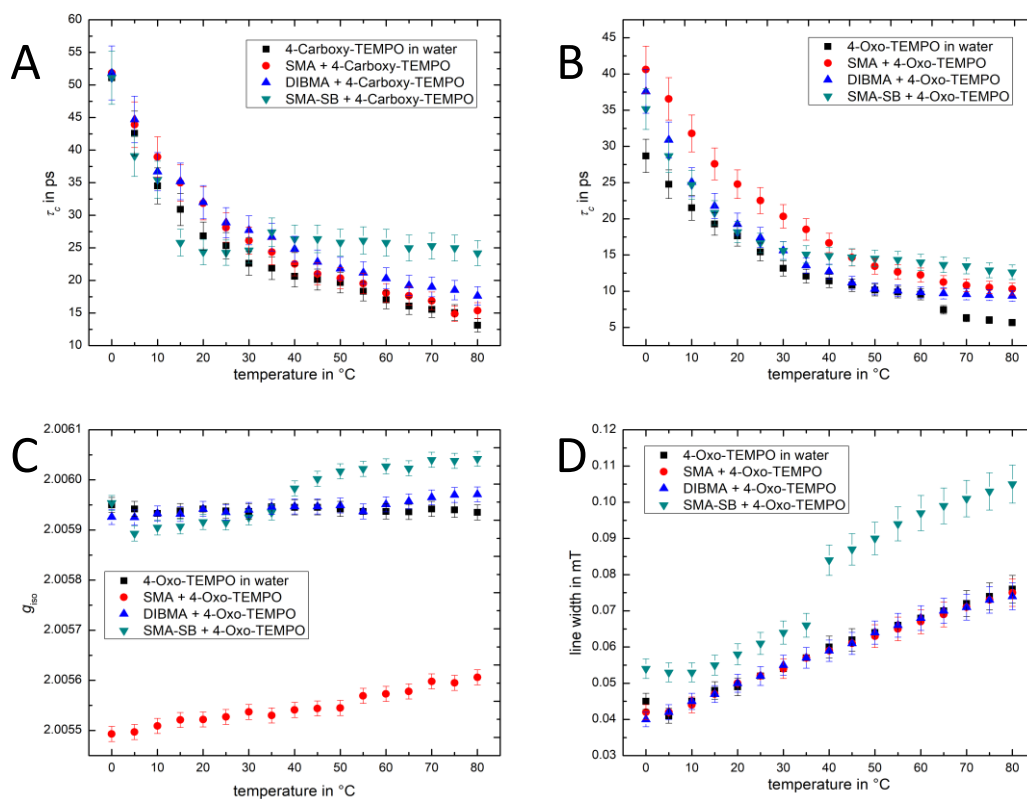


Abbildung 55 Ergebnisse von Spektralsimulationen von temperaturabhängigen CW-EPR-Spektren, gemessen bei X-Band-Frequenzen von A) 4-Carboxy-TEMPO und B-D) 4-Oxo-TEMPO mit allen Polymeren in Wasser. Temperaturabhängigkeit von A, B) τ_c , C) g_{iso} und D) der Linienbreite.

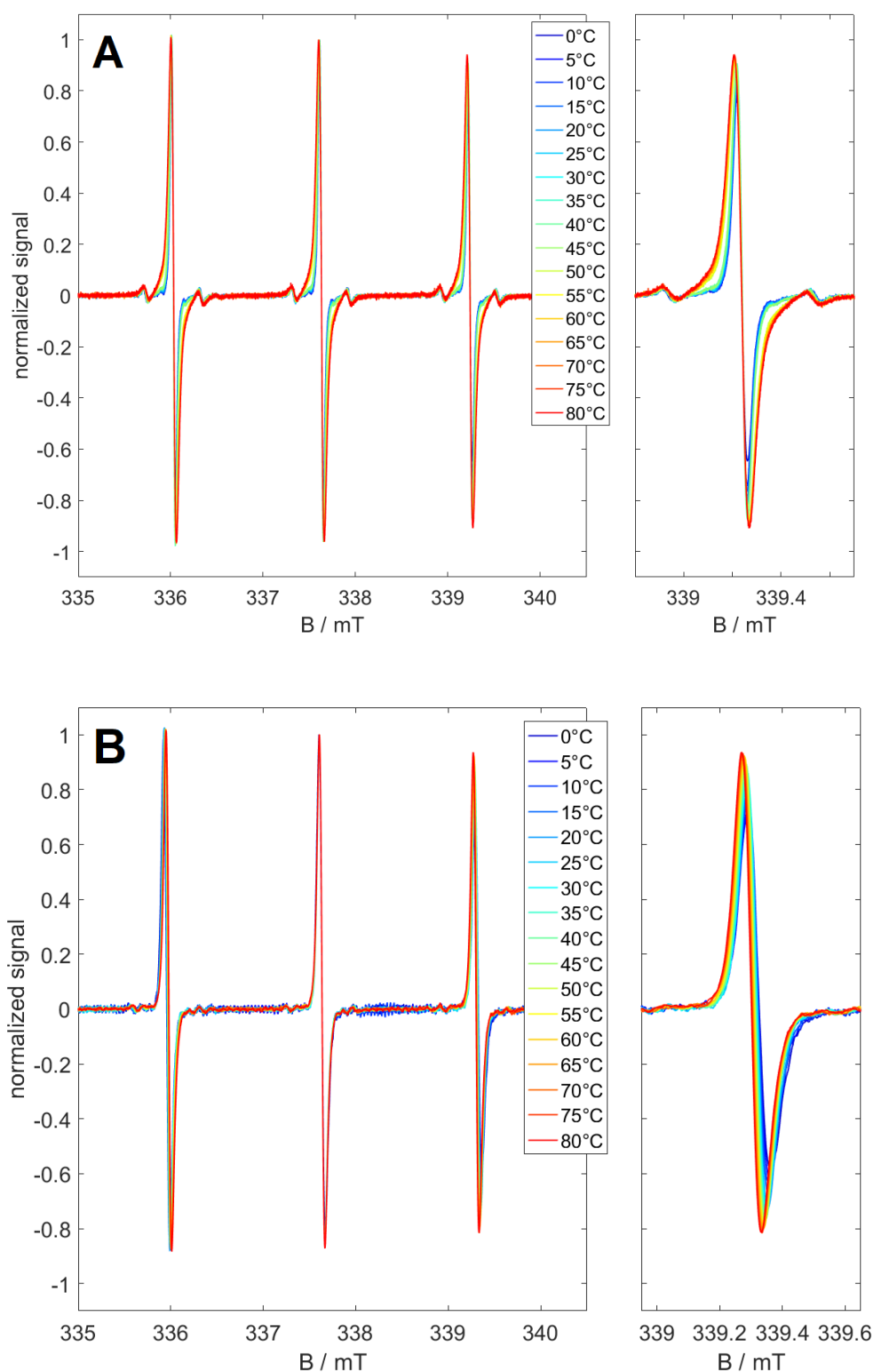


Abbildung 56 Temperaturabhängige X-Band-CW-EPR-Spektren von A) 4-Oxo-TEMPO und B) CAT-1 mit SMA-SB. Auf der rechten Seite ist der Hochfeldpeak separat dargestellt

Mittels cwEPR ist es nun möglich diese Öffnung von SMA-SB von seiner aggregierten zu seiner löslichen Form nachzuweisen und zu beobachten, wie die temperaturabhängige

Veränderungen in den Wechselwirkungsmustern zwischen den eingesetzten Spinsonden und den Polymeren SMA und DIBMA sind. In Abbildung 56 sind die cwEPR-Spektren von 4-Oxo-TEMPO und CAT-1 in wässriger Lösung mit SMA-SB bei ausgewählten Temperaturen dargestellt, die in Kombination mit den im Anhang hinterlegten Daten die Grundlage für die folgenden Diagramme bilden.

Die Spektren zeigen eine temperaturbedingte Linienverbreiterung, die für den Hochfeld-Peak am stärksten ausgeprägt ist und nicht auf einen Signalverlust zurückzuführen ist. (Abbildung 164 und Abbildung 165). Die Linienverbreiterung ist ausgeprägter für 4-Oxo-TEMPO als für CAT-1. Insgesamt zeigen alle Spektren einen weitgehend isotropen Charakter (z. B. die nahe gleichen Linienhöhen) mit einer etwas größeren Anisotropie für CAT-1. Daraus lässt sich ableiten, dass 4-Oxo-TEMPO nur schwach mit dem Polymer wechselwirkt, während CAT-1 als positiv geladenes Nitroxidradikal dies nicht tut. Dies wurde auch durch die Simulation der temperaturabhängigen Spektren bestätigt, wobei sich ein Rotationskorrelationszeit τ_c ergab, die auf eine eingeschränkere Rotation hindeutet als dies bei frei rotierendem 4-Oxo-TEMPO der Fall wäre. Allerdings ist der berechnete τ_c -Wert niedriger als bei polymergebundenen Nitroxidradikalen (Abbildung 55B). Bei CAT-1 wurde die Rotationsmobilität durch SMA-SB nicht beeinflusst (Abbildung 57B), wie im Folgenden näher erläutert wird.

Im Fall von 4-Oxo-TEMPO ohne Polymer nahm die Linienbreite mit steigender Temperatur langsam zu, wie in Abbildung 55D zu sehen ist, was auf häufigere intermolekulare Kollisionen zurückzuführen ist.¹⁹¹ Ein ähnliches Phänomen zeigt sich bei den Mischungen aus SMA bzw. DIMBA mit 4-Oxo-TEMPO. Nur die Mischung aus SMA-SB und 4-Oxo-TEMPO verhielt sich differenzierter. Diese Mischung zeigt einen starken Anstieg der Linienbreite um 0,015 mT bei 40°C, was unterhalb der makroskopischen Übergangstemperatur von ≈ 46 °C liegt. Ein ähnlicher Effekt wurde für g_{iso} bei 40 °C festgestellt, wo man einen Wendepunkt von g_{iso} für 4-Oxo-TEMPO mit SMA-SB beobachtet (Abbildung 55 C). Verglichen mit dem stetigen Anstieg in der Mischung aus 4-Oxo-TEMPO und SMA könnte diese Veränderung auf chemische Modifikation des SMA-SB zurückzuführen sein. Es gibt eine deutliche Veränderung der Hydrophobizität, die zu Unterschieden im g_{iso} führt. Insgesamt ist g_{iso} jedoch deutlich niedriger in den SMA Gemischen, welches in der Hydrophobizität des Polymers begründet sein kann. Für SMA lässt die Vermutung nahe, dass sich die Sonde in der Grenzschicht zwischen SMA und Wasser befindet und daher eine hydrophobere Umgebung in der Nähe der Polymerkette wahrnimmt. Die amphiphile Seitenketten von SMA-SB nehmen am

Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk teil und beeinflussen somit die umgebenden Wassermoleküle. Allerdings kann SMA-SB diesen Effekt nur oberhalb des vom 4-Oxo-Tempo detektierten nanoskopischen Trübungspunkts bei 40 °C ausüben. Dies wäre damit als möglicher Grund für den beobachteten Wendepunkt zu sehen.

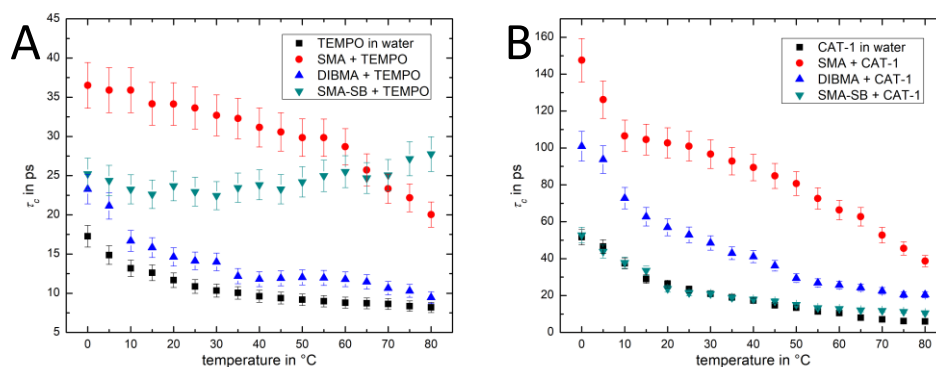


Abbildung 57 Temperaturabhängiges τ_c , gemessen bei X-Band-Frequenzen von A) TEMPO und B) CAT-1 in allen untersuchten Systemen in Wasser.

Ebenfalls in Abbildung 55 A ist auch 4-Carboxy-TEMPO dargestellt, eine anionische Spinsonde, die in der Lage ist, aufgrund elektrostatischer Kräfte mit den positiv geladenen Ammoniumgruppen des SMA-SB zu interagieren. In der Messreihe von 4-Carboxy-TEMPO sind Unterschiede des Rotationskorrelationszeit τ_c zwischen SMA-SB und den anderen Polymeren zu erkennen. Die Spinsonde ohne Polymer wie auch in ihren Mischungen mit SMA und DIBMA zeigt eine Abnahme von τ_c mit zunehmender Temperatur. Ein Rückgang von τ_c ist das Ergebnis einer schnelleren Rotation der Sonde oder der mit ihr verbundenen Polymere. τ_c von 4-Carboxy-TEMPO/SMA-SB zeigte einen „Knick“, beginnend bei 25 °C. Mit dieser Spinsonde ist der nanoskopische Trübungspunkt von SMA-SB gleichfalls zu beobachten. Diese Temperatur liegt deutlich unter dem makroskopisch beobachteten Trübungspunkt, was wiederum darauf hindeutet, dass die Sulfobetain-Seitenketten bei dieser Temperatur bereits mit der Umgebung oder direkt mit der Sonde zu interagieren beginnen. 4-Carboxy-TEMPO ist hier als nur "territorial" gebunden zu sehen.²⁰³ da im Falle einer direkt gebundenen, stark assoziierten, Sonde wäre τ_c aufgrund der vorübergehenden Immobilisierung deutlich größer. CAT-1 erweiterte die „kationische Sichtweise“ der kleinen Moleküle auf die Polymere. Es ist die einzige verwendete kationische Sonde und zeigt im Vergleich zu 4-Carboxy-TEMPO kaum anziehende Wechselwirkungen mit SMA-SB. Offenbar übersteigt die Abstoßung der

kationischen Gruppen der Spinsonde und des Polymers eine mögliche Anziehung der kationischen Spinsonde und der anionischen Sulfonatgruppen innerhalb des Polymers. Dies wird in Abbildung 57B deutlich, da der τ_c -Wert von CAT-1/SMA-SB in ähnlicher Weise abnimmt wie der von freiem CAT-1. Im Gegensatz dazu sind die Wechselwirkungen zwischen CAT-1 und DIBMA oder SMA bemerkenswert. Beide haben noch frei zugängliche Maleinsäuregruppen, welches zu höheren τ_c Werten des „territorial“ gebundenen CAT-1 führt, als im Vergleich zum freiem CAT-1. (Abbildung 57B, 100-150 ps bzw. 60-100 ps für CAT-1 mit SMA bzw. DIBMA). TEMPO komplettiert als Referenzpunkt die temperaturabhängigen Messungen. Wie in seinem großen Octanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten²⁰⁷ zum Ausdruck kommt, kann TEMPO hydrophobe Regionen zu detektieren und bereits in Hunold und Kurzbach beschrieben.^{20,189} Während freies TEMPO und TEMPO/DIBMA Gemische kleine τ_c -Werte aufweisen, die mit steigender Temperatur rasch abnehmen, zeigen die TEMPO/SMA Gemische bei niedrigen Temperaturen einen deutlich höheren τ_c -Wert. Die hydrophoben Phenylgruppen, des Styrolgerüsts von SMA können im Gegensatz zu den Diisobutyleneinheiten von DIBMA hydrophobe "Taschen"-Regionen darstellen, mit denen TEMPO assoziiert werden kann. Unterhalb von 60 °C scheinen diese Taschen ausreichend stabil zu sein, da τ_c in diesem Temperaturbereich nur um 7 ps abnimmt. Dies deutet auf eine beständige Immobilisierung trotz steigender thermischer Energie hin. Oberhalb von 60 °C scheinen diese hydrophoben Bereiche für TEMPO jedoch zusammenzubrechen, was zwei Ursachen haben könnte: i) die abnehmende Polarität¹⁹¹ des Wassers veranlasst das Polymer, seine hydrophoben Taschen nach außen zu präsentieren, oder ii) aufgrund der zunehmenden kinetischen Energie und der daraus resultierenden Seitenkettenbewegungen wird die Bildung und das Darstellen der hydrophoben Taschen schwieriger. Gegenteiliges wurde bei der Rotationkorrelationszeit τ_c für die TEMPO/SMA-SB Gemische festgestellt. Anfänglich erreicht τ_c bei 25 ps ein Plateau, beginnt aber bei 60 °C anzusteigen. Im Vergleich mit den anderen Spinsonden weist TEMPO keinen nanoskopischen Trübungspunkt auf bzw. ist hier nicht zu detektieren. Dennoch könnte es mit den Phenylgruppen in den Seitenketten des Polymers interagieren, insbesondere bei höheren Temperaturen (oberhalb des makroskopischen Trübungspunkts).

5.4. Fazit

Mit Hilfe der cwEPR-Spektroskopie konnte nachweisen werden, dass die drei nanodiscbildenden Polymere SMA, DIBMA und SMA-SB polymerspezifische nicht-kovalente Wechselwirkungsmuster mit Nitroxidradikalen aufweisen. Um verschiedene Arten von nicht-

kovalenten Wechselwirkungen (wie z. B. ionische Wechselwirkungen oder Dipol/Dipol-Wechselwirkungen) zu unterscheiden, haben wir eine Reihe von Spinsonden mit unterschiedlichen chemischen Strukturen und Funktionalitäten verwendet. Die jeweiligen Hauptwechselwirkungsmuster zwischen den ausgewählten Spinsonden und den Polymeren, die wir mit Hilfe der cwEPR-Spektroskopie erzielt haben, sind in Abbildung 58 hervorgehoben. Darüber hinaus konnten die lokalen aufgelösten strukturellen und dynamischen Eigenschaften der Polymere mit den zuvor kategorisierten ensemblegemittelten Parametern wie dem hydrodynamischen Radius und dem ζ -Potential korreliert werden, welche mit DLS bzw. ELS bestimmt wurden. Die wichtigsten Schlussfolgerungen können wie folgt formuliert werden:

- SMA-SB besitzt eine UCST in Wasser bei 46 °C, wobei unterhalb dieser Temperatur eine makroskopische Phasentrennung stattfindet.
- Das elektrokinetische Potenzial der Polymere kann die Art der erwarteten Wechselwirkungen mit anderen Molekülen vorhersagen, wobei wässrige Puffer-/Salzlösungen diesen Effekt beeinflussen.
- In SMA und DIBMA dominieren ionische Wechselwirkungen die Interaktionsmuster mit anderen Molekülen. Bei SMA-SB mit seinen zwitterionischen Seitenketten müssen schwächere nichtkovalente Wechselwirkungen wie hydrophobe Kräfte für dominante Wechselwirkungsmuster verantwortlich gemacht werden, um den eher dynamischen Zusammenbau mit Gastmolekülen wie dem Fremys-Salz zu beschreiben.
- Temperaturabhängige CW-EPR-Messungen ermöglichen die Charakterisierung des nanoskopischen Trübungspunktes, in Abhängigkeit zu den Interaktionsmustern zwischen SMA-SB und der Spinsonde. Diese nanoskopischen Trübungspunkte können dann mehr als 20 °C unterhalb der makroskopisch beobachteten Trübungspunkte / UCST auftreten.

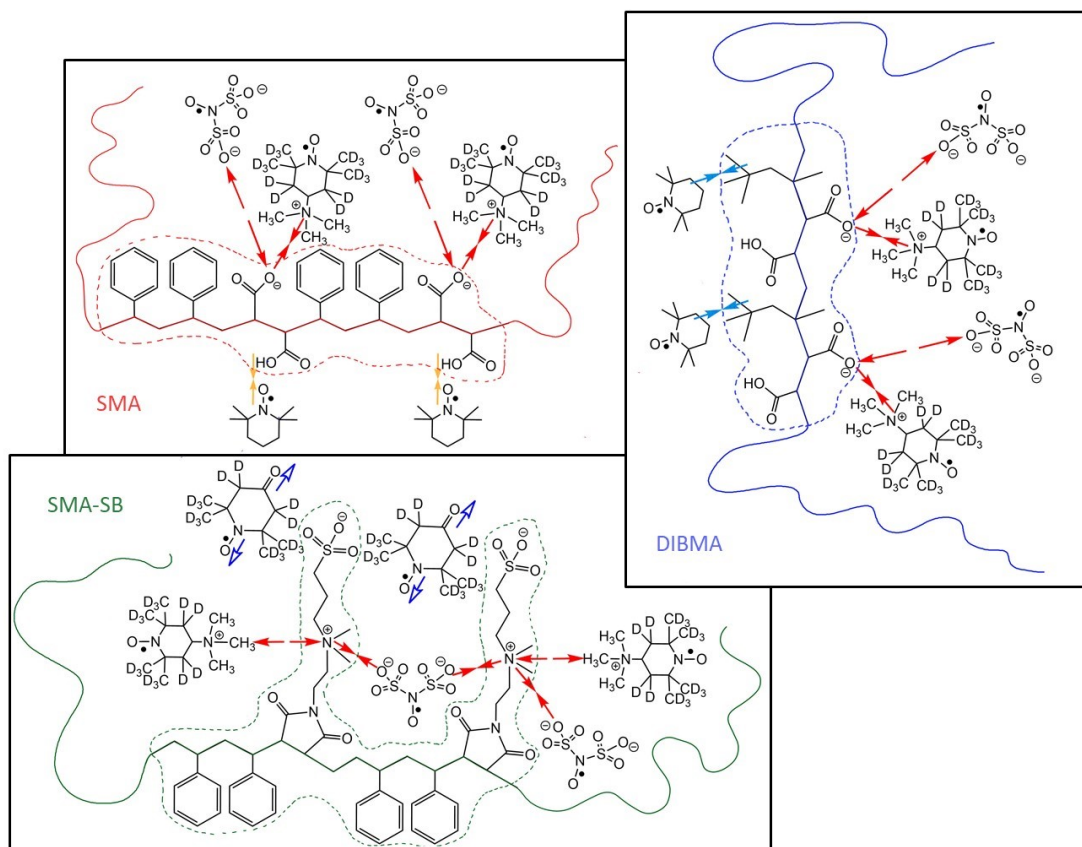


Abbildung 58 Schematische Darstellung der wichtigsten Wechselwirkungsmuster zwischen ausgewählten Nitroxidradikalen und den drei untersuchten Polymeren SMA, DIBMA, und SMA-SB, wie sie in dieser Studie gefunden wurden. Die Farben der Pfeile, die anziehende oder abstoßende Kräfte visualisieren entsprechen denen in Abbildung 50. Rot, ionische Wechselwirkungen; gelb Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol/Dipol-Wechselwirkungen; dunkelblau π/π -Wechselwirkungen; hellblau, van der Waals Wechselwirkungen

Die Unterschiede, die zwischen den Interaktionsmustern von DIBMA, SMA und SMA-SB beobachtet wurden, werden in zukünftigen Studien nützlich sein, um das Zusammenspiel zwischen diesen Polymeren und anderen kleinen bis mittelgroßen Molekülen, insbesondere Membranlipiden und Proteinen, zu verstehen. Die Wechselwirkungen zwischen Lipiden und den drei Polymeren werden in einer folgenden Studie mit spinmarkierten Lipiden, die in einer DMPC Modellmembran eingebettet sind, vorgestellt.¹⁴⁵ Schließlich könnte sich die gute Übereinstimmung zwischen den chemischen Strukturen der in dieser Studie verwendeten Spinsonden und ihren unterschiedlichen Wechselwirkungen mit den drei Polymeren als nützlich erweisen, um neue Polymere mit verbesserten Lipidsolubilisierungs- und Proteinextraktionseigenschaften zu entwickeln, um nativähnliche Nanodiscs zu bilden.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Dissertation widmet sich der molekularbiophysikalischen Untersuchung von Lipid-Protein-Wechselwirkungen unter besonderer Berücksichtigung des peripheren Myelinproteins P2 (PMP2, auch FABP8) und der Entwicklung experimenteller Werkzeuge zur Analyse solcher Interaktionen. Im Zentrum der Arbeit steht die Frage, wie Proteine wie P2 mit Fettsäuren und biologischen Membranen interagieren und in welcher Weise Punktmutationen in diesem Protein die funktionellen Eigenschaften verändern. Die Arbeit integriert dabei Methoden der Elektronenspinresonanzspektroskopie (EPR), Langmuir-Filmwaagen, synthetisch-organischer Chemie sowie die physikalische Charakterisierung von Modellmembranen in Form polymerstabilisierter Nanodiscs.

Ausgangspunkt der Untersuchung ist die Rolle von P2 im peripheren Nervensystem, wo es sowohl als Transportprotein für langkettige Fettsäuren als auch als Strukturprotein in der Myelinscheide fungiert. Durch die Analyse von vier Proteinvarianten – Wildtyp sowie die Mutanten I43N, I52T und P38G – konnte gezeigt werden, dass diese Formen des Proteins unterschiedliche Bindungseigenschaften gegenüber EPR-markierten Fettsäurederivaten aufweisen. Die cwEPR-Spektroskopie ermöglichte die Differenzierung zwischen freier, intermediärer und stark gebundener Ligandenbindung. Während der Wildtyp unter physiologischen Bedingungen überwiegend intermediär bindet, was mit einem reversiblen Transportmechanismus vereinbar ist, zeigten I52T und P38G bereits bei 37 °C eine Präferenz für stark gebundene Zustände. Die thermodynamische Analyse dieser Prozesse zeigte, dass der Übergang von intermediär zu stark gebunden bei physiologischer Temperatur nicht spontan erfolgt. Daraus ergibt sich, dass eine zu hohe Affinität in pathogenen Varianten möglicherweise die Ligandenfreigabe an das Zielorganell behindert.

Parallel dazu wurde untersucht, wie sich P2 und seine Mutanten an biologische Membranen binden. Mithilfe von Langmuir-Filmwaagen wurde der maximale Insertionsdruck (MIP) sowie die sogenannte Synergie – ein Maß für die kooperative Wechselwirkung zwischen Protein und Lipid – ermittelt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Membranaffinität des Wildtyps am höchsten war, während P38G signifikant reduzierte MIP- und Synergiewerte aufwies. Fluoreszenzmikroskopische Analysen bestätigten diese Befunde: Nur der Wildtyp war in der Lage, größere Proteincluster zu bilden, die sich an den Phasengrenzen zwischen Domänen unterschiedlicher Lipidzusammensetzung anreicherten. In Zwei-Kanal-Fluoreszenzaufnahmen

mit Alexa-488-markierten Proteinen ließ sich die spezifische Lokalisierung von P2 an diesen Grenzflächen sichtbar machen, was Rückschlüsse auf seine Rolle bei der lateralen Organisation der Myelinmembran zuließ.

Zur Erweiterung des methodischen Spektrums wurden im weiteren Verlauf der Arbeit neuartige EPR-aktive Xanthin-Derivate synthetisiert. Diese Derivate sind primär als Sonden für die Untersuchung des Ryanodinrezeptors (RyR) konzipiert, bieten aber aufgrund ihrer strukturellen Modularität ein breiteres Anwendungsspektrum. Diese Sonden basieren auf den Xanthin-Derivaten Coffein, Theobromin und Theophyllin und wurden an unterschiedlichen Positionen funktionalisiert, um eine strukturelle Variation hinsichtlich Spacer-Länge, Bindungsgeometrie und Spinsonde (Carboxy-TEMPO, TEMPOL) zu ermöglichen. In Glycerol-Wasser-Gemischen zeigten die Sonden charakteristische Unterschiede in ihrer Rotationsdynamik, die auf Wechselwirkungen mit mikroskopisch unterschiedlichen Solvathüllen hindeuten. Insbesondere das Theophyllin-Derivat RYR-7 bildete zwei Spezies mit unterscheidbarer Dynamik aus, was als Indikator für molekulare Sensitivität gegenüber Lösungsmittelheterogenität interpretiert werden kann.

Ein thematischer Übergang ergibt sich aus der Überlegung, wie sich Membranproteine, mit zum Teil komplexen Anforderungen, wie das P2 oder RyR, in für die Grundlagenforschung zugänglichen System darstellen lassen. In diesem Zusammenhang wurden polymerbasierte Nanodiscs als Plattform für künftige EPR-Untersuchungen herangezogen. Diese Nanodiscs bestehen aus amphiphilen Copolymeren wie Styrol/Maleinsäure (SMA), Diisobutylen/Maleinsäure (DIBMA) und einem zwitterionischen Sulfobetain-Derivat von SMA (SMA-SB), die in der Lage sind, Lipidmembranen ohne den Einsatz klassischer Detergenzien zu stabilisieren. Mittels cwEPR wurden die Wechselwirkungen dieser Polymere mit unterschiedlichen Spinsonden charakterisiert, wobei Unterschiede in Polarität, Mikroviskosität und Beweglichkeit herausgearbeitet werden konnten. SMA zeigte stärkere Wechselwirkungen mit hydrophoben Sonden, DIBMA eine ausgeprägtere Rotationsfreiheit der Sonden, während SMA-SB eine abgeschwächte Wechselwirkung mit polaren Spinsonden aufwies. Diese Ergebnisse wurden durch DLS-Messungen zur Partikelgrößenbestimmung und elektrophoretische Lichtstreuung zur Bestimmung des Zeta-Potentials ergänzt.

Die Untersuchung dieser polymerbasierten Nanodisc-Systeme bildet somit nicht nur eine methodische Erweiterung, sondern schließt die thematische Klammer zwischen der Proteinbindung auf molekularer Ebene und der strukturellen Organisation in

membranähnlichen Umgebungen. Die Kombination aus spezifischen EPR-Sonden, biophysikalischer Analytik und polymergestützten Membranmodellen erlaubt eine gezielte Differenzierung von Protein-Ligand-Interaktionen in naturnahen Kontexten. Die Ergebnisse schaffen eine Grundlage für weiterführende Studien, die die strukturelle und funktionelle Integration von Membranproteinen in künstliche, aber naturnaher Umgebungen zum Ziel haben.

7. Material und Methoden

7.1. P2 –Material und Methoden

P2 – Filmwaage Experimente Material und Methoden

Materialien

Das periphere Myelinprotein P2 wurde wie beschrieben,⁵ rekombinant hergestellt, in HEPES-gepufferter Kochsalzlösung (HBS) (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4) mit einer Zielkonzentration von 500 µM gelöst und bei 4 °C gelagert. Die Lipide *L*-α-Phosphatidylcholin (PC), *L*-α-Phosphatidylserin (PS), *L*-α-Phosphatidylethanolamin (PE), Sphingomyelin (SM) aus Schweinehirn, *L*-α-Phosphatidylinositol (PI) aus Rinderleber und Cholesterin (ch) aus Schafswolle wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) bezogen. Der Fluoreszenzfarbstoff 1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanol-amin-N-(lissaminrhodamin B sulfonyl) (RhoB-DHPE) (~560/580 nm Anregungs-/Emissionsmaximum⁷³) wurde von der Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland), und der Alexa-488-NHS-Ester (~490 /513 nm Anregungs-/Emissionsmaximum⁷²) wurde von Fisher Scientific, Leicestershire, Großbritannien, bezogen. HPLC-Chloroform wurde von der Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Alle oben genannten Substanzen wurden ohne weitere Reinigung verwendet.

Lipid Präparation

Die Lipidmischung in den Monoschichten hat eine ähnliche Zusammensetzung wie die zytoplasmatische Schicht des peripheren Nervensystems (cyt-Monoschicht), mit einem Molverhältnis von ch:PE:PS:PC:SM:PI; 37:22:19:9:9:4).¹²⁸ Die Lipide wurden in Chloroform (HPLC-Qualität) gelöst und bei -20 °C gelagert. Die endgültige Gesamtlipidkonzentration der Spreitlösungen betrug 0,5 mM.

Protein labelling

20 µM natives P2 wurde 30 Minuten lang mit 60 µM Alexa-488-NHS-Ester, gelöst in HEPES/NaCl (10 mM/NaCl 150 mM) mit einem pH-Wert von 8,5, bei einem Volumen von 200 µl in einer Mikrotitrierplatte inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Säule (gefüllte Sephadex G10-Minisäule) mit 3 x 3 ml HEPES/NaCl-Puffer (10 mM/150 mM) pH 7,5 gespült,

anschließend mit 200 µl Inkubationslösung und weiteren 300 µl Elutionspuffer (HEPES/NaCl-Puffer (10 mM/150 mM) pH 7,5) hinzugefügt, gefolgt von weiteren 600 µl Elutionspuffer. Die konjugathaltigen Fraktionen wurden vereinigt und die Fluoreszenzintensität und Proteinkonzentration mit dem NanoDrop (ThermoFisher) bestimmt.

Langmuir-Monoschichten bei konstanter Oberfläche auf Pockels-Langmuir-Filmwaagen

Für Berechnung von MIP und Synergien wurde der Oberflächendruck auf zwei runden, mit Teflon beschichteten Langmuir-Trögen gemessen. Die chloroformhaltige Lipid-Lösung wurde mit einer Hamilton-Spritze tropfenweise auf der Wasseroberfläche verteilt. Nach dem Verteilen wurde eine Wartezeit von 20 bis 30 Minuten für die Chloroformverdampfung eingehalten. Der Trog war mit einer Wilhelmy Waage mit Filter-Papier (Wilhelmy-Plättchen, Riegler & Kirstein GmbH, Potsdam, Deutschland) ausgestattet. Vor den Messungen wurde der Trog mit Hellmanex® und ultrareinem Wasser gereinigt sowie ein neues Filter-Papier Plättchen verwendet. Alle Experimente wurden bei $20 \pm 0,1$ °C durchgeführt. Für Proteinversuche wurde eine P2-Stammlösung mit einer Spritze unter die äquilibrierte Lipid-Monoschicht injiziert. Durch einen kugelförmigen Magnetrührer wurde die Lösung leicht gerührt. Die endgültige Konzentration von P2 im Trog betrug 200 nM. Um eine staubfreie Umgebung zu gewährleisten und die Wasserverdunstung zu minimieren, wurde die Wanne in eine speziell angefertigte Acrylglasshülle eingeschlossen.

Epifluoreszenzmikroskopie an einer Kompressionsfilmwaage

Für die Messung der Oberflächendruck-Flächenkompressionsisothermen von Lipidmonoschichten wurde die Lipidmischung auf einer Subphase aus Puffer mit oder ohne Protein verteilt. Es wurde eine teflonbeschichtete Langmuir-Trog ($266 \times 99 \times 3$ mm³) verwendet und die chloroformhaltige Lipidlösung wurde mit einer Hamilton-Spritze tropfenweise verteilt. Nach dem Verteilen wurden 20 Minuten für die Verdunstung von Chloroform eingeräumt. Der Trog ist mit einer Wilhelmy-Waage mit Filter-Papier (Riegler & Kirstein GmbH, Potsdam, Deutschland) und zwei symmetrisch beweglichen Barrieren ausgestattet, die den Film mit $2 \text{ \AA}^2/(\text{Molekül} \cdot \text{min})$ komprimierten. Vor den Messungen wurde der Trog mit Hellmanex® und ultrareinem Wasser gereinigt, sowie ein neues Filter-Papier Plättchen verwendet. Alle Experimente wurden bei $20 \pm 0,1$ °C durchgeführt. Der

Gesamtlipidgehalt wurde bei 27,9 nmol konstant gehalten, um alle Experimente in der gasanalogen Phase der Monoschicht und Isotherme zu beginnen. Für Proteinversuche wurde eine P2-Stammlösung mit einer Spritze durch die äquilibrierte Lipidmonoschicht an fünf verschiedenen Positionen injiziert, um eine gleichmäßige Verteilung in der Puffersubphase zu erreichen. Die endgültige Trogkonzentration von P2 betrug 200 nM. P2 wurde bei einem Oberflächendruck von 20 mN/m injiziert.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen an der Luft-Wasser-Grenzfläche wurden mit einem Axio Scope A1 Vario-Epifluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Deutschland) aufgenommen, bei gleichzeitiger Aufzeichnung von Kompression und Oberdruck der Monoschicht. Die Filmwaage (siehe oben) unter dem Mikroskop wurde auf einem x-y-z-Tisch (Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland) montiert, der über ein MAC5000-System (Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA) bewegungsgesteuert wurde. Um eine staubfreie Umgebung zu gewährleisten und die Wasserverdunstung zu minimieren, wurde die Wanne in eine speziell angefertigte Acrylglasschale eingeschlossen. Das Mikroskop war mit einer kompakten Lichtquelle HXP 120 C (Quecksilber-Kurzbogen-Reflektorlampe), einem Objektiv mit großem Arbeitsabstand (LD EC Epiplan-NEOFLUAR 50×) und einer für den Fluoreszenzfarbstoff geeigneten Filter-/Strahlteiler-Kombination ausgestattet, die alle von Carl Zeiss MicroImaging (Jena, Deutschland) stammten. Die Bilddaten wurden mit einer EMCCD-Kamera (ImageEM C9100-13, Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) aufgenommen und mit der AxioVision-Software (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Deutschland) erfasst. Alle hier gezeigten Bilder zeigen Bereiche individuell kontrastangepasster Rohdaten. Jede Lipidmischung wurde mit 0,05 Mol-% Rho-B-DHPE versetzt, wodurch die Menge an nativen PE um 0,05 Mol-% reduziert wurde. Für Experimente mit Alexa-488-markiertem P2-Protein wurden 10 Mol-% des gesamten P2-Gehalts durch markiertes P2-Konjugat ersetzt.

EPR Experimente

P2 wurde wie beschrieben,⁵ rekombinant hergestellt, in HEPES-gepufferter Kochsalzlösung (HBS) (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4) mit einer Zielkonzentration von 500 µM gelöst und bei 4 °C gelagert. 5-DSA wurde als Ammoniumsalz von Avanti Polar Lipids (Merck) erworben. Es wurde in HEPES/NaCl-Pufferlösung mit einem pH-Wert von 12 gelöst, 10 Minuten lang mit Ultraschall behandelt und dann in HEPES/NaCl-Puffer verdünnt, um eine 0,5

mM Stammlösung bei pH 7,5 zu erhalten. 16-DSA wurde von Sigma Aldrich als unmodifizierte Fettsäure bezogen. Im Gegensatz zu 5-DSA wurde 16-DSA zunächst in 0,1 M Kaliumhydroxidlösung (Carl Roth GmbH & Co KG, Reinheit $\geq 85\%$) gelöst und dann ähnlich behandelt, Stammkonzentration 0,5 mM bei pH 7,5.

cwEPR-spektroskopische Messungen wurden bei X-Band-Frequenzen ($\sim 9,4$ GHz) mit einem Benchtop-Spektrometer Magnettech MS-5000 (Freiberg Instruments GmbH, Freiberg) durchgeführt. Um temperaturabhängige Messungen durchzuführen, wurde das Gerät an einen Temperaturregler H04 Freiberg Instruments, Freiberg, Deutschland) angeschlossen. Die Proben wurden in PCR-Gefäßen mit geringer Bindung (250 μ l) vorbereitet. Protein- und 5/16-DSA-Lösungen wurden mit HEPES/NaCl-Puffer bei pH 7,5 gemischt, um Proben mit einer konstanten 5/16-DSA-Konzentration von 20 μ M und variierenden FABP-Konzentrationen von 200, 100, 50, 35, 25, 20, 15, 10 und 5 μ M zu erhalten. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurden die Proben in Glaskapillaren überführt, die mit „Critoseal“ versiegelt wurden. Zunächst wurden Lösungen mit 20 μ M 5/16-DSA als Referenz bei 37 °C gemessen. Die Konzentrationsreihen von FABP mit 20 μ M 5/16-DSA wurden direkt nach Herstellung und Äquilibrierung bei 37 °C gemessen. Anschließend wurden die Probenkapillaren bei 4 °C gelagert und die nachfolgenden temperaturabhängigen Messungen durchgeführt. Sie wurden als Temperaturreihe von -30 °C bis 90 °C mit schrittweisen Messungen alle 10 oder 5 K und einer abschließenden Messung bei 37 °C durchgeführt. Alle Messungen bestanden aus 10 Scans mit jeweils 60 s Messzeit. Der Felddurchlauf wurde von 332,5 bis 342,5 mT mit einer Modulationsamplitude von 0,1 mT und einer Modulationsfrequenz von 100 kHz eingestellt. Es wurde eine Mikrowellenleistung von 4,79 mW verwendet.

Analyse

Für die Darstellung der gemessenen Spektren und der EPR-Spektralsimulationen wurden MATLAB (Version, R2018b) und das Easyspin-Paket (Version easyspin-6.0.0-dev.43) verwendet. Die von Schneider und Freed entwickelte Easyspin-Funktion „Chili“ für cwEPR-Spektren im Bereich langsamer Bewegungen wurde angewendet^{208,209} und Spektralkomponenten wurden simuliert. Für alle Systeme wurde ein Elektronenspin von $S = 1/2$ festgelegt. Durch Berechnung der Doppelintegrale der Komponenten wurden ihre Anteile simuliert. Die Fehlerbalken für simulierte Komponentenanteile (Φ) in Bindungskurven wurden anhand der quadratischen Mittelwertabweichungen (RMSD) der Simulationen als absolute Fehler ($\Phi \pm \text{RMSD} \%$) geschätzt. Es ist zu beachten, dass es sich bei dieser Strategie um eine

Schätzung handelt, da die beitragenden Teilfehler der simulierten Parameter a_{iso} und $\tau_{c, iso}$ zur Vereinfachung vernachlässigt werden. Die aus den Simulationen abgeleiteten Fehler der Werte K_D und ΔG wurden geschätzt (in Fällen, in denen K_D aus den Bindungskurven abgelesen wurde) oder über die Fehlerfortpflanzung berechnet. Die simulierten Werte der Landé-Faktoren g und der Rotationskorrelationszeiten τ_c sind im Anhang angegeben. Die scheinbare Hyperfein-Kopplungskonstante A' wird mit allen Tensorwerten A'_{xx} , A'_{yy} , A'_{zz} angegeben, obwohl meistens nur A'_{zz} geändert wurde. Die relativen Fehler von τ_c wurden *durch ein* Versuch-und-Irrtum-Verfahren geschätzt, während die Fehler von A'_{zz} und a_{iso} in ähnlicher Weise auf $\pm 1\%$ geschätzt wurden. Die Parameterwerte wurden für verschiedene Isoformen, FABP-Konzentrationen, Spin-Sonden und Temperaturen angepasst.

7.2. RyR – Material und Methoden

Material

Für die Synthese der EPR aktiven Xanthin-Sonden wurden folgende Chemikalien ohne weitere Aufreinigung von der Merck (Darmstadt) bezogen und verwendet: 1-Brom-3-Chlorpropan, 4-Carboxy-TEMPO, 4-Hydroxy-TEMPO, 8-Bromocoffein, Aluminiumoxid, 2-Aminoethanol, 3-Aminopropanol, Bromethanol, DCC, DMAP, Essigsäure, Iod, Kaliumhydroxid, Kieselgel 60, Natriumhydrid, Natriumhydroxid, Theobromin, Theophyllin, Triethylamin

Die aufgeführten Laufmittel / Lösungsmittel wurden für die Synthese und spätere Aufreinigung verwendet, diese wurden für die Verwendung sofern nötig mittels Destillation aufgereinigt und sofern nötig, gemäß Standardvorschriften, getrocknet: Ammoniak (25 %), VWR Chemicals; Ethylacetat, Roth; Acetonitril, Sigma-Aldrich; Glycerol, Sigma-Aldrich; Chloroform, Sigma-Aldrich; n-Heptan, Roth; Diethylether, Sigma-Aldrich; Methanol, Sigma-Aldrich; Dimethylfuran (DMF), Sigma-Aldrich; Tetrahydrofuran (THF), Sigma-Aldrich; Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich; Toluol, Sigma-Aldrich; Ethanol, Sigma-Aldrich

Dünnschichtchromatographie (DC)

Als stationäre Phase wurden die DC-Platten der Firma MACHEREY-NAGEL GmbH Co. KG, Düren Germany; Kieselgel 60 mit Fluoreszenz-Indikator U₂₅₄ verwendet. Für die mobile Phase wurden zur Bestimmung der R_f -Werte und Detektion die folgenden Laufmittelgemische

verwendet: Heptan/Ethylacetat 1:3; Ethylacetat/Methanol/Ammoniak (25%) 18:5:3 (in Anlehnung an TIAFT 4)²¹⁰

Die Detektion der Syntheseprodukte erfolgt mittels Fluoreszenzlöschung der DC-Platte unter UV-Licht und zur zusätzliche Detektion von Syntheseprodukten mit oxidierbaren Strukturen wurde eine Iod-Kammer verwendet.

Bei Aufreinigung von Synthesemengen unter 1 g²¹¹ wurde die Aufreinigung mittel präparativer DC durchgeführt. Hierbei wurden präparative DC-Platten der Firma MACHEREY-NAGEL GmbH Co. KG, Düren Germany; Kieselgel 60 mit Fluoreszenz-Indikator U₂₅₄ verwendet, diese hatten eine Größe von 20 x 20 cm und eine Sichtdicke von 2 mm. Das verwendete Laufmittel entsprach dem der analytischen DC. Nach Trennprozess wurden die aufgereinigten Substanzbereiche mittels UV-Licht detektiert und entsprechend mit Bleistift markiert. Anschließend wurden diese Bereiche ausgekratzt und mithilfe eines entsprechenden Lösungsmittels eluiert und abfiltriert.

Säulenchromatografie (SC)

Für Syntheseproduktmengen über 1 g^{211,212} erfolgte die Aufreinigung über eine Säulenchromatographie. Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 Firma MACHEREY-NAGEL GmbH Co. KG, Düren Germany, oder aktiviertes basisches Aluminiumoxid mit dem Aktivitätsgrad Brockman I verwendet. Für ein 1 g aufzureinigende Substanz wurden 10 g Adsorbens verwendet, dies wurde zunächst in Laufmittel geschwemmt und in eine entsprechende Glassäule mit Hahn überführt. Für das Laufmittel wurde ein Polaritätsgradient gefahren, die Detektion der Elutionsfraktionen wurde eine analytische DC verwendet. Als Startlaufmittelgemische wurden folgende Laufmittelgemische verwendet, die im Fortzschreiten der chromatografischen Auftrennung zunehmend zum polarer Gradienten verschoben wurden.: Heptan/Ethylacetat 1:3; Ethylacetat/Ethanol 2:1; Ethylacetat/Methanol/Ammoniak (25%) 18:5:2 (in Anlehnung an TIAFT 4).^{210,213}

Schmelzpunktmessung

Die Schmelzpunktmessung²¹¹ Zur Messung des Schmelzpunktes wurde eine auf einer Seite geschlossene Kapillare circa 3 mm hoch mit der Analysesubstanz gefüllt und das Schmelzpunktmessgerät MP 80 Melting Point System der Firma Mettler Toledo, Greifensee Germany. Die Proben wurden im Probenraum zunächst schnell auf 10 K unter dem

prognostizierten Schmelzbereich erhitzt, sowie 5 Minuten äquiliert und anschließend mit einer Heizrate von 1K/min bis zum Schmelzpunkt weiter erwärmt.

Infrarot-Spektroskopie (IR-Spektroskopie)

Für die IR-Spektroskopie wurde das FT-IR Bruker Invenio R der Firma Bruker Optics, Ettlingen Germany mit dem Aufsatz DiaMaxATR der Firma Harrick Scientific Products Inc, New York USA verwendet. Die Proben wurden dafür in fester Form im Wellenzahlbereich von 4000 cm^{-1} bis 400 cm^{-1} vermessen. Die Spektren wurden mithilfe des Programms Opus (Version 8.0) einer ATR-Korrektur unterzogen. Aus historischen Gründen²¹³ wird im Spektrum nicht die Wellenlänge λ , sondern die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ als der Energie proportionale Größe angegeben. Die Wellenzahl entspricht dabei dem Reziproken der Wellenlänge.

Kernresonanzspektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance* – NMR)

Die Proben wurden für die Messung in einem deuterierten Lösungsmittel gelöst (d-Chloroform; d-Methanol). Die ^1H -NMR Spektren wurden am Agilent Technologies 400 MHz VNMR5 beziehungsweise dem Agilent Technologies 500 MHz DD2 bei einer Frequenz von 400 MHz beziehungsweise 500 MHz aufgenommen. Die Auswertung der Spektren wurde mit dem Programm MestReNova 12 (2017) durchgeführt.

Massenspektrometrie (MS)

Die Spektrogramme wurden mit einem Finnigan LCQ Classic der Firma Thermo Fisher Scientific Incorporation mit einem ESI Interface aufgenommen. Dazu wurden die Proben in DMF gelöst und $20\ \mu\text{l}$ der Lösung mittels Spritzpumpe bei einer Kapillartemperatur von $220\text{ }^\circ\text{C}$ und einer Spannung von $4,5\text{ kV}$ ionisiert. Dabei wurde in einem m/z -Bereich von 50 bis 1200 gescannt. Die Spektren wurden bei positiver und negativer Ionisation aufgenommen.

cwEPR

Die cwEPR Messungen bei X-Band-Frequenz wurden mit dem Spektrometer Miniscope MS5000 (Freiberg Instruments, Freiberg, Deutschland) durchgeführt. Um temperaturabhängige Messungen durchzuführen, wurde das Gerät an einen Temperaturregler H04 Freiberg Instruments, Freiberg, Deutschland) angeschlossen. Alle Spektren wurden mit einem Magnetfeld-Sweep von 10 mT, zentriert um 337,5 mT, einer Abtastzeit von 60 s, einer Modulationsamplitude von 0,02 mT und einer

Mikrowellendämpfung von 15 dB aufgenommen, was einer Mikrowellenleistung von 3,16 mW entspricht

Die cwEPR Messungen bei Q-Band-Frequenz wurde ein Bruker EMX-plus Q-Spektrometer mit einem ER5106QT-Resonator (Bruker Biospin, Rheinstetten, Deutschland) verwendet. Für die Aufnahme der entsprechenden Raumtemperaturspektren wurden die meisten Parameter aus den X-Band-Messungen übernommen. Zu beachten ist, dass die Modulationsamplitude für TEMPO und 4-Carboxy-TEMPO mit 0,05 mT gewählt wurde, während sie für 4-Oxo-TEMPO, CAT-1 und Fremy's Salz auf 0,02 mT reduziert wurde. Die reduzierte Modulationsamplitude hat einen Einfluss auf die absolute Signalintensität und das entsprechende Signal-Rausch-Verhältnis.

7.3. ND-Material und Methoden

Materialien

DIBMA (*Poly-diisobutylene-alt-Maleinsäure*; Sokalan CP 9) wurde freundlicherweise von BASF (Ludwigshafen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. SMA (2:1) (Polystyrol-Maleinsäure; Handelsname Xiran SZ30010) war ein freundliches Geschenk von Polyscope (Geleen, Niederlande). SMA-SB (Polystyrol-Maleinsäureamid-Sulfobetain) wurde aus Styrol/Maleinsäureanhydrid (2:1) synthetisiert, das mit *N, N-Dimethylethylendiamin* zu einem Maleinimid reagierte, das wiederum mit Propansulton umgesetzt wurde, um das Endprodukt zu erhalten. Die Synthese wurde von der Arbeitsgruppe Keller, Graz Österreich durchgeführt. Die Puffersalze wurden von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland, Tris-Puffersalz >99,3% und NaCl > 99,7%) bezogen. Die Spinsonden wurden aus kommerziellen Quellen bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet: TEMPO > 99% (Aldrich, St. Louis, MO), deuteriertes 4-Oxo-TEMPO > 97% D (Isotec, Miamisburg, OH), 4-Carboxy-TEMPO > 97% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), Fremy's Salz (Aldrich, St. Louis, MO) und deuteriertes CAT-1 > 98% CDN Isotopes, Quebec, Kanada).

Herstellung von Polymer- und Spinsondenlösungen

Die Polymerlösungen wurden hergestellt, indem eine entsprechende Menge entweder in Wasser (Millipore MilliQ-Wasser mit einem spezifischen Widerstand von $\rho = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) oder in Tris-Puffer ($50 \times 10^{-3} \text{ m}$ Tris, $300 \times 10^{-3} \text{ m}$ NaCl, pH 7,4) gelöst wurde, um Massenkonzentrationen von 25 mg mL^{-1} (DIBMA und SMA) bzw. 15 mg mL^{-1} (SMA-SB) bei Raumtemperatur zu erhalten, gefolgt von einer Erhitzung in Kombination mit einer

Ultraschallbehandlung für 30 min bei 70 °C. Während der Zubereitung lösten sich polyanionisches SMA und DIBMA leicht in beiden Lösungsmitteln, während sich zwitterionisches SMA-SB langsam auflöste. Nach dem Abkühlen waren DIBMA- und SMA (2:1)-Stammlösungen (und in Tris-Puffer gelöstes SMA-SB) zwei Wochen lang stabil, wenn sie bei Raumtemperatur gelagert wurden; im Gegensatz dazu kam es bei SMA-SB in Wasser zu einer Phasentrennung unterhalb seiner UCST. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits für andere Sulfobetain-Polymere gemacht.¹⁹³ Die Proben wurden aus Stammlösungen hergestellt, indem sie auf Monomerkonzentrationen auf 75 mM verdünnt wurden. Für die EPR-Messungen wurden Spinsonden-Stammlösungen mit 6 mM Spinsonde hinzugefügt, um eine endgültige Spinsondenkonzentration von 150 μ M bei einem Spin/Monomer-Verhältnis von 1:500 (mol/mol) zu erhalten. Da sich SMA-SB nicht in einer für 75 mM Monomer ausreichenden Menge auflöste, wurden die entsprechenden Ansätze auf 134 μ M Spinsonde und \approx 28,3 mM Monomer verkleinert, um ein angemessenes Spin/Monomer-Verhältnis sowie ein ausreichendes Signal/Rausch-Verhältnis zu gewährleisten.

Lichtstreuung

DLS-Experimente wurden mit einem Litesizer 500 (Anton Paar, Graz, Österreich) durchgeführt, der mit einer Mikro-Quarz-Küvette mit einem Probenvolumen von 70 μ L ausgestattet war. Die Probe wurde bei $\lambda = 658$ nm bestrahlt, und die Seitenstreuung (90°) wurde bei konstanter Temperatur gemessen. Vor jeder Messung wurde die Probe mindestens 1 Minute lang äquilibriert. Die DLS-Daten wurden mit dem Contin-Algorithmus²¹⁴ unter Verwendung der ALV-5000/E/EPP-Software (v. 3.0.1.13, ALV Laser-Vertriebsgesellschaft Langen, Deutschland) ausgewertet. cmPALS wurde mit demselben System unter Verwendung der Univette (Anton Paar) durchgeführt. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, mit einer Äquilibrierungszeit von 1 Minute vor jeder Wiederholung. Die elektrophoretischen Mobilitäten wurden gemittelt, und die ζ -Potenziale wurden wie im Theorie Teil beschrieben berechnet.

cwEPR-Spektroskopie

Die cwEPR bei X-Band-Frequenzen wurde mit dem Spektrometer Miniscope MS5000 (magnettech, Freiberg, Deutschland) durchgeführt. Um temperaturabhängige Messungen durchzuführen, wurde das Gerät an einen Temperaturregler H04 (magnettech) angeschlossen. Alle Spektren wurden mit einem Magnetfeld-Sweep von 10 mT, zentriert um

337,5 mT, einer Abtastzeit von 60 s, einer Modulationsamplitude von 0,02 mT und einer Mikrowellendämpfung von 15 dB aufgenommen, was einer Mikrowellenleistung von 3,16 mW entspricht. Für die Messungen bei Q-Band-Frequenzen wurde ein Bruker EMX-plus Q-Spektrometer mit einem ER5106QT-Resonator (Bruker Biospin, Rheinstetten, Deutschland) verwendet. Für die Aufnahme der entsprechenden Raumtemperaturspektren wurden die meisten Parameter aus den X-Band-Messungen übernommen. Zu beachten ist, dass die Modulationsamplitude für TEMPO und 4-Carboxy-TEMPO mit 0,05 mT gewählt wurde, während sie für 4-Oxo-TEMPO, CAT-1 und Fremy's Salz auf 0,02 mT reduziert wurde. Die reduzierte Modulationsamplitude hat einen Einfluss auf die absolute Signalintensität und das entsprechende Signal-Rausch-Verhältnis.

Die Probenvorbereitungsroutine war für beide Frequenzen ähnlich. Des Weiteren wurde dieselbe Charge der vorbereiteten Proben gemessen, was zu einer unvermeidlichen Lagerungszeit der Proben führte. Die Lagerungszeit konnte einige der Proben tiefgreifend beeinträchtigen. Die Proben mit Fremy's Salzes mussten frisch hergestellt werden, da es im Vergleich zu den TEMPO-basierten Nitroxidradikalen weniger stabil ist und bereits nach kurzer Zeit einen starken Signalverlust aufweist. Mikropipetten (BLAUBRAND intraMARK, Wertheim, Deutschland) wurden mit 10-15 μ L Probe gefüllt und mit Kapillarrohrdichtmittel (CRITOSEAL Leica) verschlossen. Spektralsimulationen wurden in MatLab (R2016a und R2018b) in Kombination mit dem EasySpin-Paket für EPR-Spektroskopie (v. 5.2.25) durchgeführt.²⁰⁹ Zum besseren Vergleich sind die dargestellten Abbildungen mit cwEPR-Spektren in der mittleren Feldposition überlagert.

8. Anhang

8.1. peripheres Myelinprotein 2

8.1.1. cwEPR Analytik

Tabelle 12 grundlegende cwEPR-Simulationsparameter der Spektralkomponenten für X-Band Frequenzen; g-Tensoren und A-Tensoren bei 20 μM 5-DSA Konzentration und 200 μM Proteinkonzentration

5-DSA	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	A_{xx} [MHz]	A_{yy} [MHz]	A_{zz} [MHz]	Linienbreite [mT]	
							Gauss	Lorenz
frei	2,0086	2,0055	2,0026	15,15	12,92	104,67	0,14	0
Intermediär I	2,0098	2,00543	2,0025	13,67	14,86	100,19	0	0
Intermediär II	2,0098	2,00543	2,0025	13,67	14,86	100,19	0	0
Stark gebunden	2,009	2,0058	2,0021	15	15	96	0	0,1

Tabelle 13 grundlegende cwEPR-Simulationsparameter der Spektralkomponenten für X-Band Frequenzen; D-Tensoren, $-\beta$ -Eulerwinkel und Heisenberg-Austauschfrequenzen bei 20 μM 5-DSA Konzentration und 200 μM Proteinkonzentration

5-DSA	D_{xx}	D_{yy}	D_{zz}	β -Euler- Winkel	Heisenberg- Austausch [MHz]
frei	6,913E8	1,95062E9	1,95062E9	45°	0
Intermediär I	8,77105E7	1,36861E7	3,45075E7	50°	2,7
Intermediär II	2,94136E7	2,94136E7	7,32063E7	50°	4
Stark gebunden	3e6	3e6	1e8	32°	0

Tabelle 14 grundlegende cwEPR-Simulationsparameter der Spektralkomponenten für X-Band Frequenzen; g-Tensoren und A-Tensoren bei 20 μM 16-DSA Konzentration und 200 μM Proteinkonzentration

16-DSA	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	A_{xx} [MHz]	A_{yy} [MHz]	A_{zz} [MHz]	Linienbreite [mT]	
							Gauss	Lorenz
frei	2,008	2,00551	2,00259	11,77	14,36	106,27	0	0,14
Stark gebunden	2,0092	2,0055	2,0025	14	14	100,5	0	0

Tabelle 15 grundlegende cwEPR-Simulationsparameter der Spektralkomponenten für X-Band Frequenzen; D-Tensoren, $-\beta$ -Eulerwinkel und Heisenberg-Austauschfrequenzen bei 20 μM 16-DSA Konzentration und 200 μM Proteinkonzentration

16-DSA	D_{xx}	D_{yy}	D_{zz}	β -Euler- Winkel	Heisenberg- Austausch [MHz]
frei	8,66578E8	2,47122E9	2,47122E9	50	0
Stark gebunden	4,18648E7	7,44473E7	7,44473E7	32	0

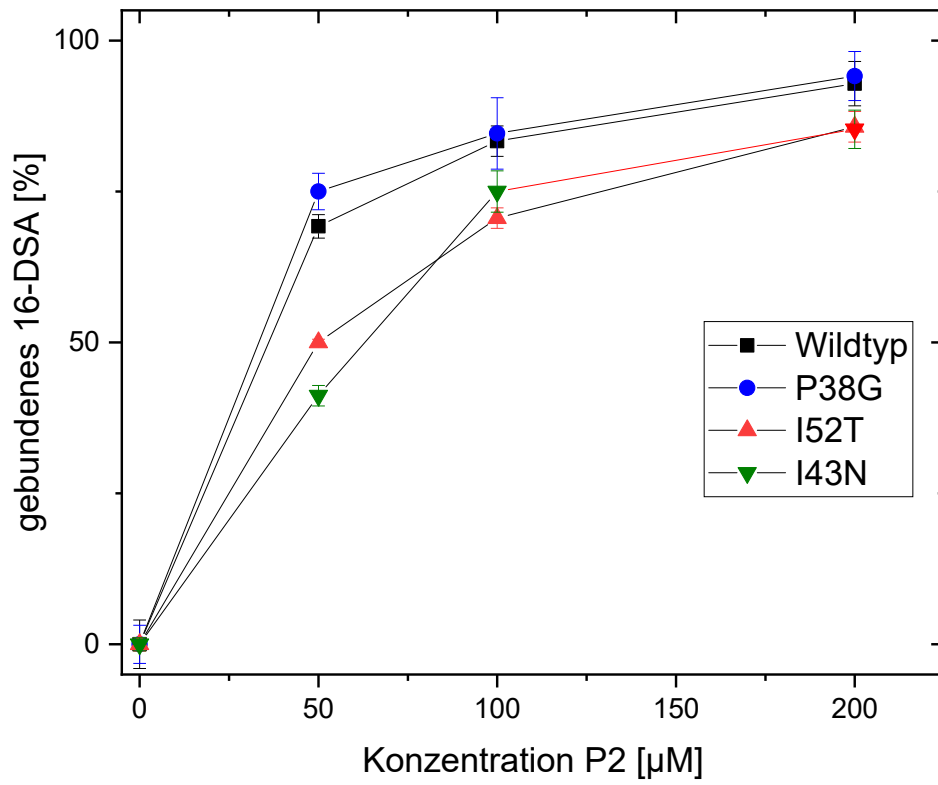


Abbildung 59 Darstellung des gebundenen Anteils an 16-DSA; bei X-Band Frequenzen im cwEPR; bei 20 μM 16-DSA zu je 200 μM Protein

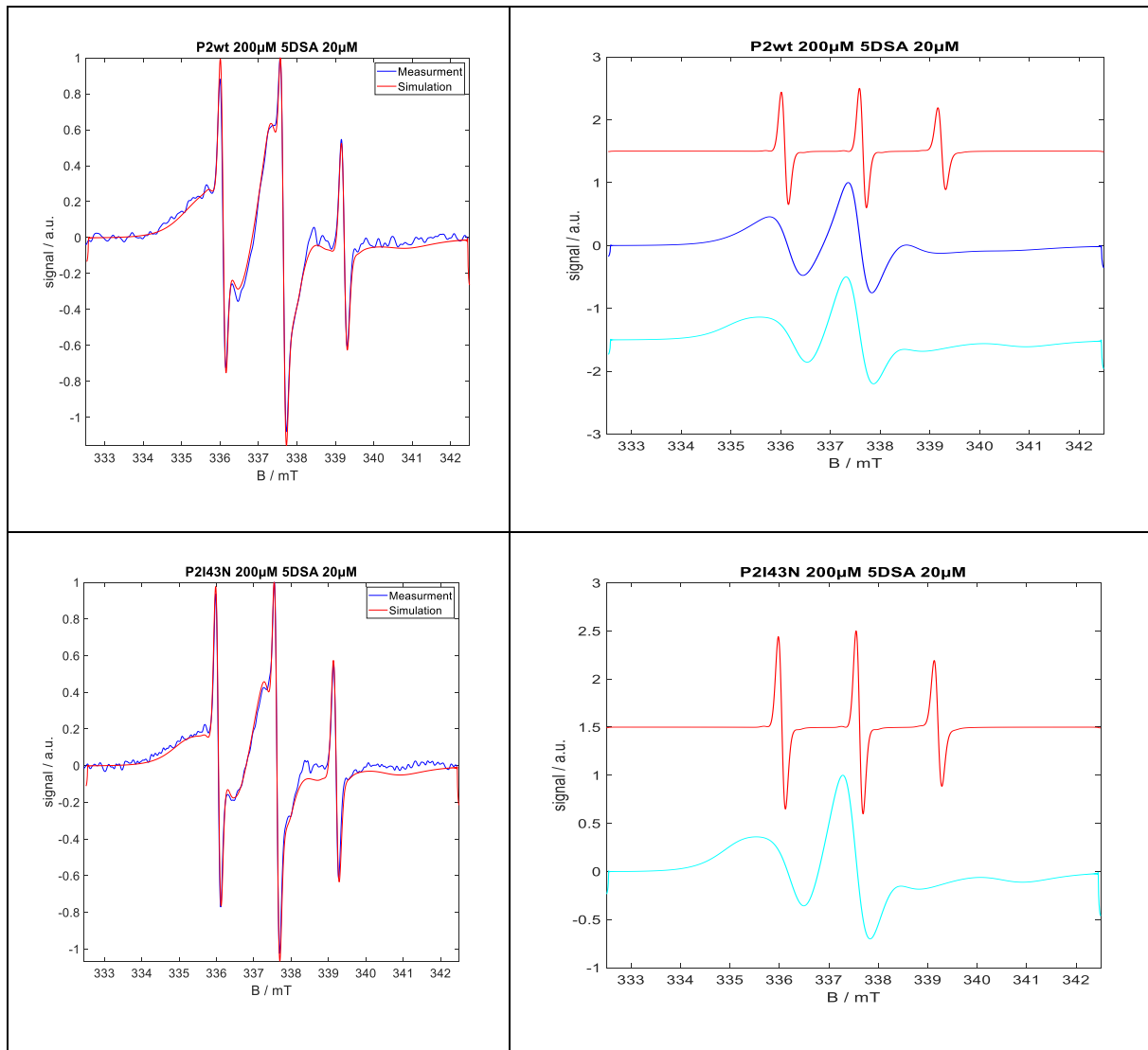


Abbildung 60 Darstellung der Simulationen gegen Messung und rechts Visualisierung der Spektralkomponenten für P2 Wildtyp und P2 I43N bei den Messungen von 37°C

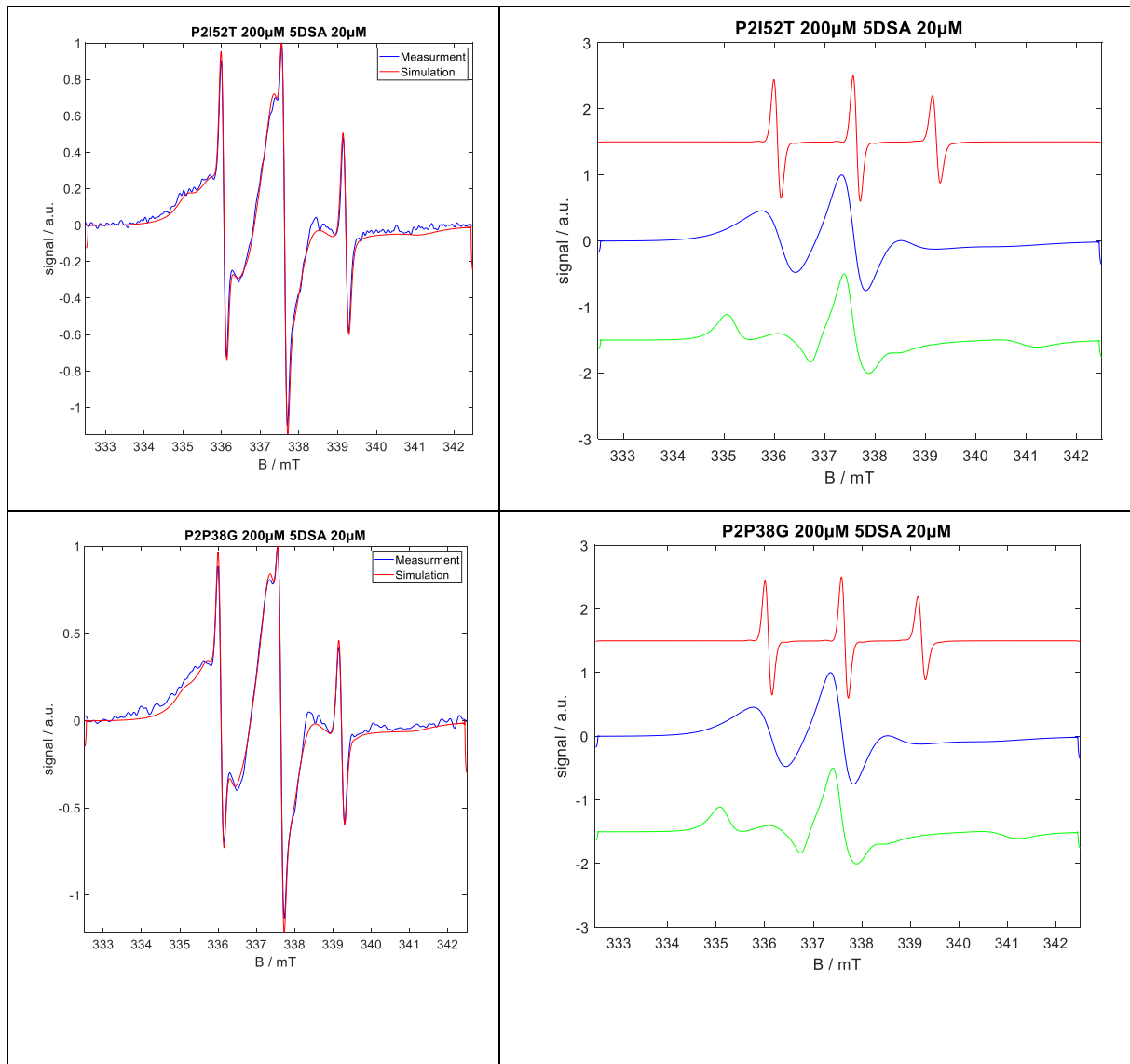


Abbildung 61 Darstellung der Simulationen gegen Messung und rechts Visualisierung der Spektralkomponenten für P2 I52T und P2 P38G bei den Messungen von 37°C

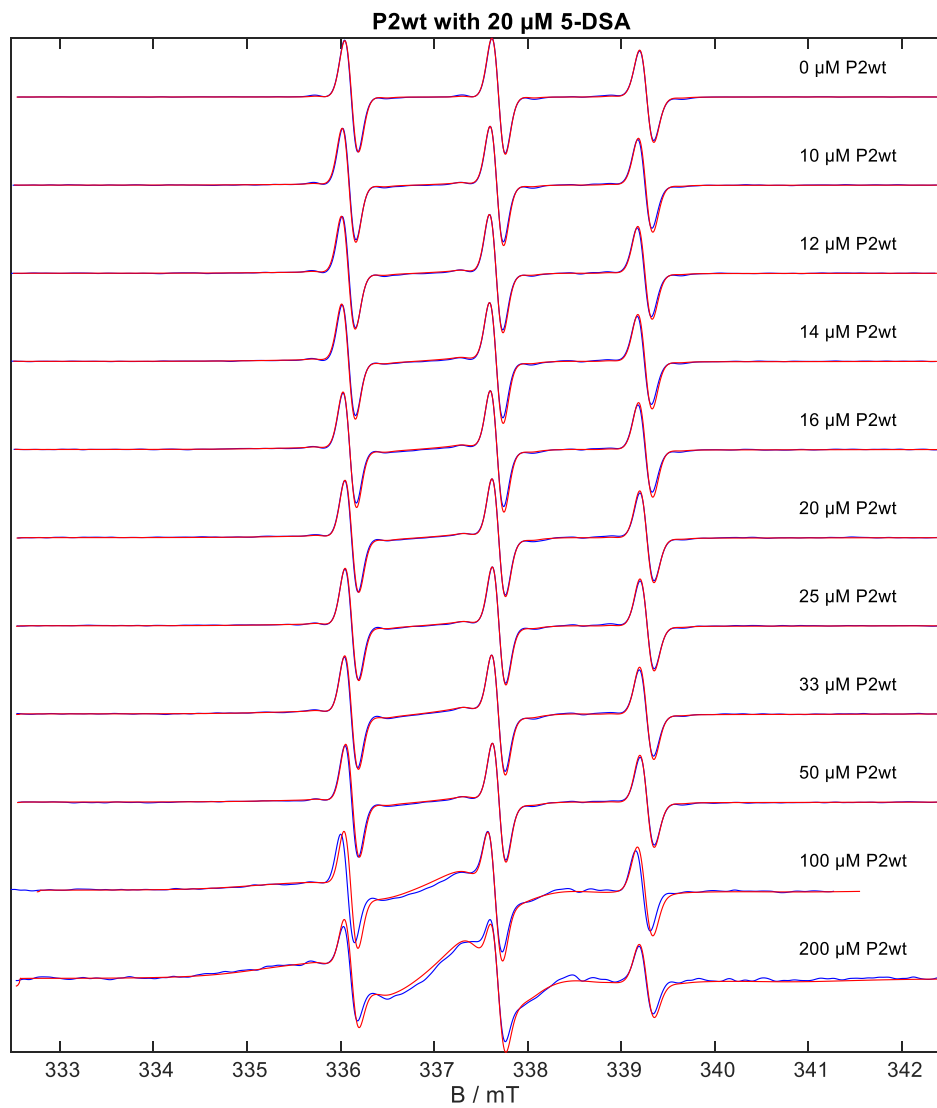


Abbildung 62 Darstellung der cwEPR-Messung (mangenta) und die dazugehörigen simulierten cwEPR-Spektren (blau) für 5-DSA bei 20 μ M mit steigender Konzentration des P2 Wildtyp von 0 μ M bis 200 μ M bei 37°C

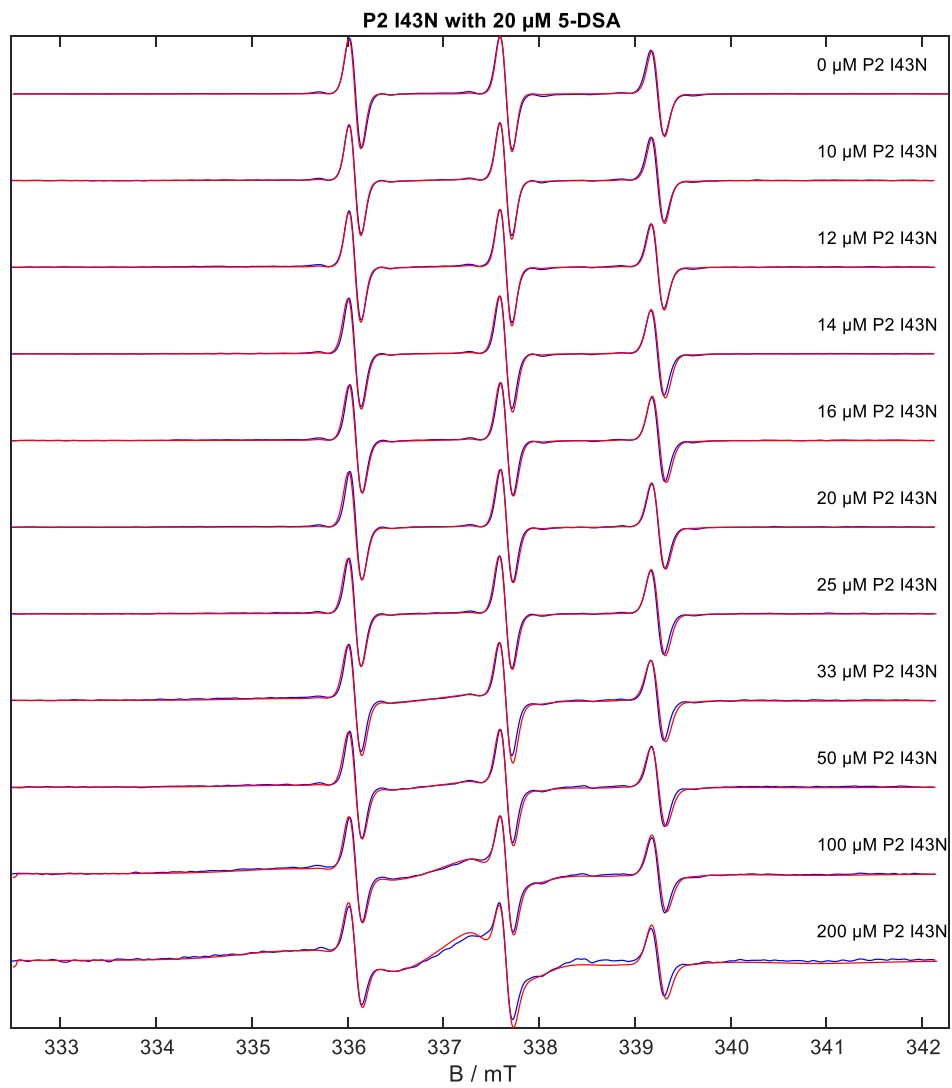


Abbildung 63 Darstellung der cwEPR-Messung (magenta) und die dazugehörigen simulierten cwEPR-Spektren (blau) für 5-DSA bei 20 μ M mit steigender Konzentration des P2 I43N von 0 μ M bis 200 μ M bei 37°C

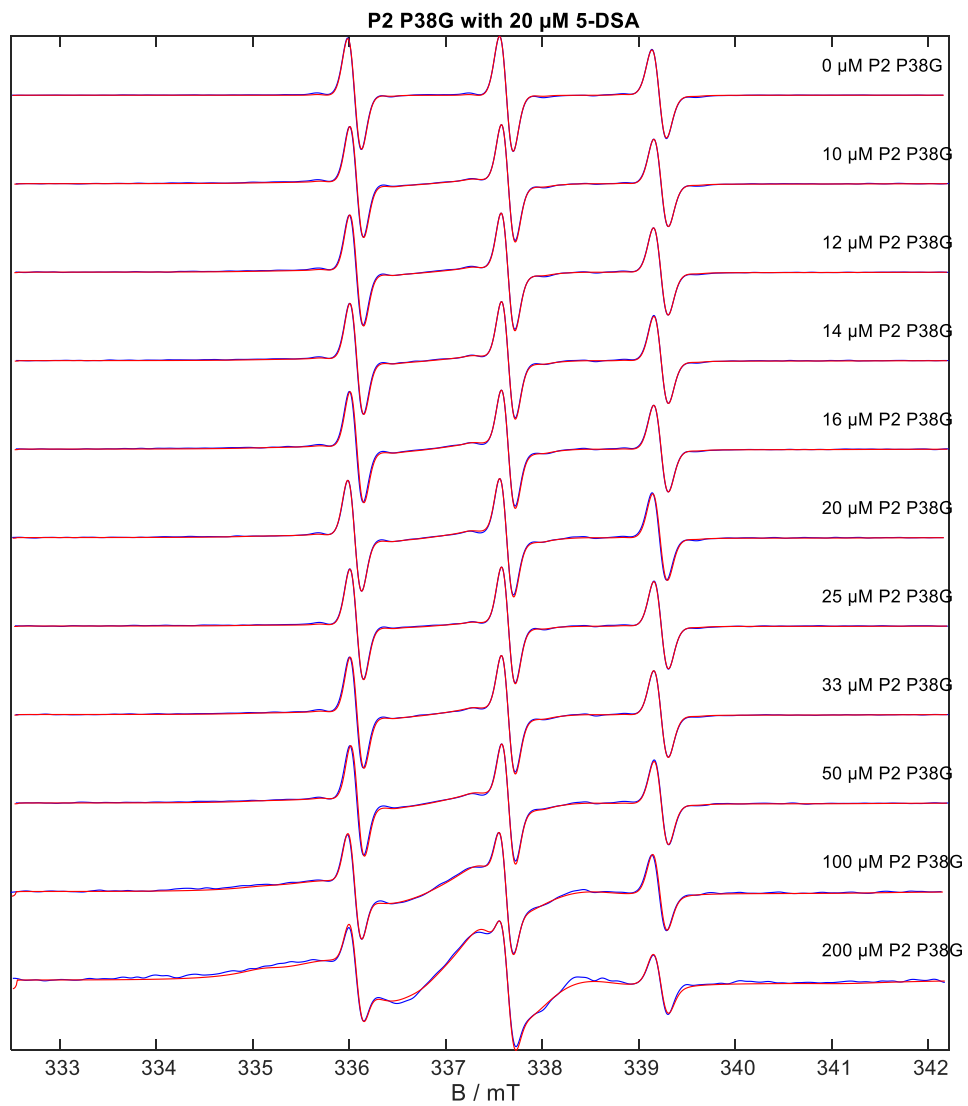


Abbildung 64 Darstellung der cwEPR-Messung (mangenta) und die dazugehörigen simulierten cwEPR-Spektren (blau) für 5-DSA bei 20 μM mit steigender Konzentration des P2 P38G von 0 μM bis 200 μM bei 37°C

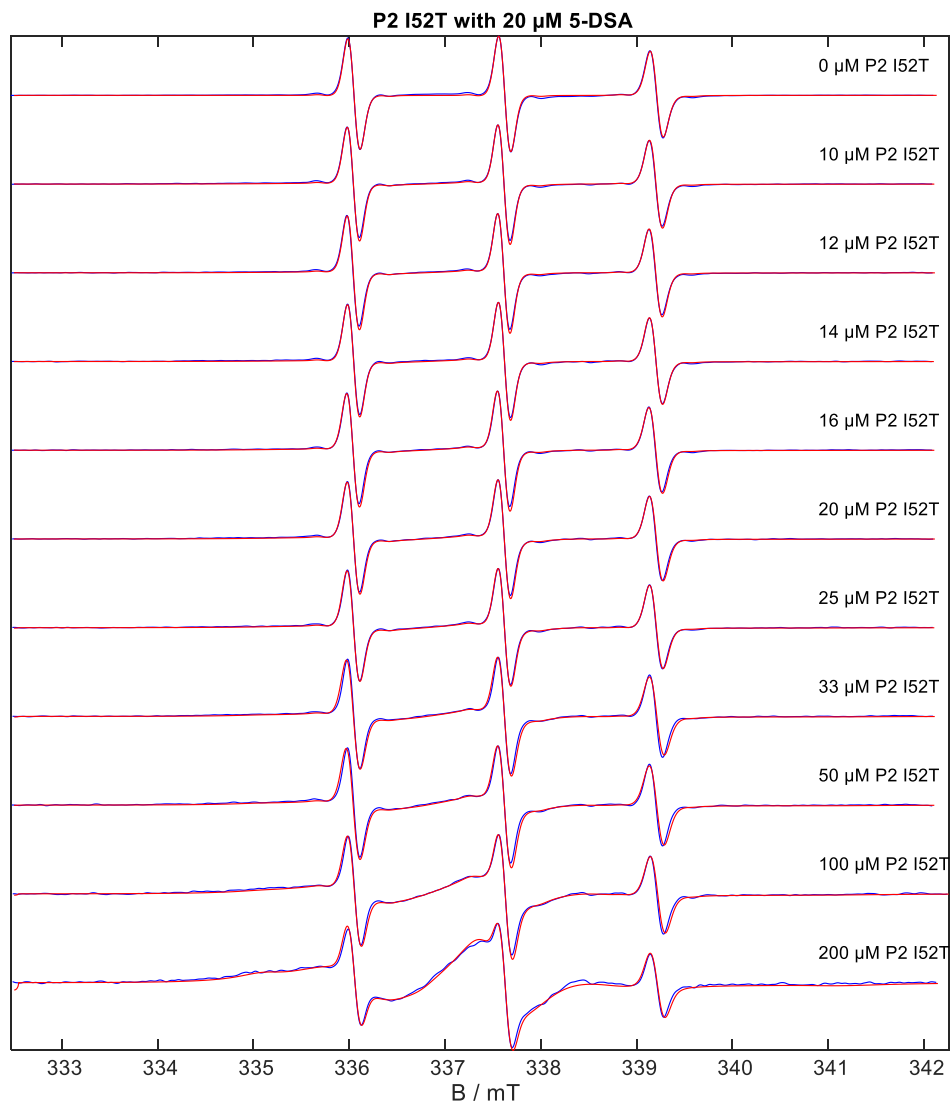


Abbildung 65 Darstellung der cwEPR-Messung (mangenta) und die dazugehörigen simulierten cwEPR-Spektren (blau) für 5-DSA bei 20 μ M mit steigender Konzentration des P2 I52T von 0 μ M bis 200 μ M bei 37°C

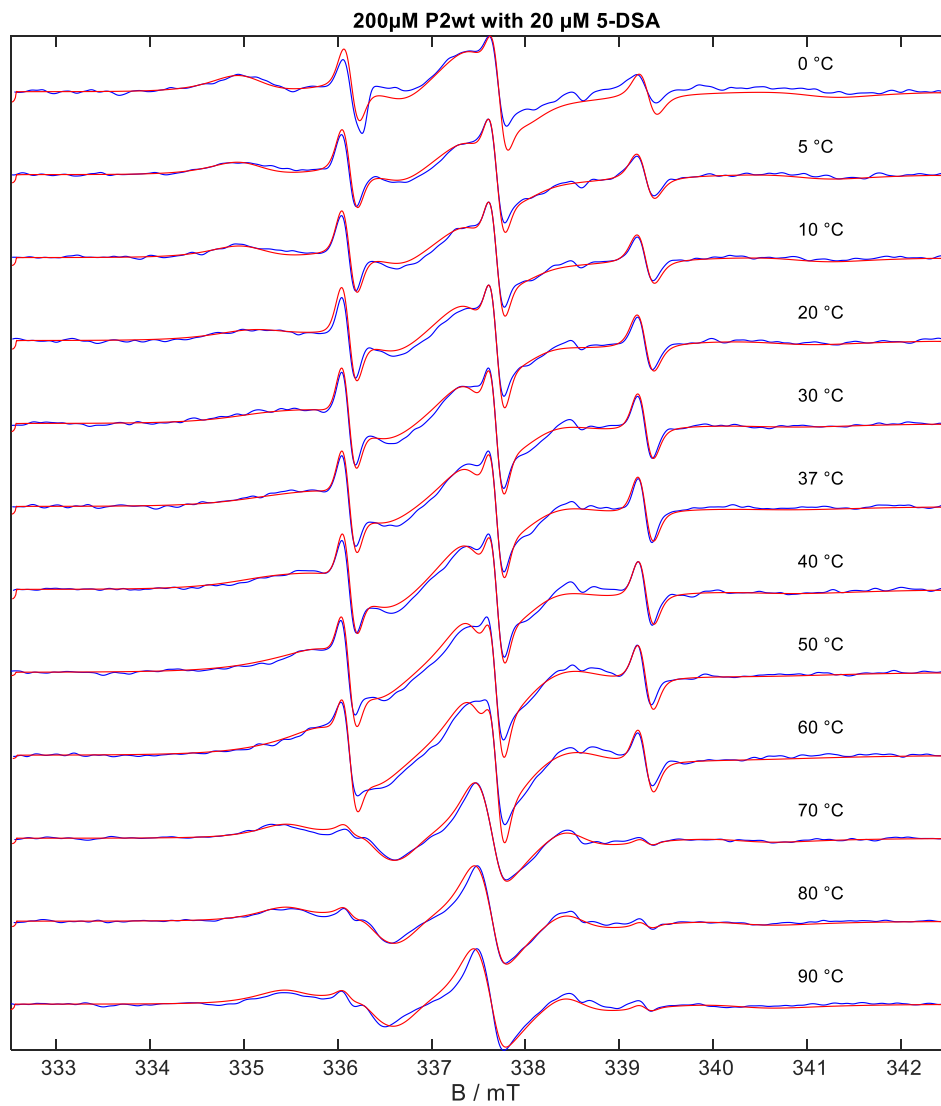


Abbildung 66 Darstellung der Temperaturreihe von 200 μ M P2wt mit 20 μ M 5-DSA, X-Band-cwEPR-Messungen (magenta), Simulationen der cwEPR-Messung (blau)

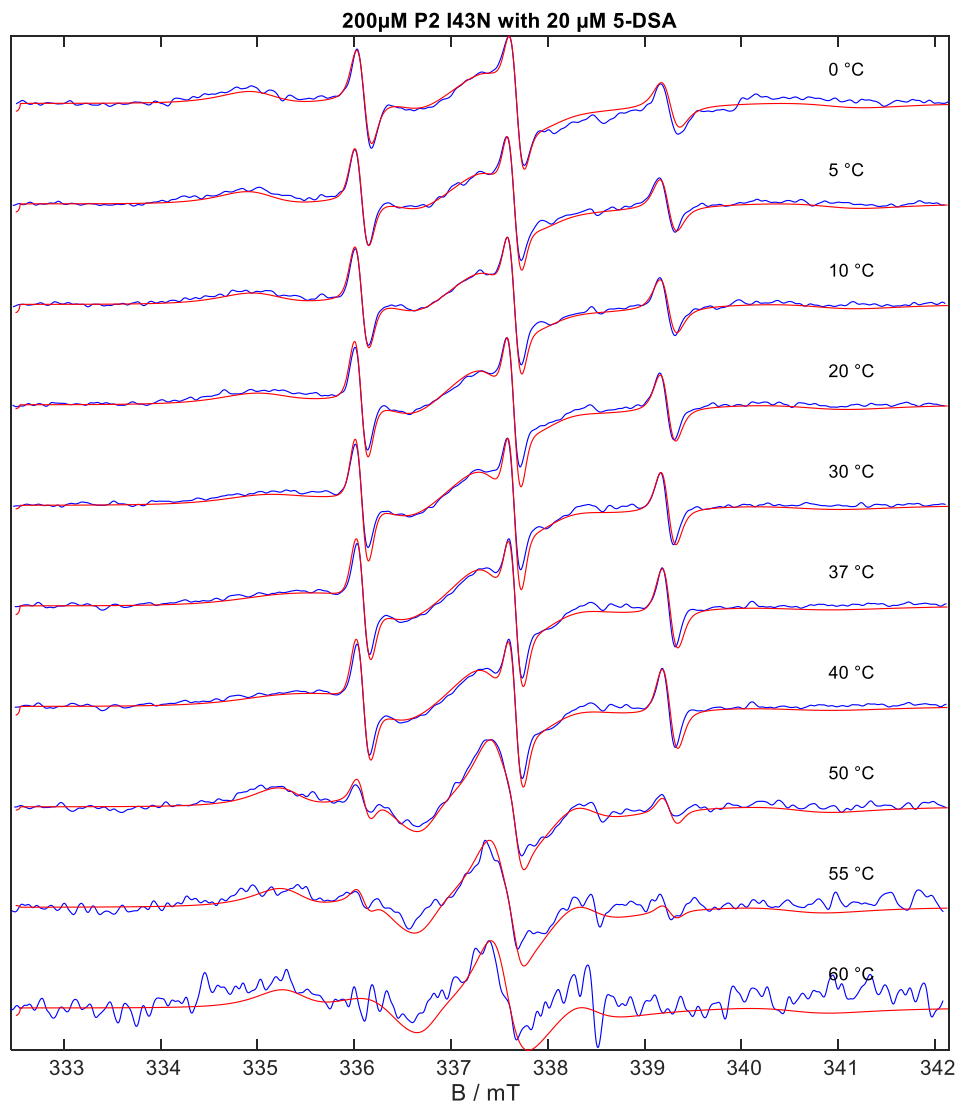


Abbildung 67 Darstellung der Temperaturreihe von 200 μ M P2 I43N mit 20 μ M 5-DSA, X-Band cwEPR-Messungen (magenta), Simulationen der cwEPR-Messung (blau)

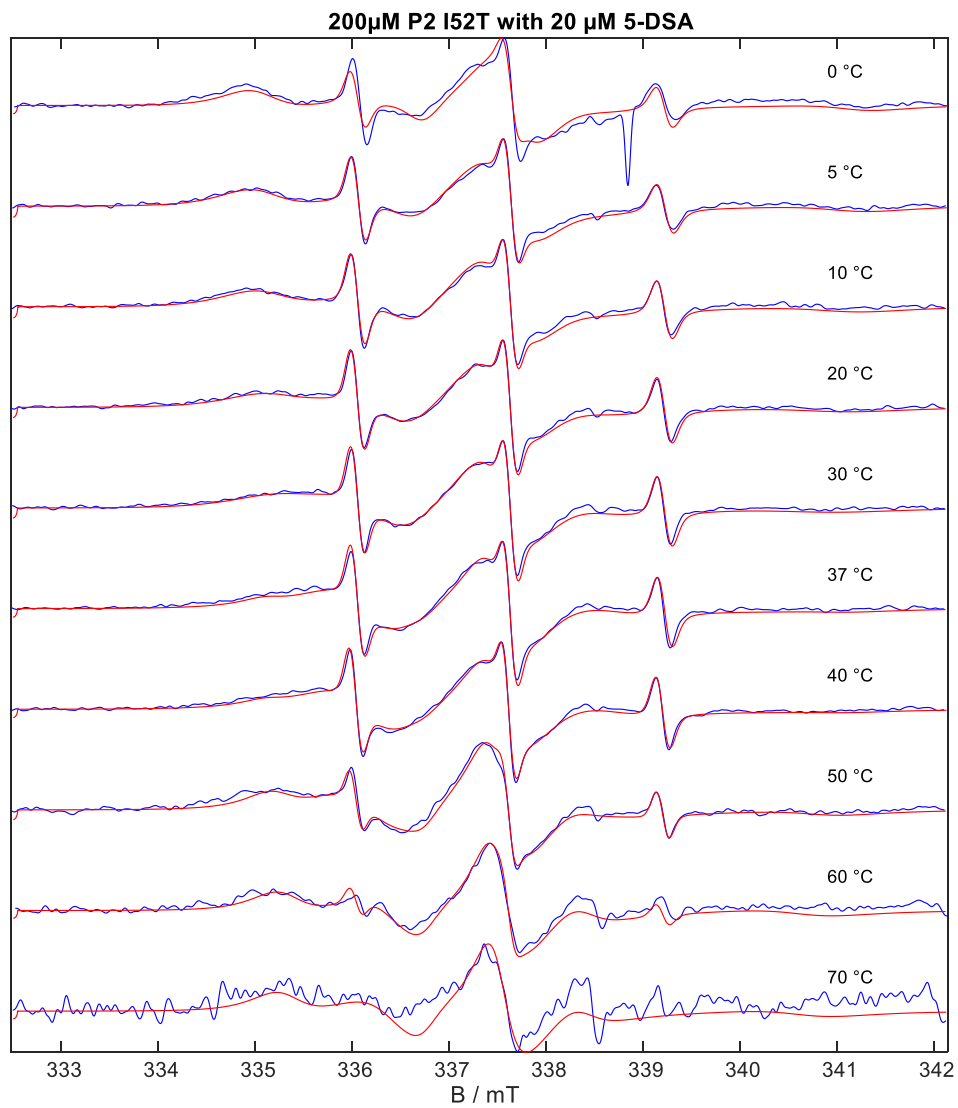


Abbildung 68 Darstellung der Temperaturreihe von 200 μ M P2 I52T mit 20 μ M 5-DSA, X-Band cwEPR-Messungen (magenta), Simulationen der cwEPR-Messung (blau)

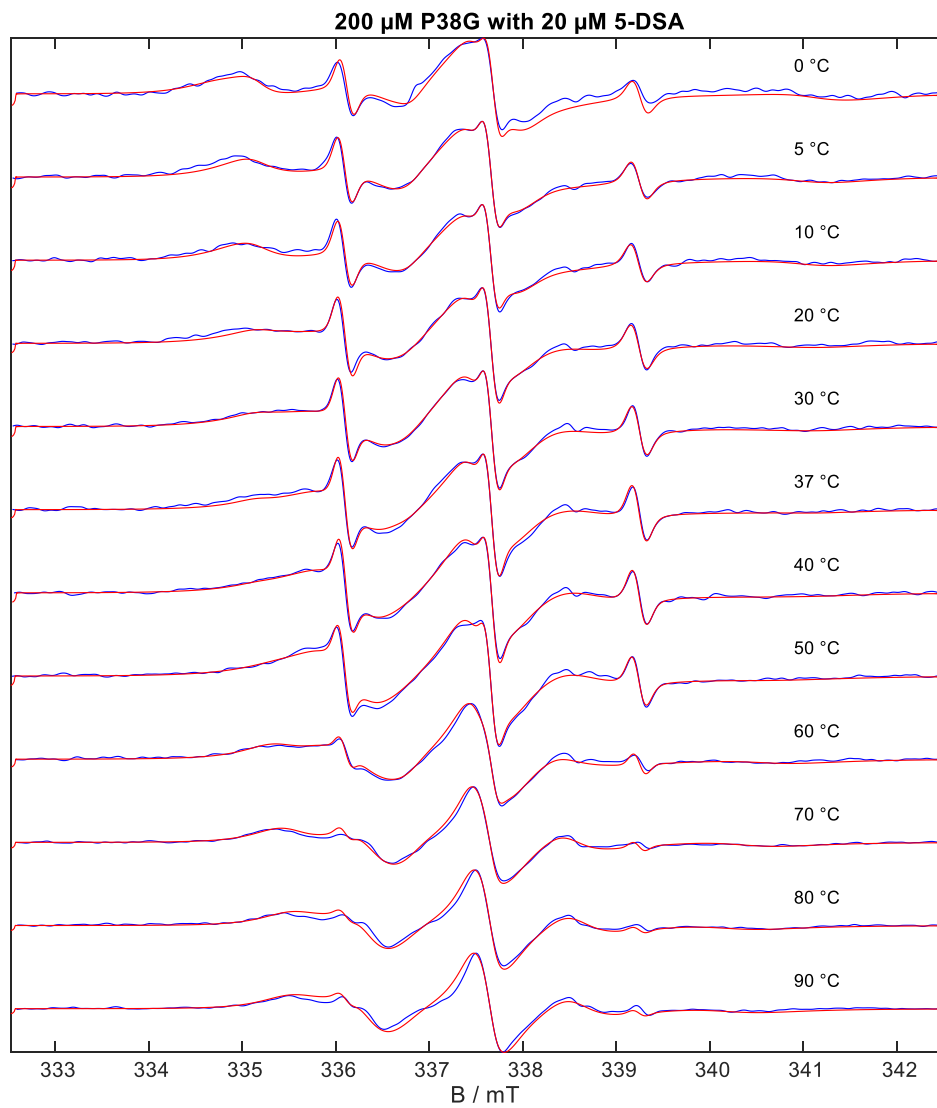


Abbildung 69 Darstellung der Temperaturreihe von 200 μ M P2 P38G mit 20 μ M 5-DSA, X-Band cwEPR-Messungen (magenta), Simulationen der cwEPR-Messung (blau)

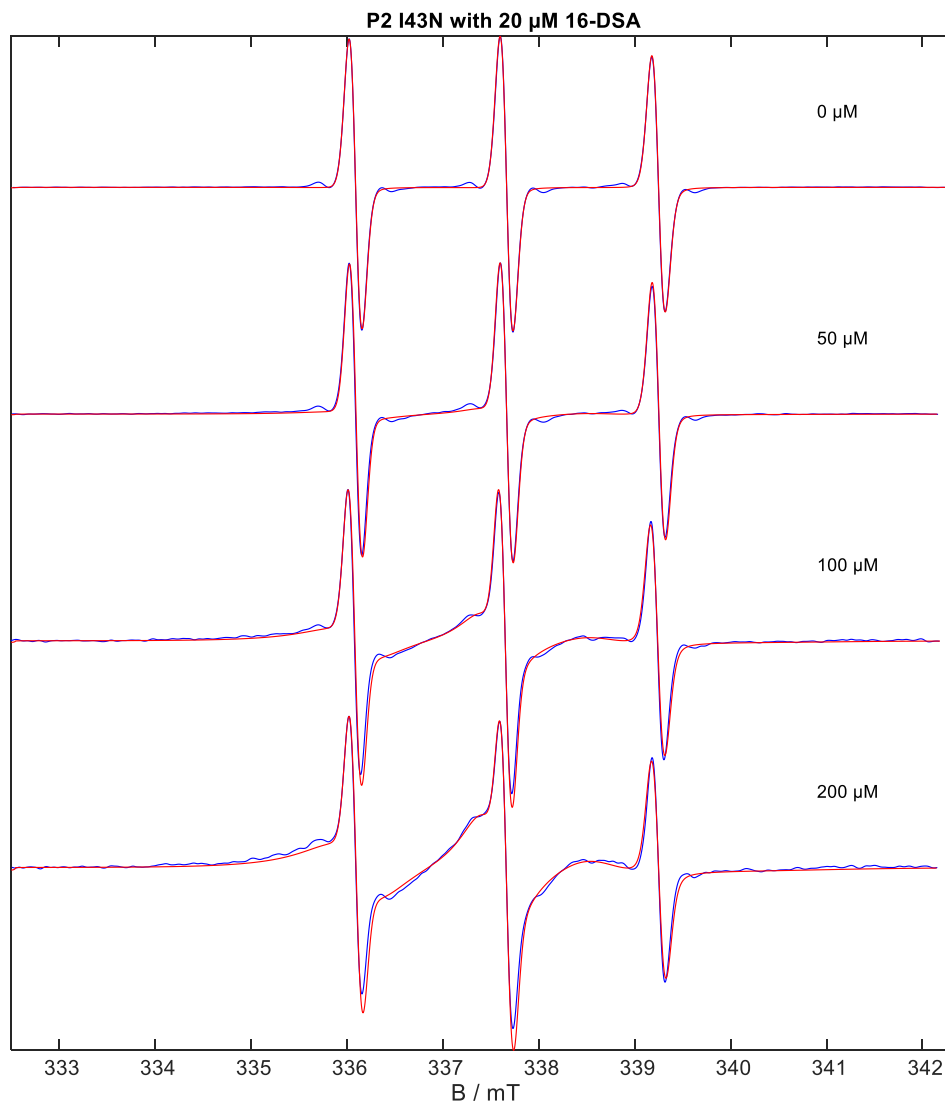


Abbildung 70 Darstellung der cwEPR-Messung (mangenta) und die dazugehörigen simulierten cwEPR-Spektren (blau) für 16-DSA bei 20 μM mit steigender Konzentration des P2 I43 von 0 μM bis 200 μM bei 37°C

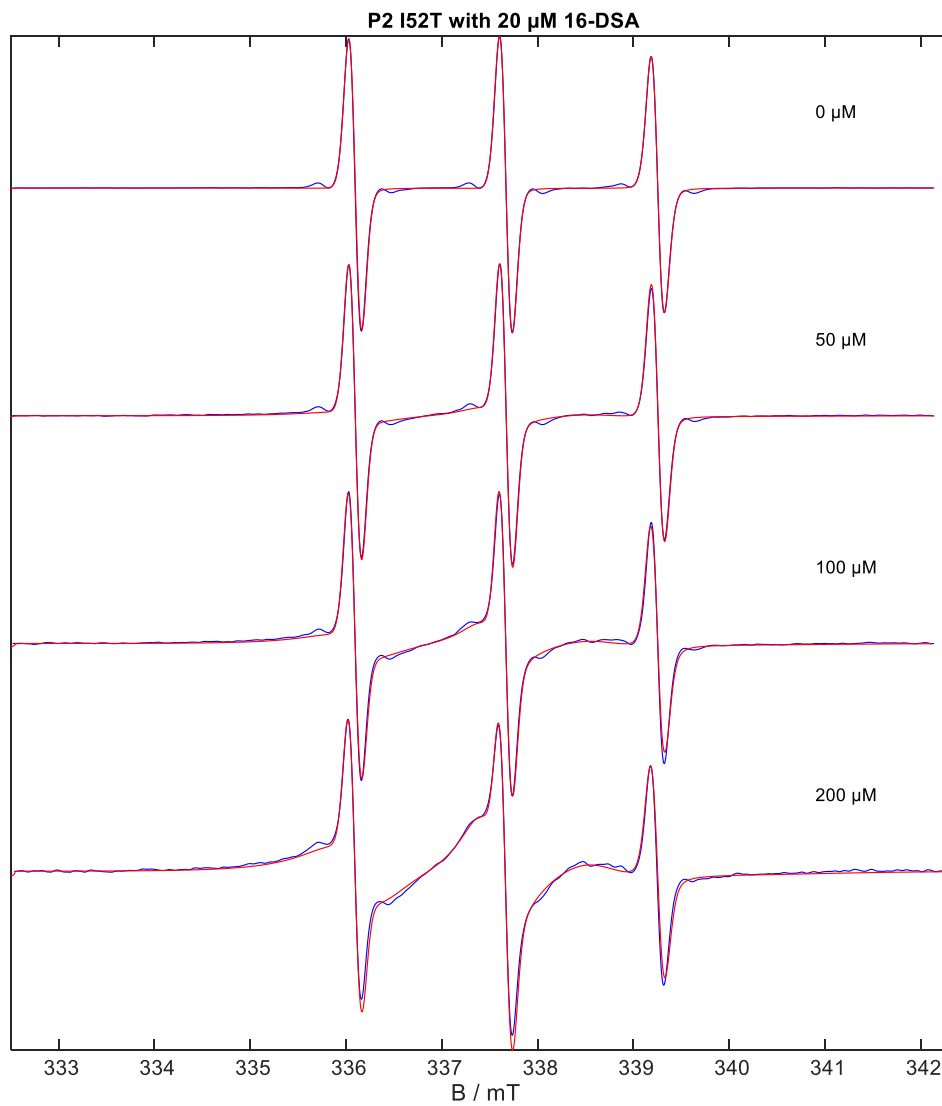


Abbildung 71 Darstellung der cwEPR-Messung (mangenta) und die dazugehörigen simulierten cwEPR-Spektren (blau) für 5-DSA bei 20 μM mit steigender Konzentration des P2 I52T von 0 μM bis 200 μM bei 37°C

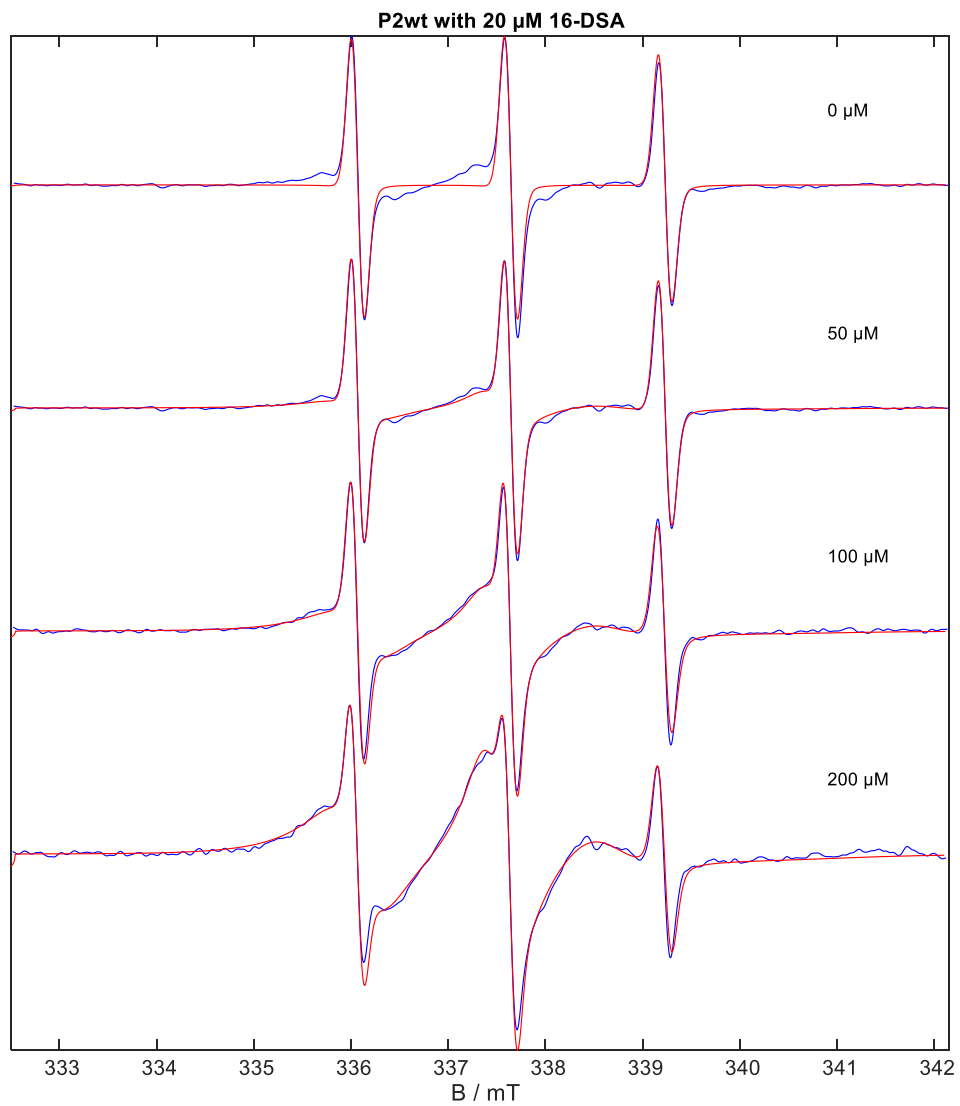


Abbildung 72 Darstellung der cwEPR-Messung (mangenta) und die dazugehörigen simulierten cwEPR-Spektren (blau) für 5-DSA bei 20 μM mit steigender Konzentration des P2 Wildtyp von 0 μM bis 200 μM bei 37°C

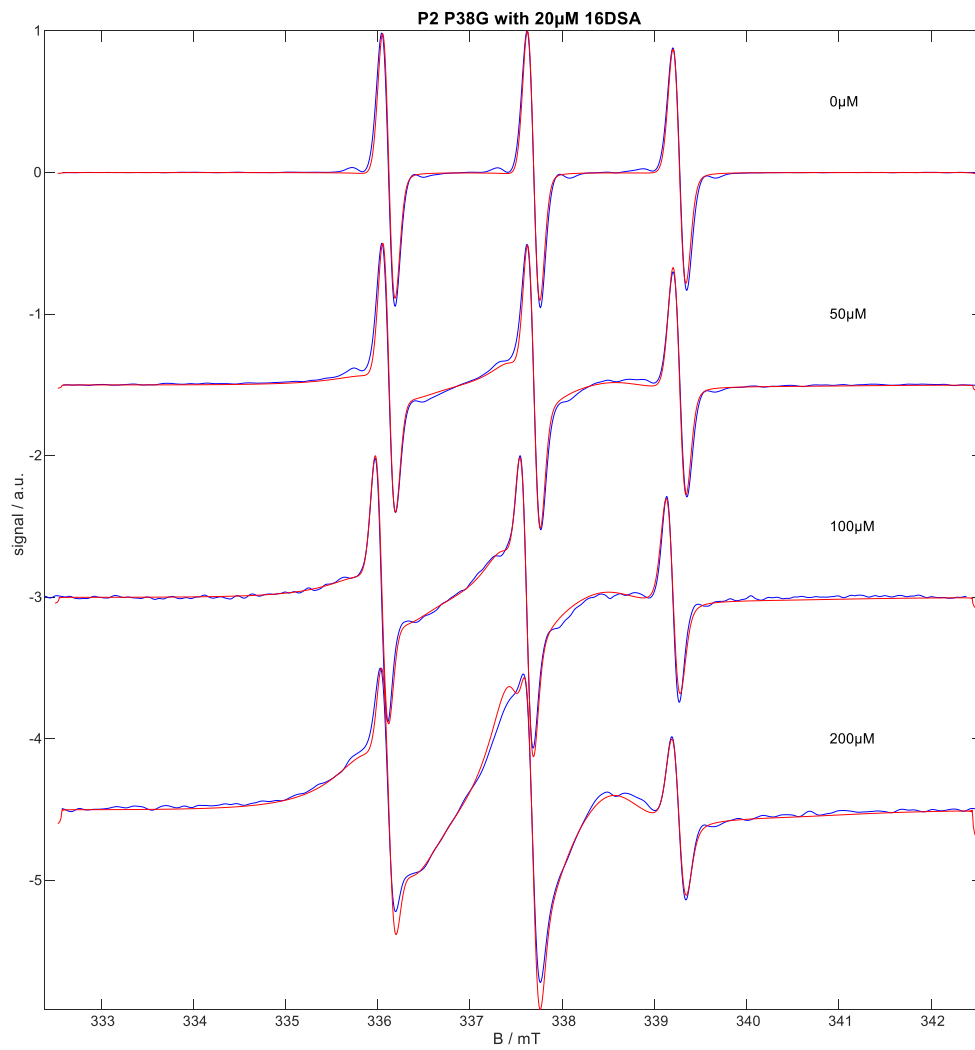


Abbildung 73 Darstellung der cwEPR-Messung (mangenta) und die dazugehörigen simulierten cwEPR-Spektren (blau) für 5-DSA bei 20 μM mit steigender Konzentration des P2 P38G von 0 μM bis 200 μM bei 37°C

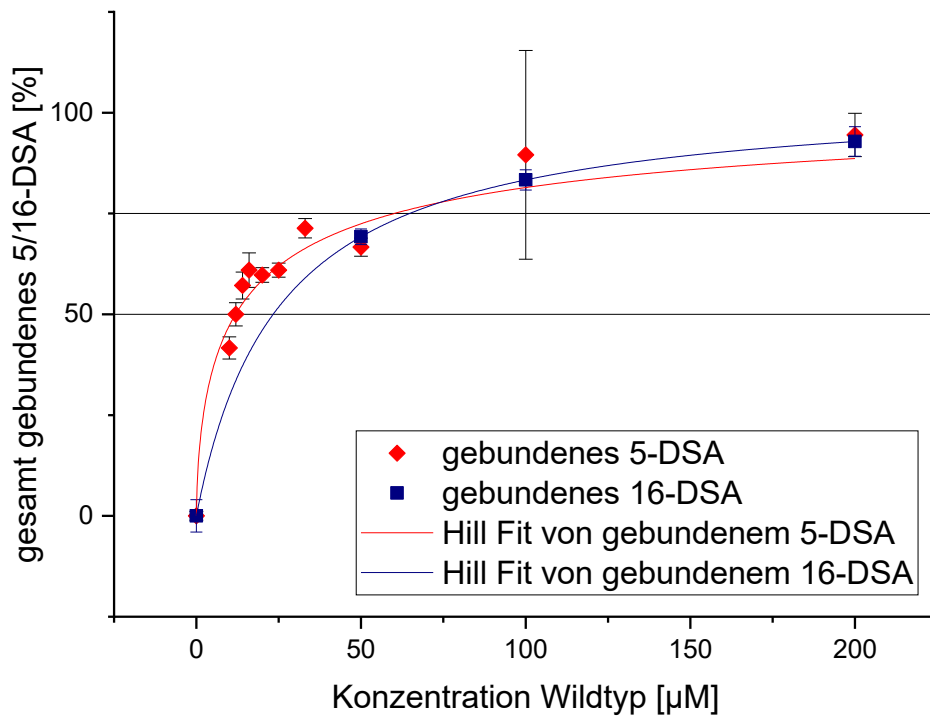


Abbildung 74 Hill Fit und Darstellung gesamt gebunden 5/16-DSA in Prozent (aus cwEPR X-Band Simulationen, Messungen bei 37°C) aufgetragen gegen die steigende Konzentration von P2 Wildtyp;

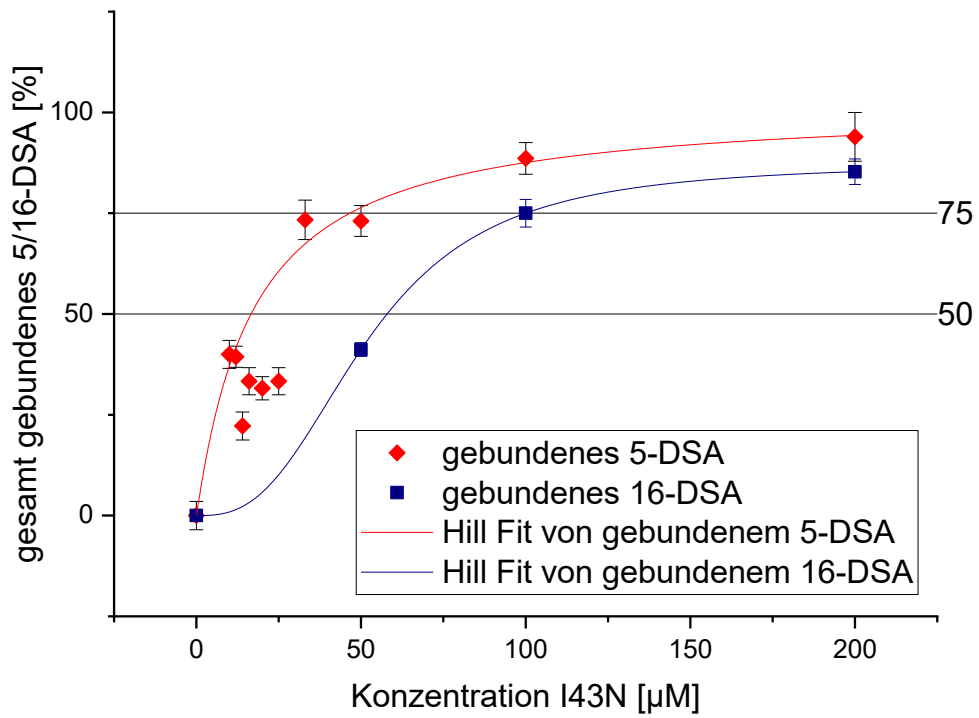


Abbildung 75 Hill Fit und Darstellung gesamt gebundenen 5/16-DSA in Prozent (aus cwEPR X-Band Simulationen, Messungen bei 37°C) aufgetragen gegen die steigende Konzentration von P2 I43N;

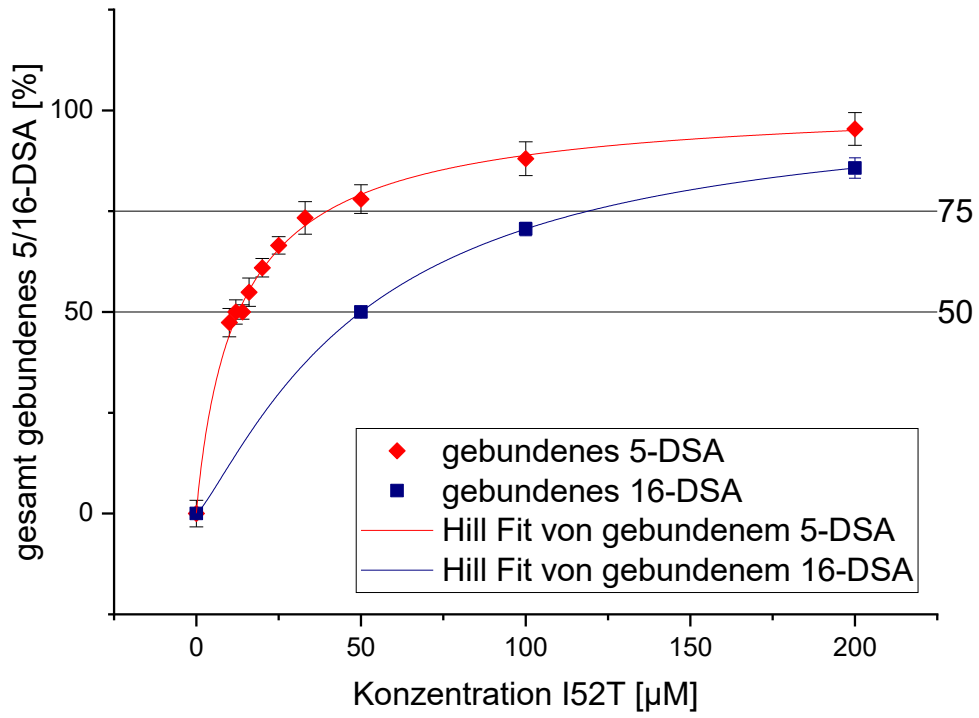


Abbildung 76 Hill Fit und Darstellung gesamt gebundenen 5/16-DSA in Prozent (aus cwEPR X-Band Simulationen, Messungen bei 37°C) aufgetragen gegen die steigende Konzentration von P2 I52T;

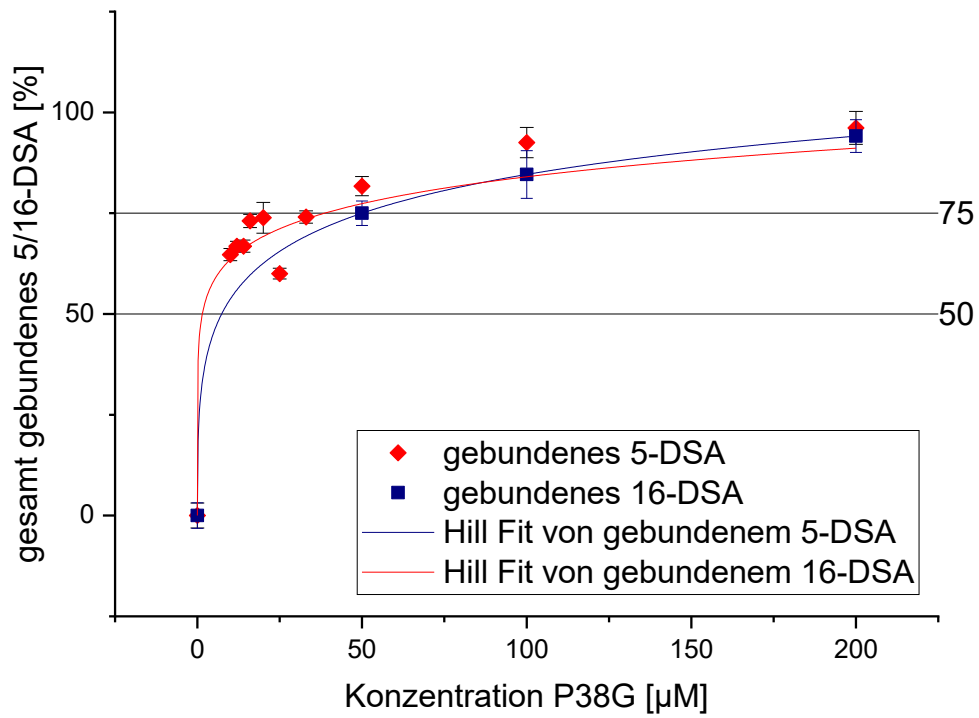


Abbildung 77 Hill Fit und Darstellung gesamt gebunden 5/16-DSA in Prozent (aus cwEPR X-Band Simulationen, Messungen bei 37°C) aufgetragen gegen die steigende Konzentration von P2 P38G;

8.1.2. Filmwaage

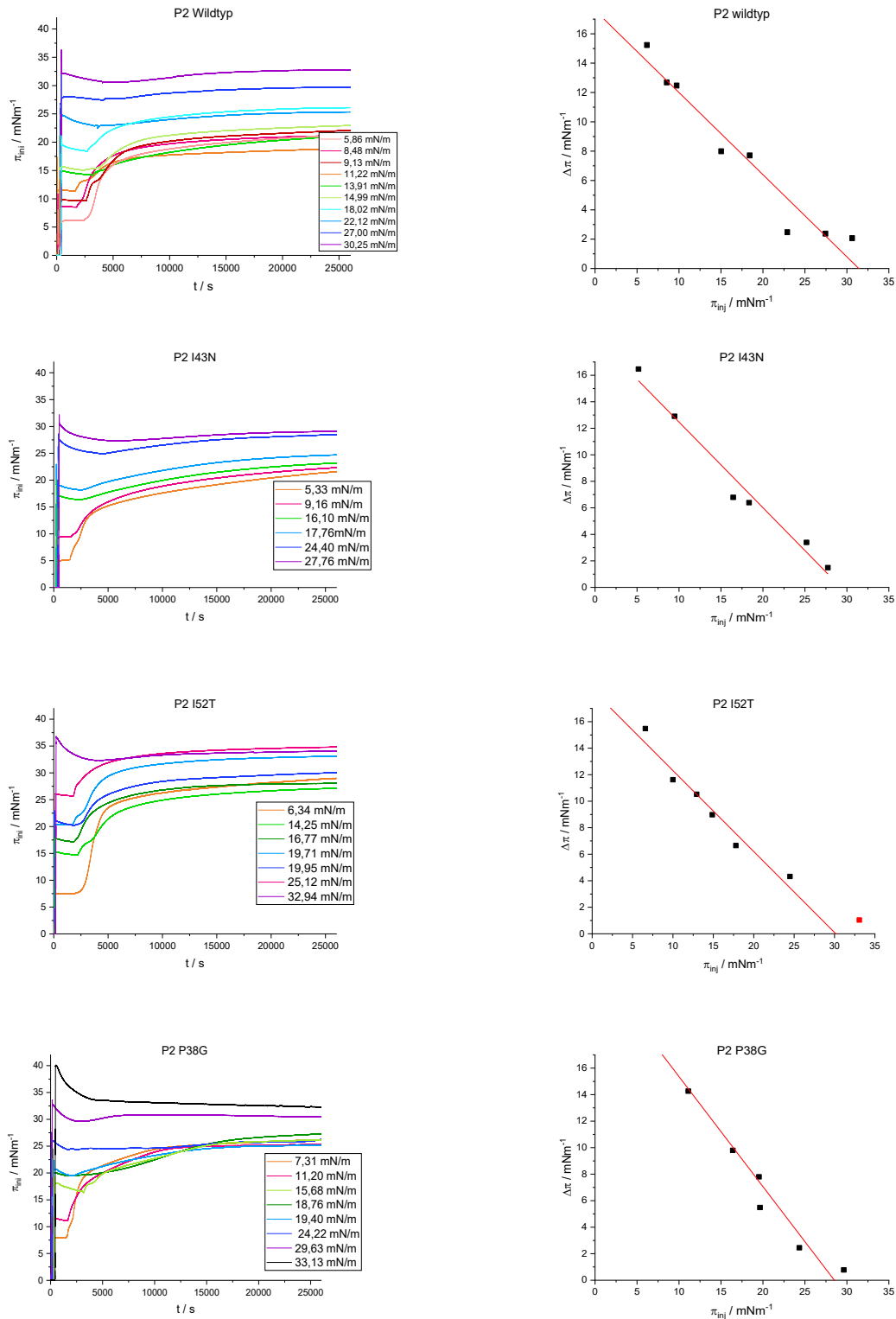


Abbildung 78 Links: Oberflächendruckmessungen an einer Langmuir-Filmbalance mit konstanter Oberfläche nach Injektion von P2-Varianten unter einer PNS-Myelin-ähnlichen Lipid-Monolayer mit variablen Anfangsoberflächendrücken (π_{inj}). Rechts: Darstellung des anfänglichen Oberflächendrucks gegen den Oberflächendruck nach der Äquilibration und lineare

Regression (rote Linie); von oben nach unten: P2 Wildtyp; P2 I43N; P2 I52T; P2 P38G

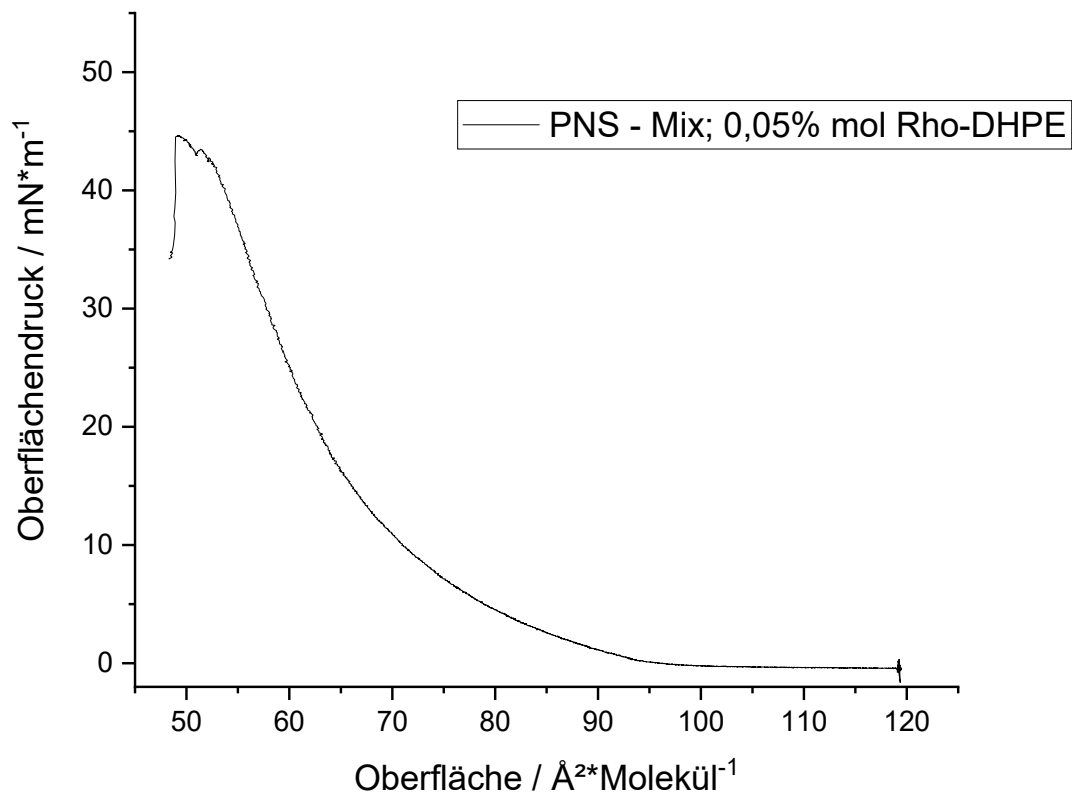


Abbildung 79 Druck-Flächen-Isotherme epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Abbildung 30 zum Kompressionsverhaltens der PNS-Monoschicht versetzt mit 0,05mol% Rho-B-DHPE auf einer HEPES-NaCl-Puffer-Subphase

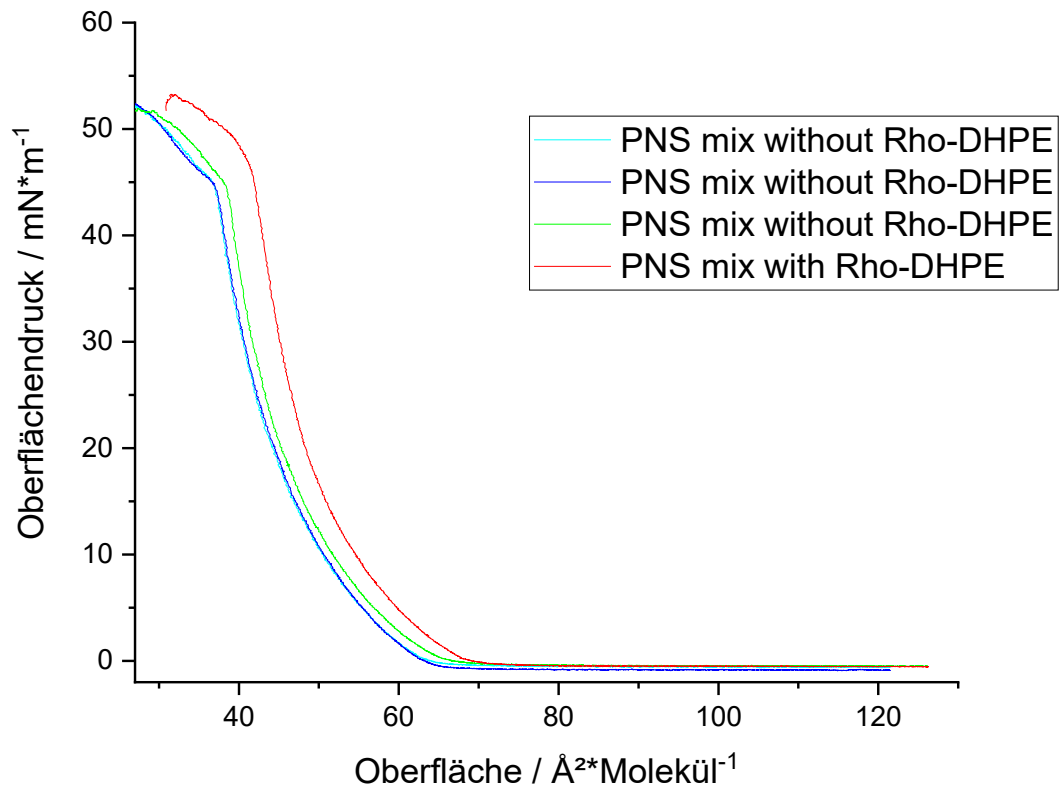


Abbildung 80 Vergleich der Isothermen des Kompressionsverhaltens der PNS-Monoschicht mit und ohne Zugabe von 0,05mol% Rho-B-DHPE auf einer HEPES-NaCl-Puffer-Subphase

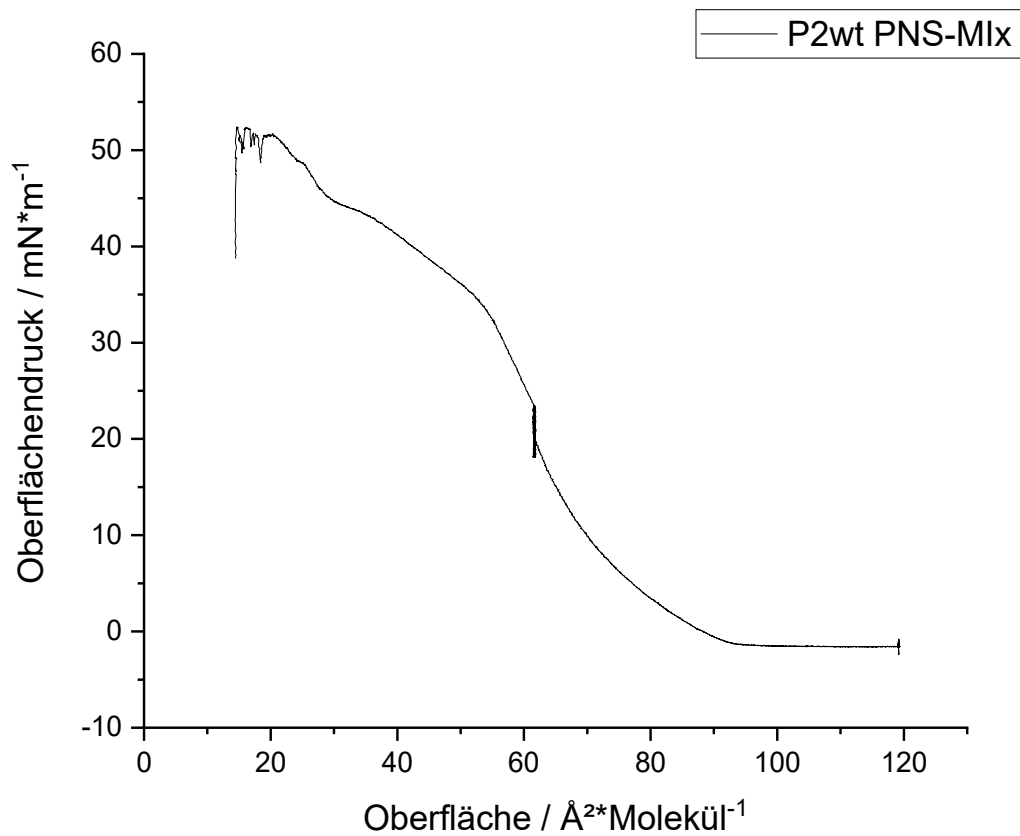


Abbildung 81 Druck-Flächen-Isotherme epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Abbildung 31 zum Kompressionsverhalten der PNS-Monoschicht versetzt mit 0,05mol% Rho-B-DHPE und P2 Wildtyp Proteininjektion bei 20 mN/m auf einer HEPES-NaCl-Puffer-Subphase; Kompression des Filmes bis 20 mN/m , dann Proteininjektion und Inkubation; erneuter Start der Kompression bei 26 mN/m bis zum Kollaps des Filmes. Druckdifferenz zwischen 20 mN/m bis 26 mN/m durch Proteinadsorption an Monoschicht.

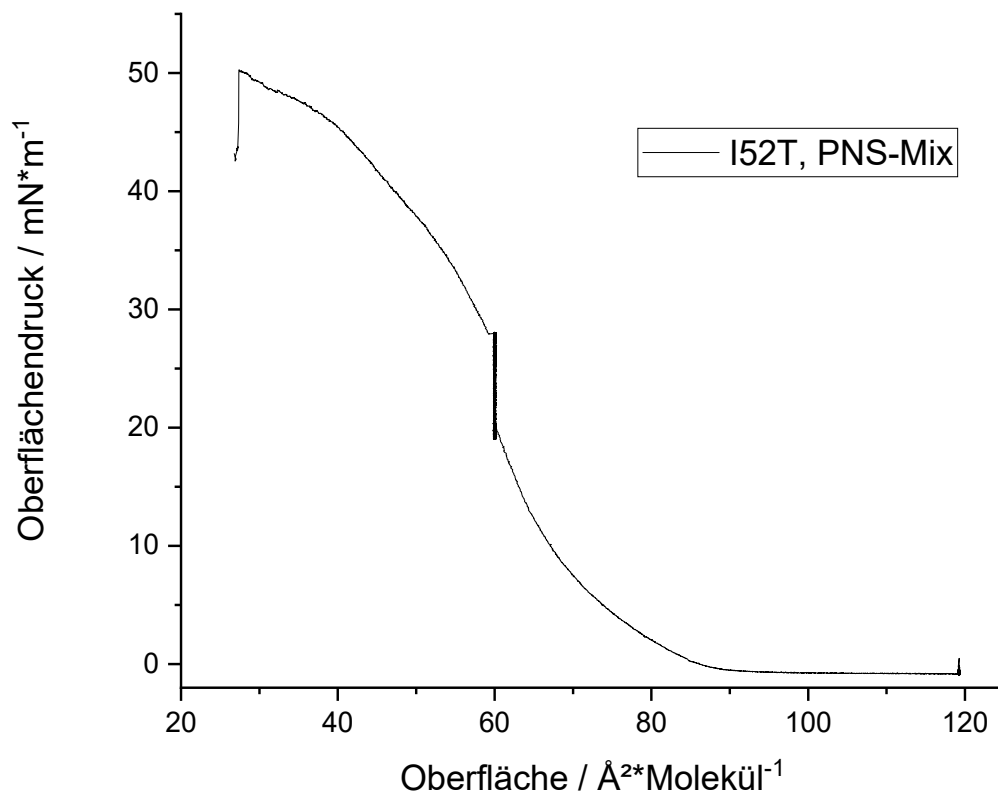


Abbildung 82 Druck-Flächen-Isotherme epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Abbildung 34 zum Kompressionsverhaltens der PNS-Monoschicht versetzt mit 0,05mol% Rho-B-DHPE und P2 I52T Proteininjektion bei 20 mN/m auf einer HEPES-NaCl-Puffer-Subphase; Kompression des Filmes bis 20 mN/m , dann Proteininjektion und Inkubation; erneuter Start der Kompression bei 29 mN/m bis zum Kollaps des Filmes. Druckdifferenz zwischen 20 mN/m bis 29 mN/m durch Proteinadsorption an Monoschicht.

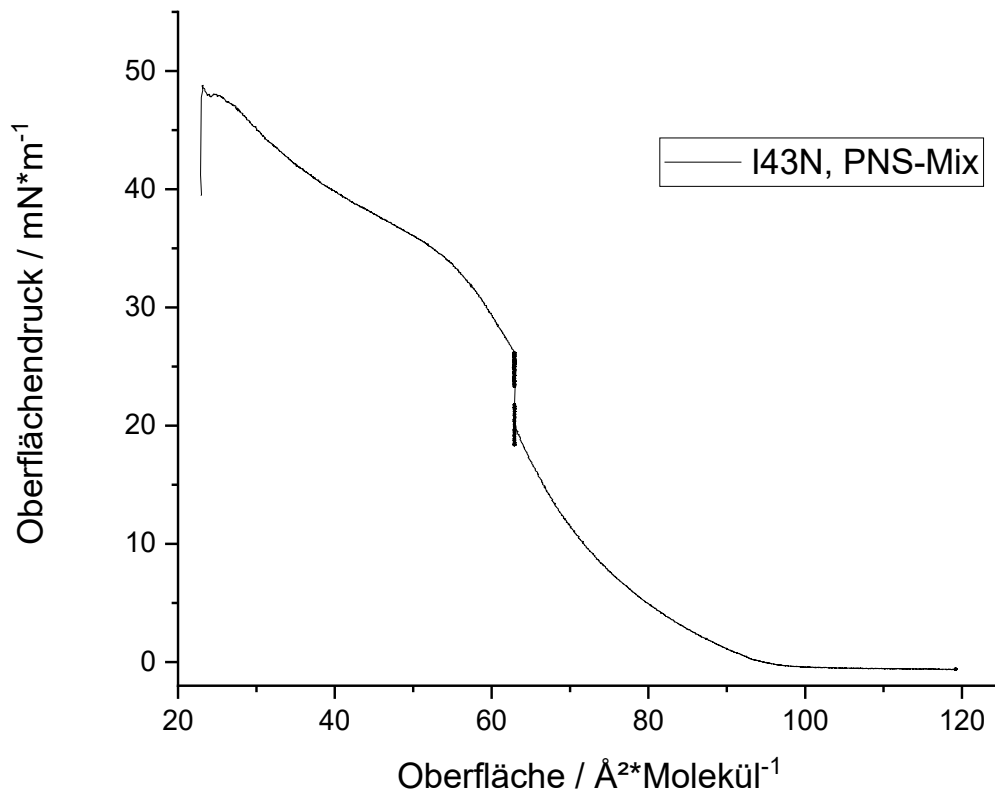


Abbildung 83 Druck-Flächen-Isotherme epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Abbildung 33 zum Kompressionsverhalten der PNS-Monoschicht versetzt mit 0,05mol% Rho-B-DHPE und P2 I43N Proteininjektion bei 20 mN/m auf einer HEPES-NaCl-Puffer-Subphase; Kompression des Filmes bis 20 mN/m , dann Proteininjektion und Inkubation; erneuter Start der Kompression bei 27 mN/m bis zum Kollaps des Filmes. Druckdifferenz zwischen 20 mN/m bis 27 mN/m durch Proteinadsorption an Monoschicht.

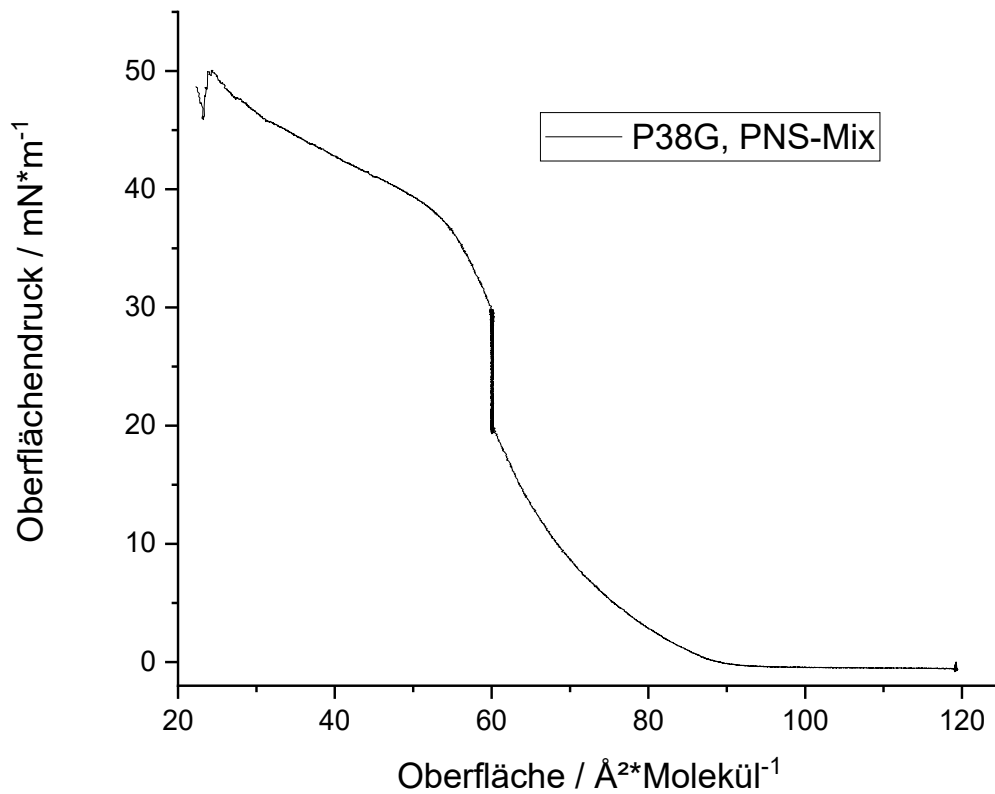


Abbildung 84 Druck-Flächen-Isotherme epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Abbildung 32 zum Kompressionsverhalten der PNS-Monoschicht versetzt mit 0,05mol% Rho-B-DHPE und P2 P38G Proteininjektion bei 20 mN/m auf einer HEPES-NaCl-Puffer-Subphase; Kompression des Filmes bis 20 mN/m , dann Proteininjektion und Inkubation; erneuter Start der Kompression bei 30 mN/m bis zum Kollaps des Filmes. Druckdifferenz zwischen 20 mN/m bis 30 mN/m durch Proteinadsorption an Monoschicht.

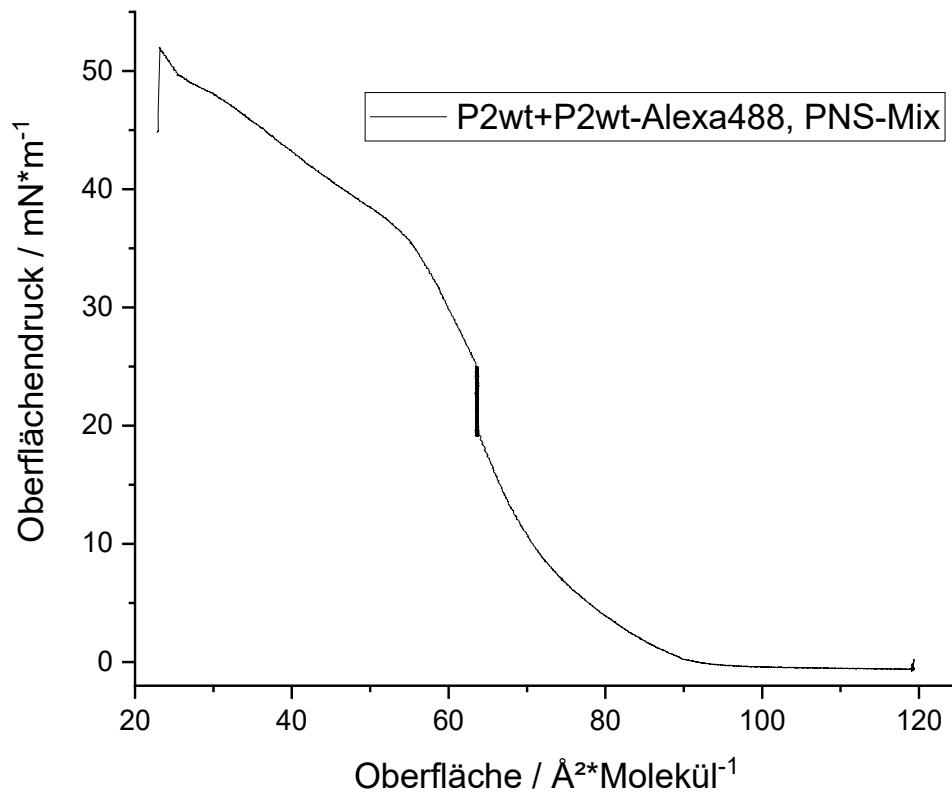


Abbildung 85 Druck-Flächen-Isotherme epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Abbildung 35 zum Kompressionsverhalten der PNS-Monoschicht versetzt mit 0,05mol% Rho-B-DHPE und P2 Wildtyp + P2 Wildtyp Alexa 488 Konjugat Proteininjektion bei 20 mN/m auf einer HEPES-NaCl-Puffer-Subphase; Kompression des Filmes bis 20 mN/m , dann Proteininjektion und Inkubation; erneuter Start der Kompression bei 26 mN/m bis zum Kollaps des Filmes. Druckdifferenz zwischen 20 mN/m bis 26 mN/m durch Proteinadsorption an Monoschicht.

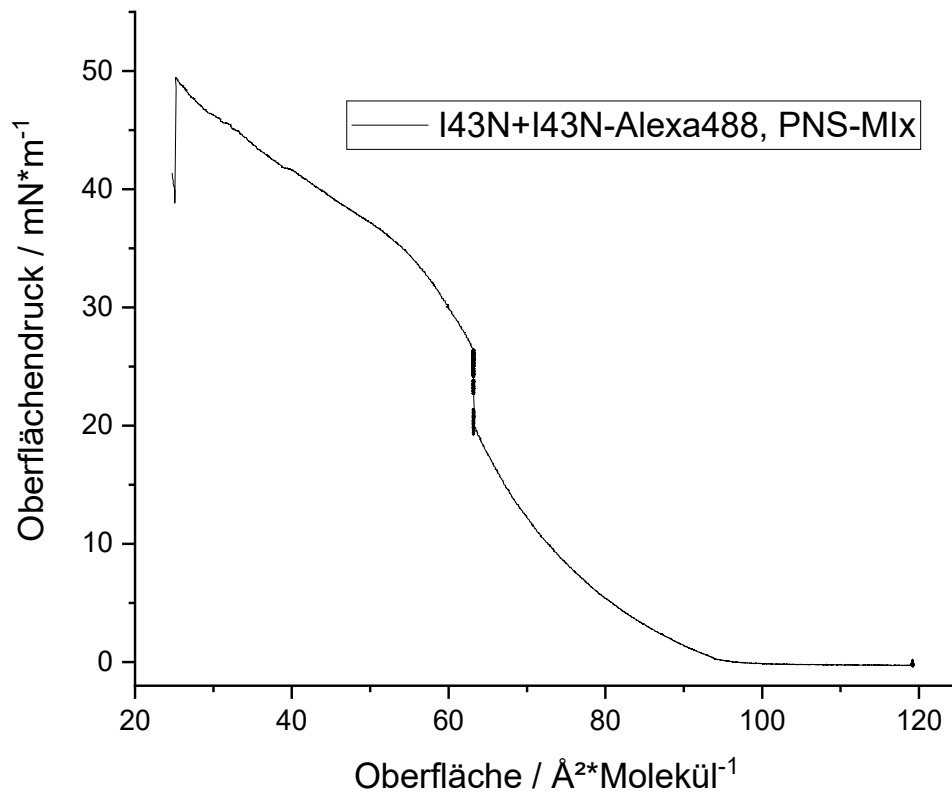


Abbildung 86 Druck-Flächen-Isotherme epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Abbildung 35 zum Kompressionsverhalten der PNS-Monoschicht versetzt mit 0,05mol% Rho-B-DHPE und P2 I43N + P2 I43N Alexa 488 Konjugat Proteininjektion bei 20 mN/m auf einer HEPES-NaCl-Puffer-Subphase; Kompression des Filmes bis 20 mN/m , dann Proteininjektion und Inkubation; erneuter Start der Kompression bei 26 mN/m bis zum Kollaps des Filmes. Druckdifferenz

zwischen 20 mN/m bis 26 mN/m durch Proteinadsorption an Monoschicht.

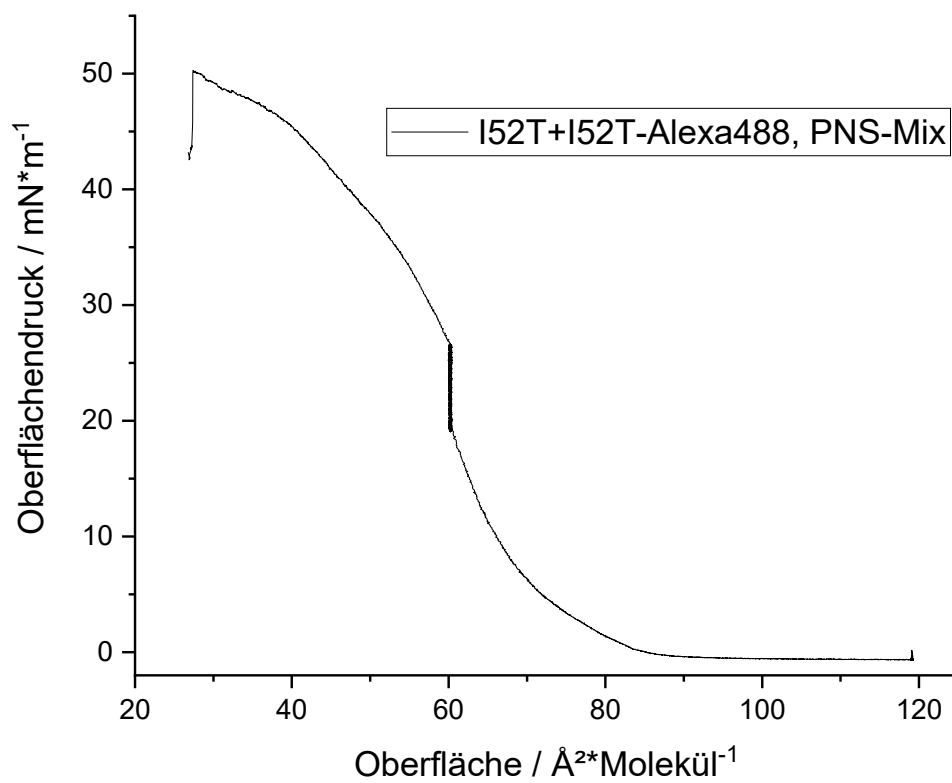


Abbildung 87 Druck-Flächen-Isotherme epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Abbildung 35 zum Kompressionsverhaltens der PNS-Monoschicht versetzt mit 0,05mol% Rho-B-DHPE und P2 I52T + P2 I52T Alexa 488 Konjugat Proteininjektion bei 20 mN/m auf einer HEPES-NaCl-Puffer-Subphase; Kompression des Filmes bis 20 mN/m, dann Proteininjektion und Inkubation; erneuter Start der Kompression bei 26 mN/m bis zum Kollaps des Filmes. Druckdifferenz

zwischen 20 mN/m bis 26 mN/m durch Proteinadsorption an Monoschicht.

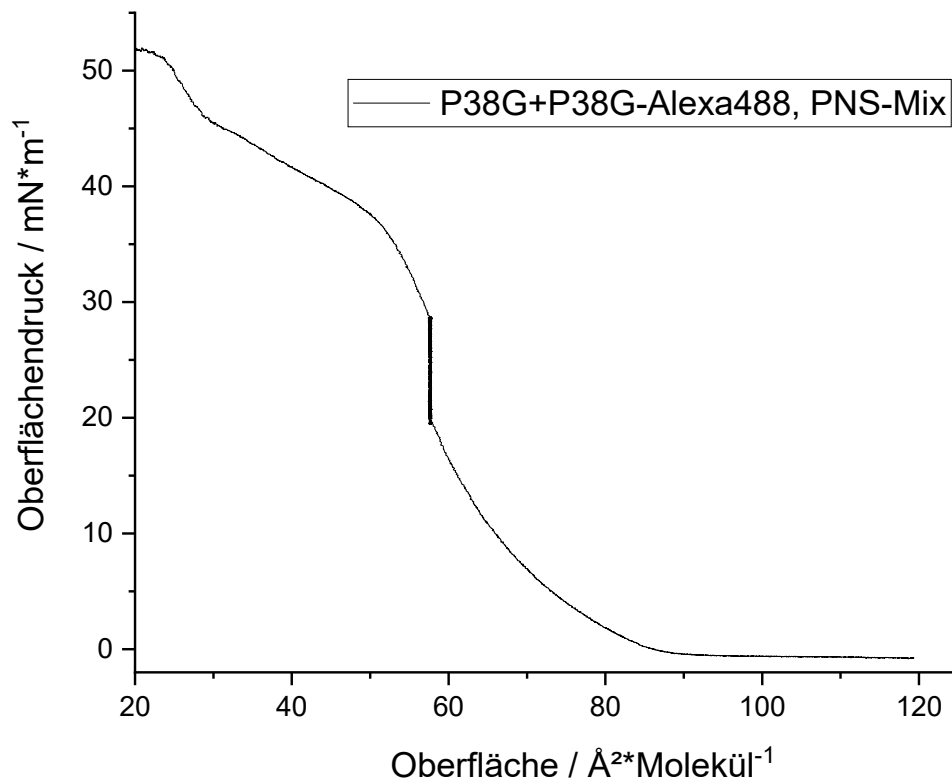


Abbildung 88 Druck-Flächen-Isotherme epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Abbildung 35 zum Kompressionsverhalten der PNS-Monolage versetzt mit 0,05 mol% Rho-B-DHPE und P2 P38G + P2 P38G Alexa 488 Konjugat Proteininjektion bei 20 mN/m auf einer HEPES-NaCl-Puffer-Subphase; Kompression des Filmes bis 20 mN/m, dann Proteininjektion und Inkubation; erneuter Start der Kompression bei 28 mN/m bis zum Kollaps des Filmes. Druckdifferenz zwischen 20 mN/m bis 28 mN/m durch Proteinadsorption an Monolage.

8.2. RyR Sonden Synthese und Analyse

8.2.1. Synthese und Syntheseanalytik

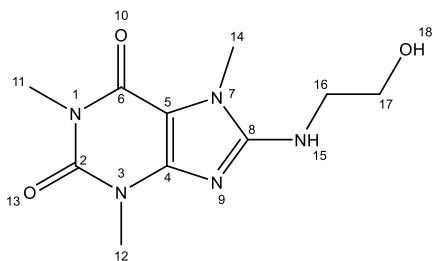
RYR-1	8-((2-hydroxyethyl)amino)-1,3,7-trimethyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione
-------	---

IUPAC: 8-((2-hydroxyethyl)amino)-1,3,7-trimethyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione

CAS-Nr.: 6320-10-1

Summenformel: $C_{10}H_{15}N_5O_3$

Molekulargewicht: 253,26 g/mol



Für die Reaktion werden 237,09 mg 8-Bromcoffein und 0,3 ml 2-Aminoethan-1-ol im Lösungsmittel gelöst und mehrere Stunden unter Rückfluss gekocht, der Reaktionsfortschritt wird über DC überprüft. Anschließend wird die Reaktionsmischung im Rotationsverdampfer getrocknet und der erhaltene Feststoff mit Ethanol aufgeköcht. Nicht umgesetztes 8-Bromcoffein kann durch Filtration abgetrennt werden. Die Ethanolösung wird erneut getrocknet. Das Produkt wird durch Säulenchromatographie aufgereinigt. Als Laufmittel dient hierbei ein Ethylacetat/Ethanol-Gradient. Das Produkt ist ein weißer Feststoff.

Bei Durchführung ohne zusätzliches Lösungsmittel werden 2,5 ml 2-Aminoethan-1-ol verwendet. Die Mischung wird 1-2 Stunden bei 130- 140 °C gerührt. Der Reaktionsfortschritt wird mithilfe der DC überprüft. Die heiße Lösung wird mit Ethanol aufgeköcht, heiß filtriert und dann gekühlt. Das Produkt fällt als weißer Feststoff aus. Dieser wird durch Filtration abgetrennt und mit kaltem Ethanol gewaschen. Als Lösungsmittel können verwendet werden: DMF, DMSO, Ethanol (15 bar), Toluol.

¹H-NMR: (500 MHz, CD₃OD) δ = 4,83 (s, 1 H, HDO), 3,73 (tr, 2 H, -C(17)H₂), 3,63 (s, 3 H, -C(14)H₃), 3,56 (tr, 2 H, -C(16)H₂), 3,48 (s, 3 H, -C(12)H₃), 3,31 (m, CH₃-OH + -C(11)H₃) ppm;

IR: $\tilde{\nu}_{max}$ = 3482 (-O-H, m), 3368 (-N-H, s), 3260 (-O-H, br), 2932 (-C-H, sw), 1689 (-C=O, m), 1650 (-C=O, m), 1612 (-C=C, s), 1579, 1537 (-C=N, m), 1481, 1380, 1354 (-CH₃ und -CH₂, m);

Schmelzpunkt: 236 °C;

MS: m/z 252,20 (100 %) [M⁻-H], 253,20 (12 %) [M⁻]; 528,93 (100 %) [2M⁺], 254,21 (45 %) [M⁺], 276,02 (33 %) [M⁺ + Na⁺]; **R_f** (Ethylacetat/Methanol/25 % NH₃, 18: 4: 3): 0,51

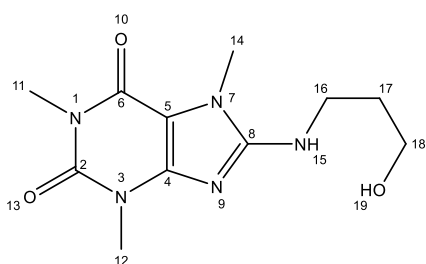
RYR-2	8-((3-hydroxypropyl)amino)-1,3,7-trimethyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione
--------------	--

IUPAC: 8-((3-hydroxypropyl)amino)-1,3,7-trimethyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione

CAS: 95073-80-6

Summenformel: C₁₁H₁₇N₅O₃

Molekulargewicht: 267,288 g/mol



500 mg 8-Bromcoffein werden mit 5 ml 3-Aminopropan-1-ol 2 Stunden bei 140 – 150 °C gekocht. Der Reaktionsfortschritt wird mithilfe der DC überprüft. Die Reaktionsmischung wird mit wenig Ethanol aufgekocht, heiß filtriert und dann langsam abgekühlt. Das Produkt kristallisiert aus und wird durch Filtration abgetrennt und mit kaltem Ethanol gewaschen.

¹H-NMR: (400 MHz, CD₃OD) δ = 4,82 (HDO), 3,65 (tr, 2 H, -C(18)H₂), 3,61 (s, 3 H, -C(14)H₃), 3,53 (tr, 2H, -C(16)H₂), 3,47 (s, 3 H, -C(12)H₃), 3,31 (m, CH₃-OH + -C(11)H₃), 1,85 (qu, 2 H, -C(17)H₂),

IR: $\tilde{\nu}_{max}$ = 3516, 3479 (-O-H, w), 3354 (-N-H, s), 2956 (-C-H, w), 1695 (-C=O, w), 1650 (-C=O, w), 1611 (-C=C, s), 1574, 1540 (-C=N, m), 1480, 1379, 1348 (-CH₃ und -CH₂, m);

Schmelzpunkt: 221 °C;

MS: m/z 266,03 (100%) [M⁻ -H], 267,24 (15%) [M⁻], 557,01 (100%) [2M⁺ + Na⁺], 290,09 (30%) [M⁺ + Na⁺], 268,24 (35%) [M⁺]; R_f (Ethylacetat/Methanol/25% NH₃, 18: 4: 3): 0,52

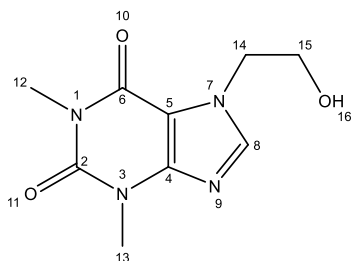
RYR-3	7-(2-hydroxyethyl)-1,3-dimethyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione
--------------	---

IUPAC: 7-(2-hydroxyethyl)-1,3-dimethyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione

CAS: 519-37-9

Summenformel: C₉H₁₄N₄O₃

Molekulargewicht: 224,22 g/mol



1 g Theophyllin mit 1 ml Triethylamin in 20 ml DMF lösen, 0,6 ml 2-Bromethanol dazugeben. Lösung 2 Stunden bei 95 – 100 °C rühren. Abkühlen lassen, bei Bedarf leicht einengen. Nicht umgesetztes Theophyllin kann durch Filtration abgetrennt werden. Das Filtrat wird erneut eingengt und durch Säulenchromatographie aufgereinigt. Als Laufmittel dient hierbei ein Ethylacetat: Methanol: 25 % NH₃ Gemisch mit einem Verhältnis von 18:4:3. Das Produkt ist ein weißer Feststoff.

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ = 8,02 (s, 1 H, C(8)H), 4,48 (tr, 2 H, C(15)H₂), 3,99 (tr, 2 H, C(14)H₂), 3,65 (s, 3 H, C(13)H₃ (Theophyllin)), 3,59 (s, 3 H, C(13)H₃), 3,44 (s, 3 H, C(12)H₃ (Theophyllin)), 3,40 (s, 3 H, C(12)H₃);

IR: $\tilde{\nu}_{max}$ = 3305 (-O-H, s, br), 3115 (=C-H, w), 1693 (-C=O, m), 1643 (-C=O, s), 1605 (-C=C, m), 1547 (-C=N, m), 1484, 1468, 1405, 1373 (-CH₃ und -CH₂, m);

Schmelzpunkt: 144 °C;

MS: m/z 179,28 (100 %) [M⁻_{Theophyllin}], 257,23 (30 %) [M⁻ - H + Cl⁻], 396,47 (57%) [2M⁺_{Theophyllin} + Na⁺], 247,26 (17 %) [M⁺ + Na⁺]; R_f (Ethylacetat/Methanol/25 % NH₃, 18: 4: 3): 0,56

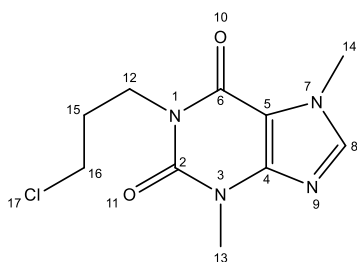
RYR-4	1-(3-chloropropyl)-3,7-dimethyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione
--------------	---

IUPAC: 1-(3-chloropropyl)-3,7-dimethyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione

CAS: 74409-52-2

Summenformel: C₁₀H₁₃ClN₄O₂

Molekulargewicht: 256,69 g/mol



500 mg Theobromin mit 110 mg Natriumhydroxid in 7,5 ml Wasser und 14 ml Ethanol 30 min unter Rückfluss erhitzen, bis eine klare Lösung entsteht. Das Lösungsmittel entfernen und den Feststoff in 14 ml DMF aufnehmen. 2,5 ml 1-Brom-3-Chlorpropan zugeben und Lösung 2,5 Stunden bei 140 °C rühren. Das Lösungsmittel entfernen und das Produkt in Diethylether lösen. Zweimal mit Wasser waschen, um Theobromin zu entfernen. Das Produkt kristallisiert in der Kälte in langen weißen Nadeln aus Diethylether aus und kann durch Filtration gewonnen werden.

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,53 (s, 1 H, C(8)H), 4,15 (m, 2 H, C(12)H₂), 3,99 (s, 3 H, C(14)H₃), 3,58 (s, 3 H, C(13)H₃), 3,45 (tr, 2 H, C(16)H₂), 2,16 (m, 2 H, C(15)H₂);

IR: $\tilde{\nu}_{max}$ = 3106 (=C-H, m), 2955 (-C-H, m), 1705 (-C=O, m), 1646 (-C=O, s), 1604 (-C=C, w), 1547 (-C=N, m), 1484, 1437, 1409, 1353 (-CH₃ und -CH₂, m);

Schmelzpunkt: 144 °C;

MS: m/z 339,5 (100 %) [M⁻ + Br⁻], 255 (55 %) [M⁻ -H], 221,2 (100 %) [M⁺ - Cl⁻];

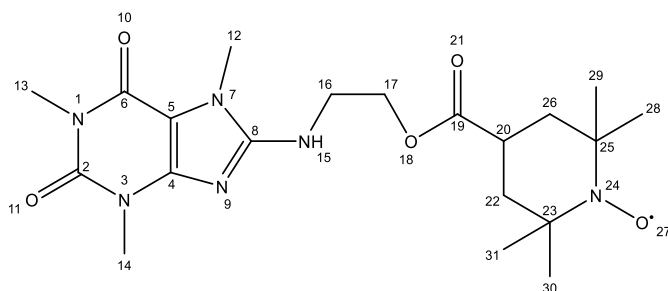
R_f (Ethylacetat/Methanol/25 % NH₃, 18: 4: 3): 0,72

RYR-5	2-((1,3,7-trimethyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)amino)ethyl-2,2,6,6-tetra-methylpiperidine-1-oxyl-4-carboxylate
--------------	--

IUPAC: 2-((1,3,7-trimethyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)amino)ethyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl-4-carboxylate

Summenformel: C₂₀H₃₁N₆O₅

Molekulargewicht: 435,51



118 mg 4-Carboxy-TEMPO und 20,5 mg DMAP wurden unter Argon- Atmosphäre in 30 ml trockenem DMF gelöst. Die Lösung auf 0 °C kühlen, dann 303 mg DCC in DMF tropfenweise zugeben. Nach 20 min 72 mg RYR-1 in DMF langsam bei Raumtemperatur zugeben. Nach 8 h Fortschritt über DC prüfen. Das Lösungsmittel entfernen. Aufreinigung des Produktes mithilfe einer präparativen Dünnschichtchromatographie mit XXX Laufmittel.

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,26 (s, CDCl₃), 6,31 (s, 1 H, N(15)H), 4,16 (s (breit), X H, C(16,17)H₂), 3,74 (s (breit), X H, C(12,13,14)H₃), 3.,13 (s, 1 H, C(20)H), 2,36 (tr, 4 H, C(22,26)H₂), 2,01-1,28 (m, HDO + C(28, 29, 30, 31)H₃);

IR: $\tilde{\nu}_{max}$ = 3303 (-N-H, m), 2971, 2929, 2856 (-C-H, s), 1693 (-C=O, m), 1655 (-C=O, s), 1530 (-C=N, m), 1452, 1400, 1333 (-CH₃ und -CH₂, m);

Schmelzpunkt: 168,7 °C;

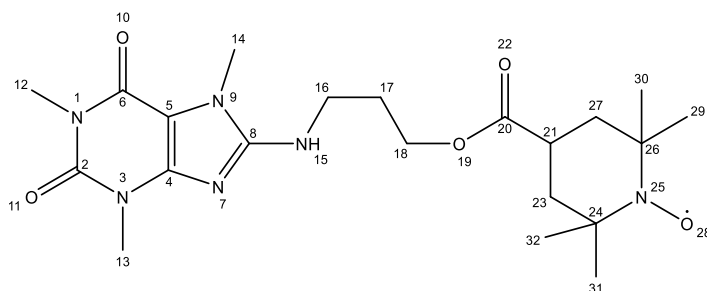
MS: m/z 280,32 (100 %) [M⁻ - TEMPO], 429,32 (100%) [M + M²⁺-O]; R_f (Ethylacetat/Methanol/25 % NH₃, 18: 4: 3): 0,83

RYR-6	3-((1,3,7-trimethyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)amino)propyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl-4-carboxylate
--------------	--

IUPAC: 3-((1,3,7-trimethyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-8-yl)amino)propyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl-4-carboxylate

Summenformel: C₂₁H₃₃N₆O₅

Molekulargewicht: 449,53



240 mg Carboxy-TEMPO und 26 mg DMAP unter Argon- Atmosphäre in 30 ml trockenem DMF lösen. Die Lösung auf 0 °C kühlen, dann 290 mg DCC in DMF tropfenweise zugeben. Nach 20 min 261 mg RYR-2 in DMF langsam bei Raumtemperatur zugeben. Nach 8 h Fortschritt über DC prüfen. Das Lösungsmittel entfernen. Aufreinigung des Produktes mithilfe einer präparativen Dünnschichtchromatographie mit Heptan: Ethylacetat im Verhältnis 1:3 als Laufmittel.

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ = 7,26 (s, CDCl₃), 4,11 (tr, X H, C(18)H₂), 3,69 (s (breit), C(12, 13, 14)H₃ + C(16)H₂), 3,10 (tr, 1 H, C(21)H), 2,33 (m, 2 H, C(17)H₂), 1,98 – 1,84 (m, 4 H, C(23,27)H₂), 1,64 (m, HDO), 1,40 (s, 12 H, C(29, 30,31, 32)H₃);

IR: $\tilde{\nu}_{max}$ = 3302 (-N-H, m), 2929, 2856 (-C-H, s), 1694 (-C=O, m), 1654 (-C=O, s), 1530 (-C=N, m), 1452, 1401, 1333 (-CH₃ und -CH₂, m);

Schmelzpunkt: 167,2 °C;

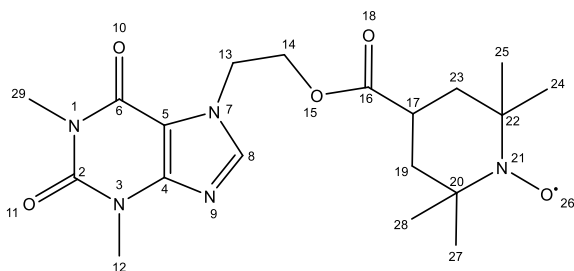
MS: m/z = 280,30 (100 %) [M⁻(TEMPO-COO⁻) + Br⁻], 429,36 (100 %) [M⁺-O]; R_f (Ethylacetat/Methanol/25 % NH₃, 18: 4: 3): 0,86

RYR-7	2-(1,3-dimethyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-7-yl)ethyl- 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl-4-carboxylate
--------------	---

IUPAC: 2-(1,3-dimethyl-2,6-dioxo-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purin-7-yl)ethyl-
2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl-4-carboxylate

Summenformel: C₁₈H₂₆N₅O

Molekulargewicht: 406,46



150 mg Carboxy-TEMPO und 40 mg DMAP unter Argon- Atmosphäre in 30 ml trockenem DMF lösen. Die Lösung auf 0 °C kühlen, dann 390 mg DCC in DMF tropfenweise zugeben. Nach 20 min 300 mg RYR-3 in DMF langsam bei Raumtemperatur zugeben. Nach 8 h Fortschritt über DC prüfen. Das Lösungsmittel entfernen. Aufreinigung des Produktes mithilfe Säulenchromatographie mit einem Heptan/Ethylacetat-Gradienten und Aluminiumoxid als stationäre Phase.

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7,26 (CDCl₃), 4,03 (m, 2H, C(14)H₂), 3,68 (m, 2H, C(13)H₂), 3,59 (m, 3H, C(12)H₃), 3,43 (m, 3H, C(29)H₃), 2,96 (m, 1H, C(17)H), 1,64 (m, 4H, C(19, 23)H₂), 1,40 (m, 12H, C(24, 25, 26, 27)H₃);

IR: $\tilde{\nu}_{max}$ = 3302 (-N-H, m), 2928, 2855 (-C-H, s), 1693 (-C=O, m), 1655 (-C=O, s), 1532 (-C=N, w), 1451, 1400, 1333 (-CH₃ und -CH₂, m);

Schmelzpunkt: 157,4 °C;

MS: m/z = 280,41 (100 %) [TEMPO-COO + Br⁻], 441,27 (28 %) [M⁻ + Cl], 390,29 (100 %) [M⁺ - O], 429,20 (17 %) [M⁺⁺ Na]; R_f(Ethylacetat/Methanol/25 % NH₃, 18: 4: 3): 0,84

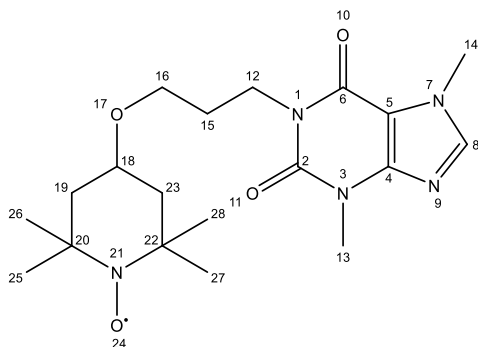
RYR-8

1-(3-((2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)oxy)propyl)-3,7-dimethyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione

IUPAC: 1-(3-((2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-yl)oxy)propyl)-3,7-dimethyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione

Summenformel: C₁₉H₃₀N₅O₄

Molekulargewicht: 392,48



80 mg 4-Hydroxy-TEMPO in trockenem DMF lösen, 14 mg NaH zugeben, kurz rühren lassen. Lösung auf 0 °C kühlen, 102 mg RYR-4 in DMF tropfenweise zugeben. 5 Stunden bei Raumtemperatur rühren, Reaktionsfortschritt über DC prüfen. Aufreinigung des Produktes nach Entfernen des Lösungsmittels mit einer Säulenchromatographie mit einem Heptan/Ethylacetat-Gradienten und Kieselgel als stationäre Phase.

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ= 7,26 (CDCl₃), 4,16 (m, 2 H, C(12)H₂), 3,73 (m, 2 H, C(18)H₂), 3,67(s, 3 H, C(14)H₃), 3,53(m, 1 H, C(18)H), 3,47 (s, 3 H, C(13)H₂), 3,22 (m, 2 H, C(15)H₂), 1,75 (m, 4 H, C(19, 23)H₂), 1,35 (m, 16 H, C(25, 26, 27, 28)H₂);

IR: $\tilde{\nu}_{max}$ = 3390 (H₂O, br), 2976, 2949, 2930, 2857 (-C-H, s), 1722 (-C=O, w), 1473, 1453, 1294 (-CH₃ und -CH₂, m);

Schmelzpunkt: 135,2 °C;

MS: neg. Ionisierung: m/z = 339,41 (100 %) 339,5 (100 %) [M⁻ (RYR-4)+ Br], 425,41 (28 %) [M⁻ + Cl], 284,48 (82 %) [M⁺ + K]; R_f (Heptan/Ethylacetat, 1:3): 0,41

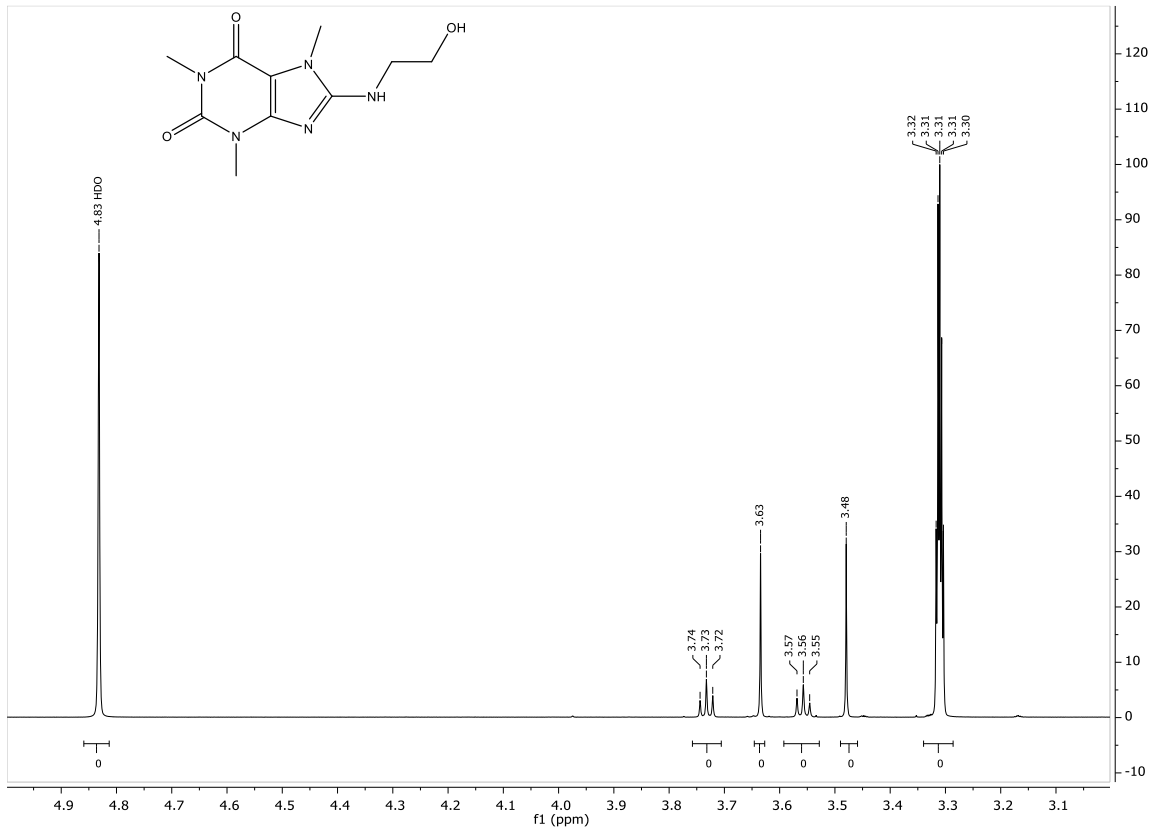
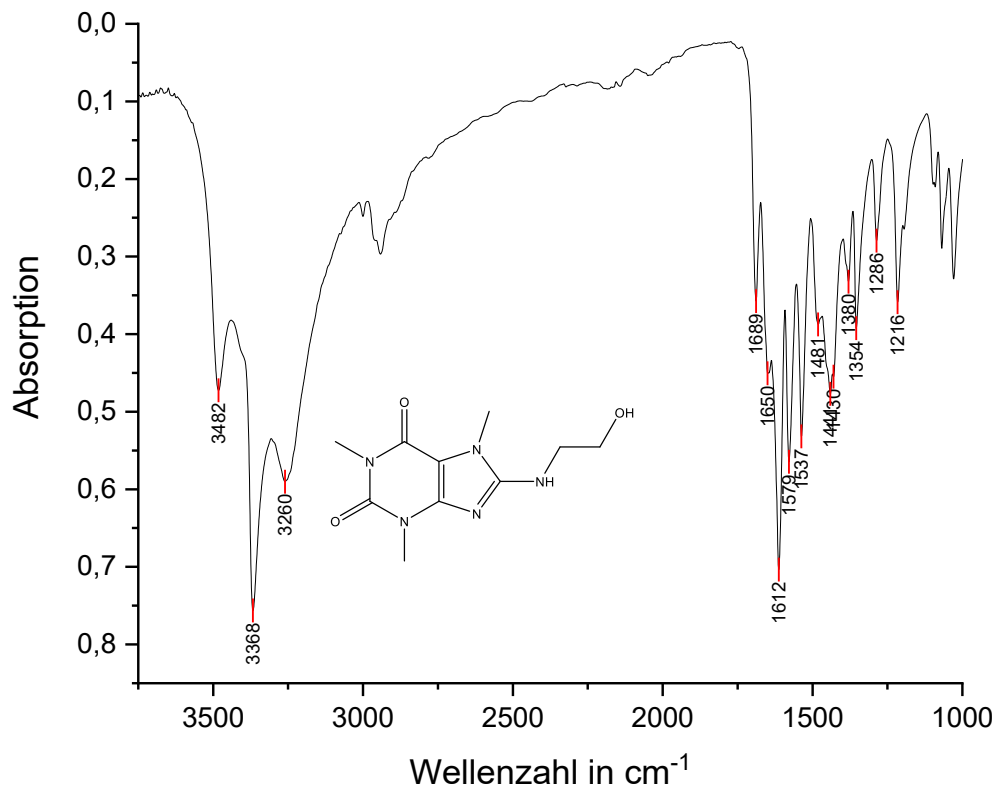
Abbildung 89 ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, CD₃OD) von RYR-1.

Abbildung 90 IR-Spektrum von RYR-1.

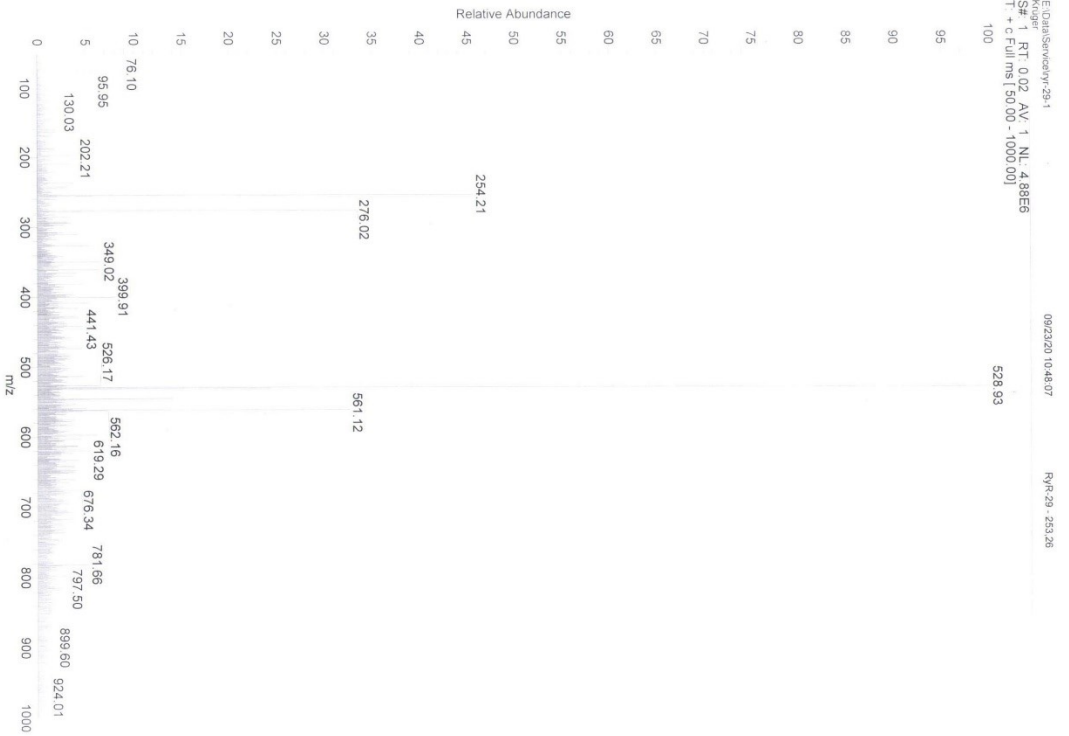


Abbildung 91 Massenspektrogramm mit positiver Ionisierung für RYR-1.

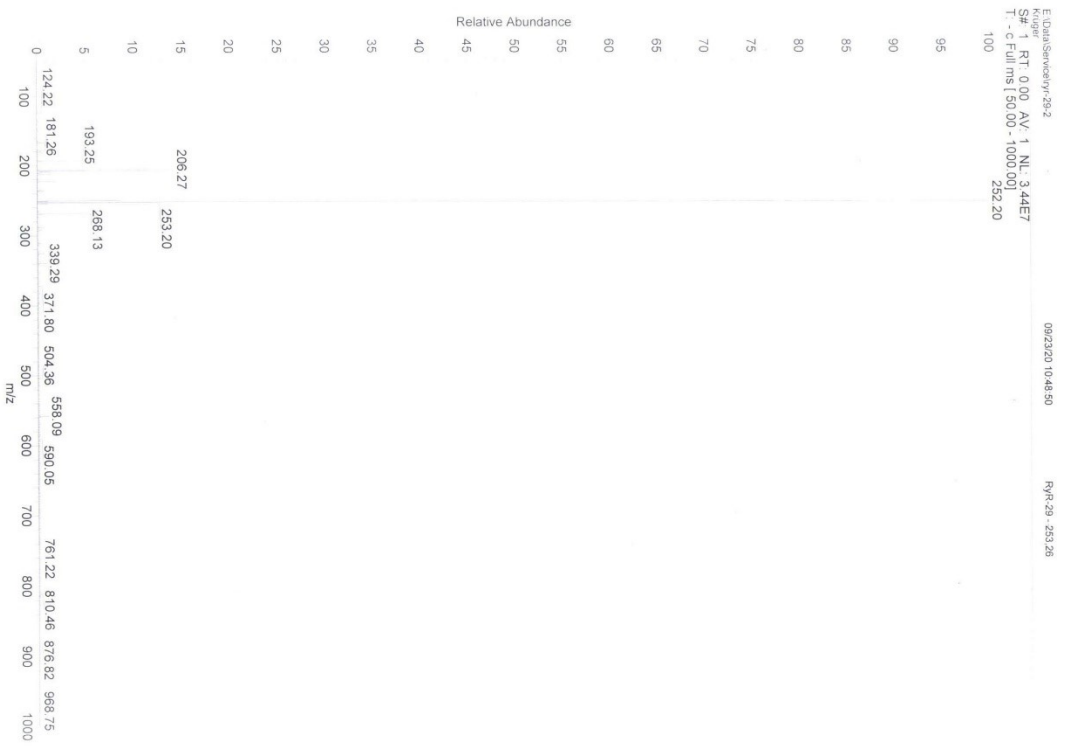


Abbildung 92 Massenspektrogramm mit negativer Ionisierung für RYR-1.

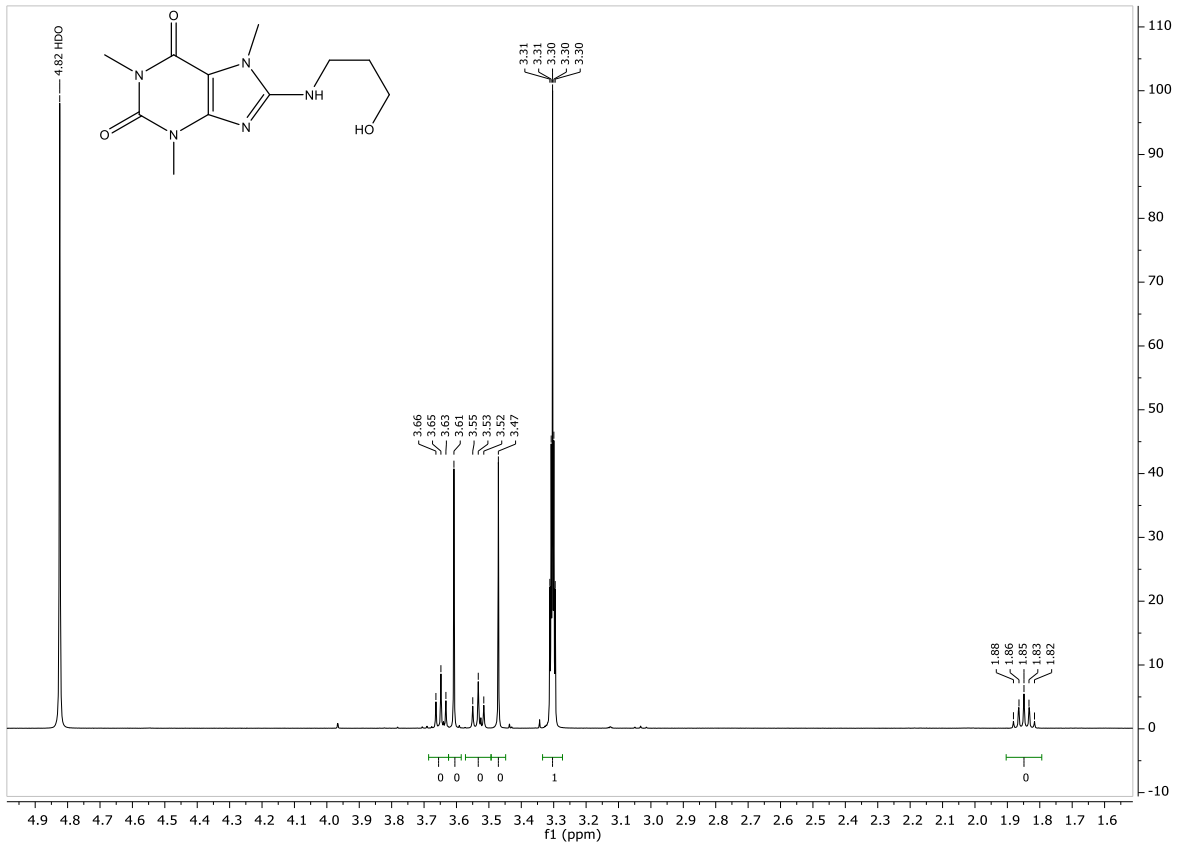
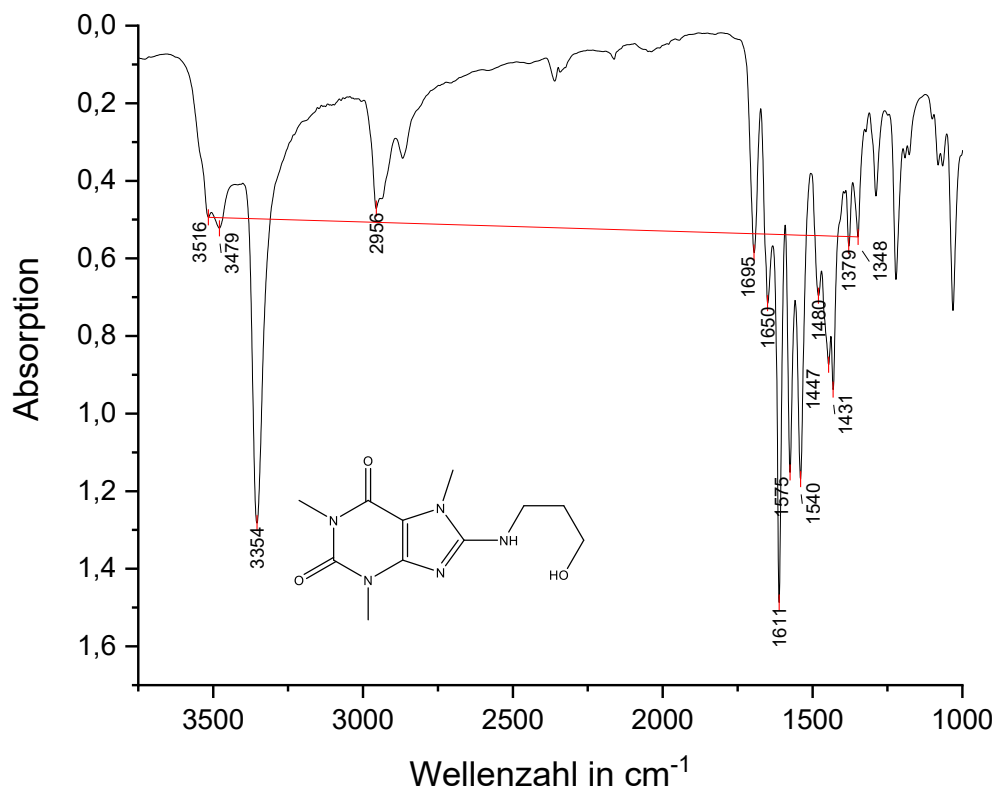
Abbildung 93 ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CD_3OD) von RYR-2.

Abbildung 94 IR-Spektrum von RYR-2.

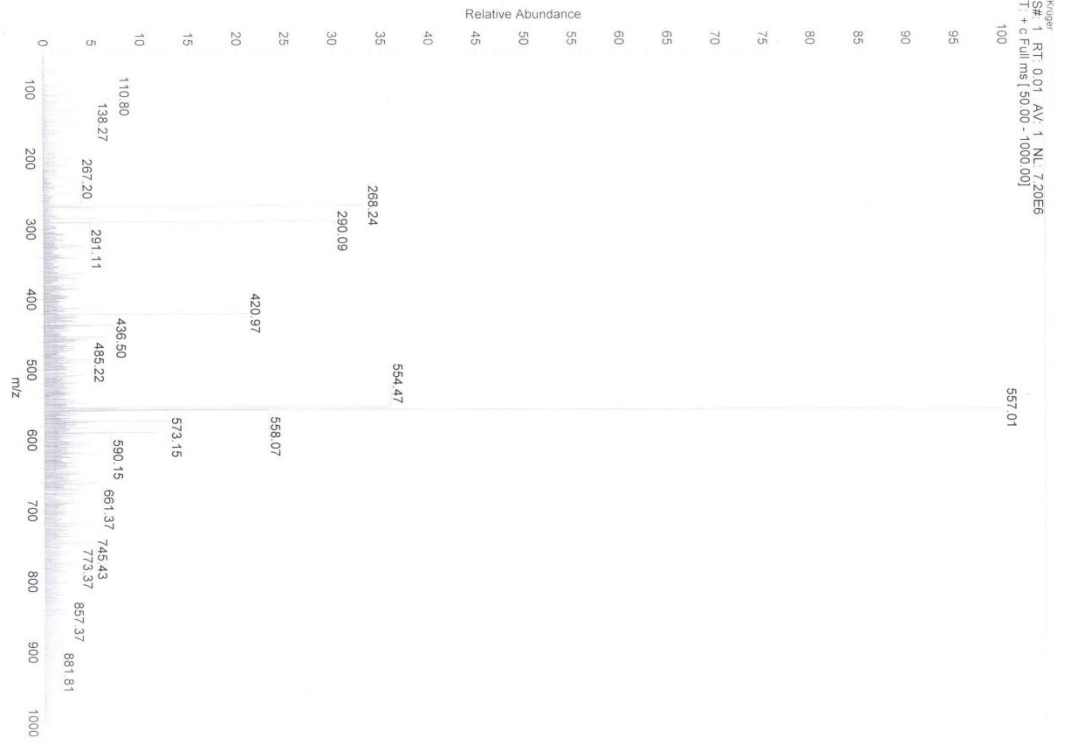


Abbildung 95 Massenspektrogramm mit positiver Ionisierung für RYR-2.

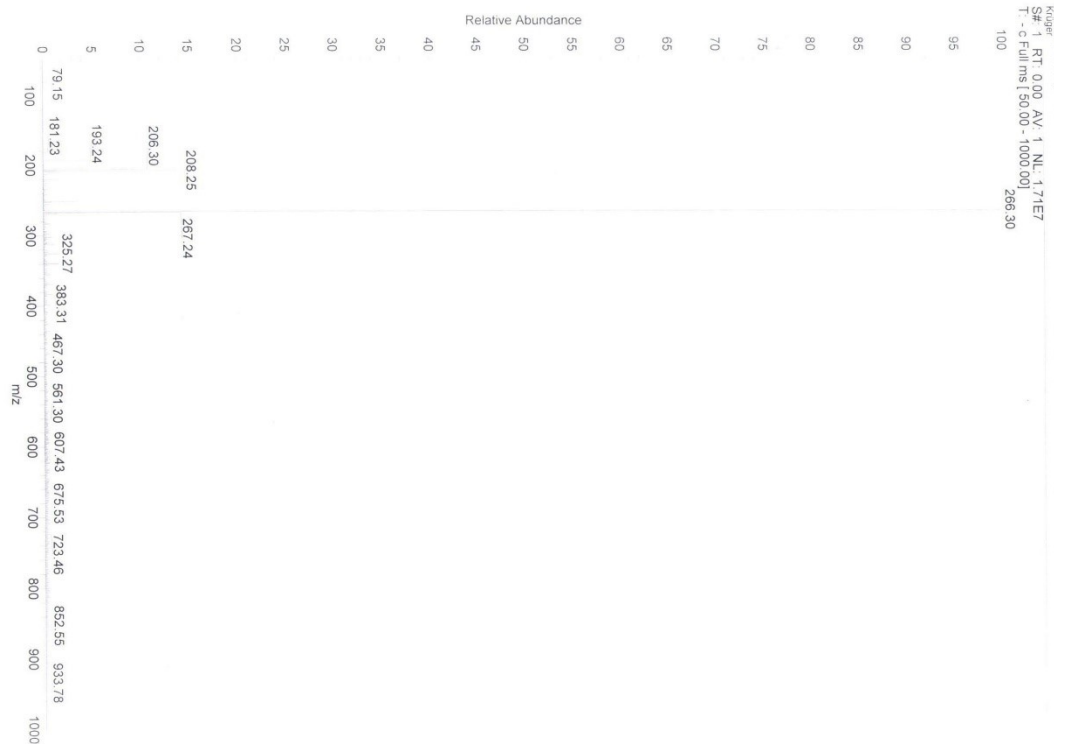


Abbildung 96 Massenspektrogramm mit negativer Ionisierung für RYR-2.

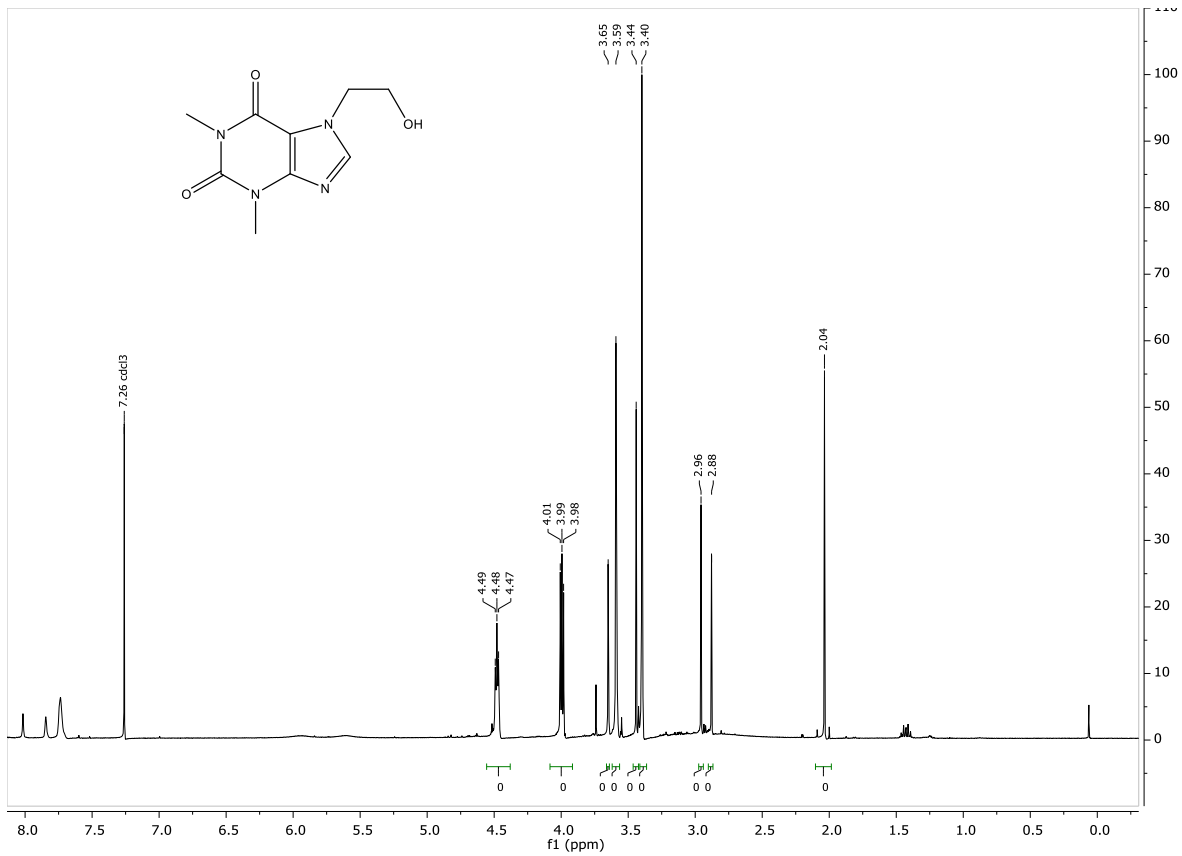
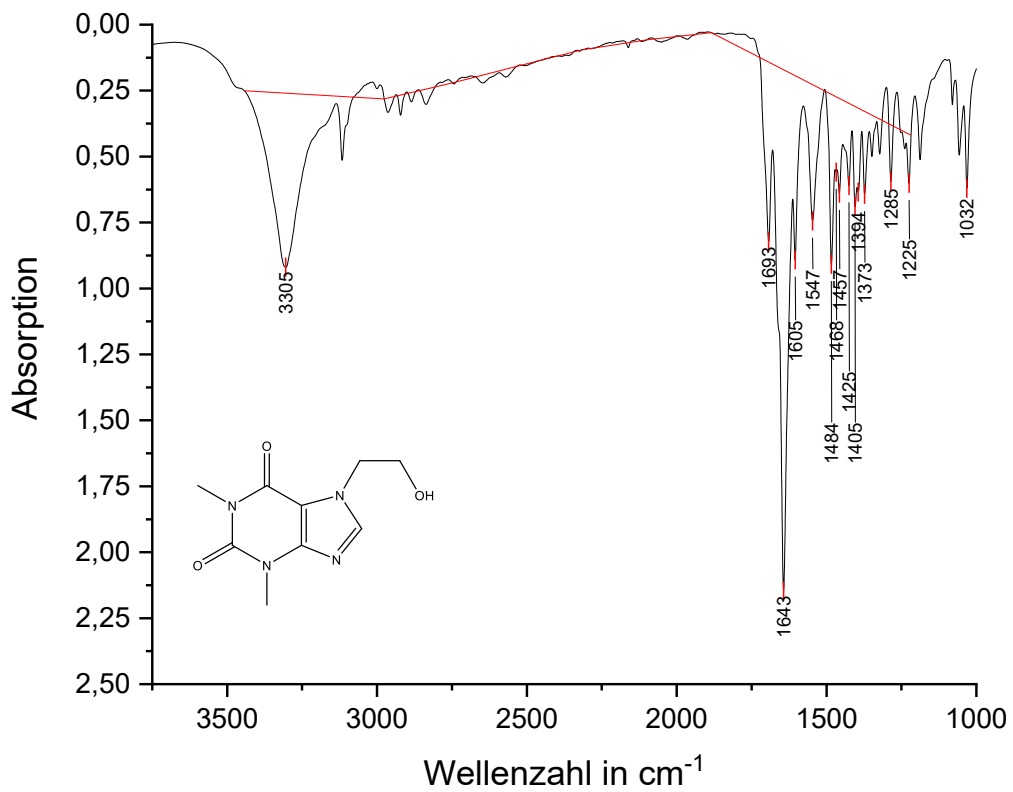
Abbildung 97 ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von RYR-3

Abbildung 98 IR-Spektrum von RYR-3.

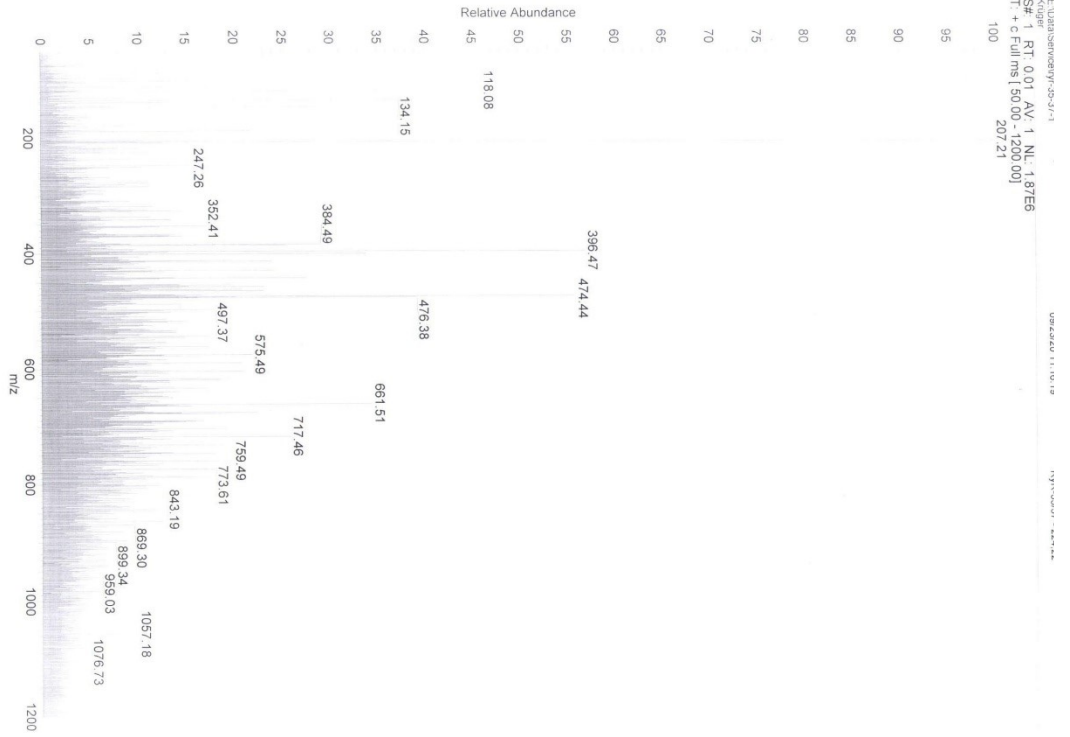


Abbildung 99 Massenspektrogramm mit positiver Ionisierung für RYR-3.

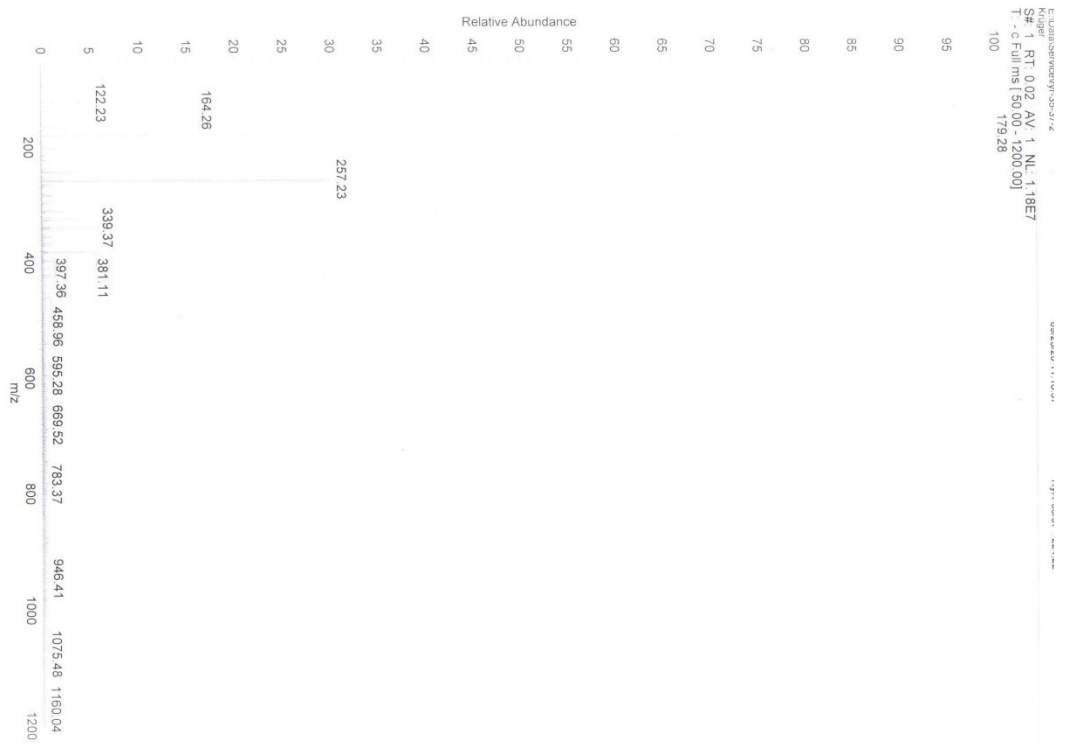


Abbildung 100 Massenspektrogramm mit negativer Ionisierung für RYR-3.

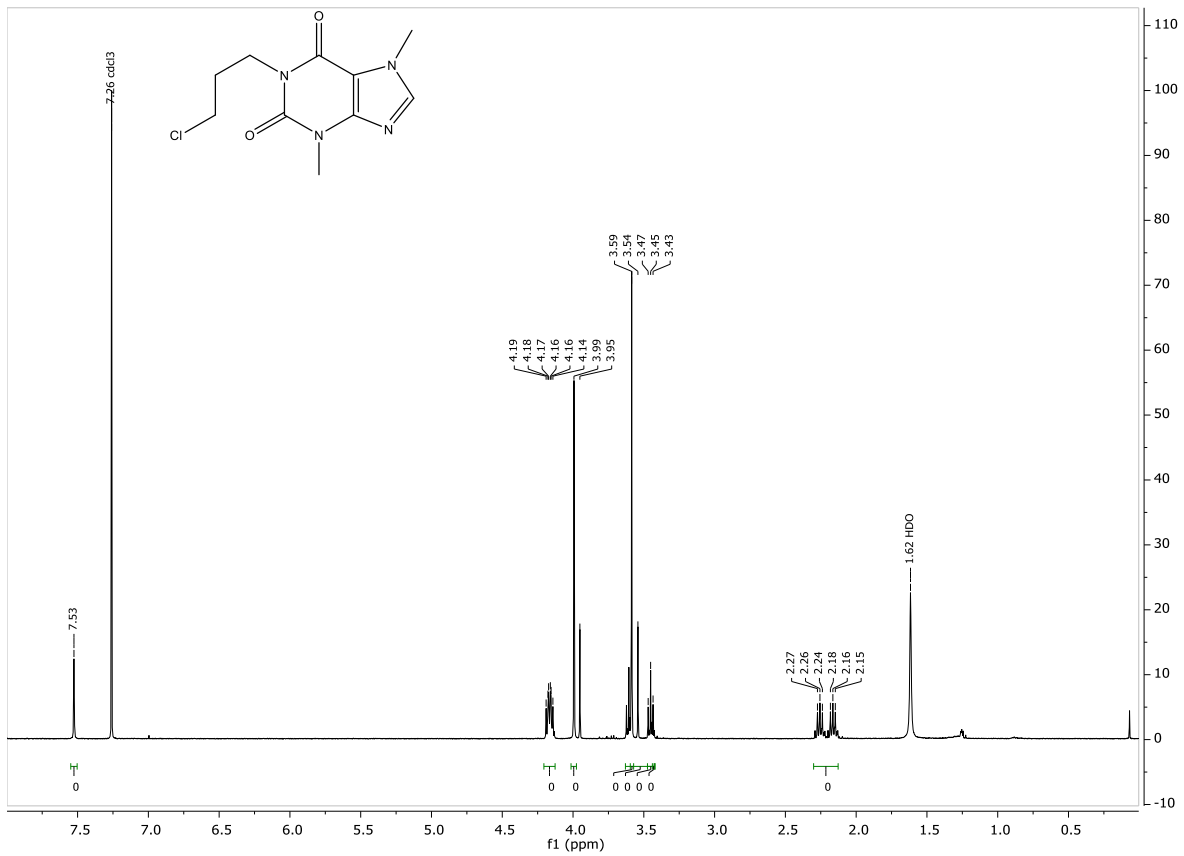
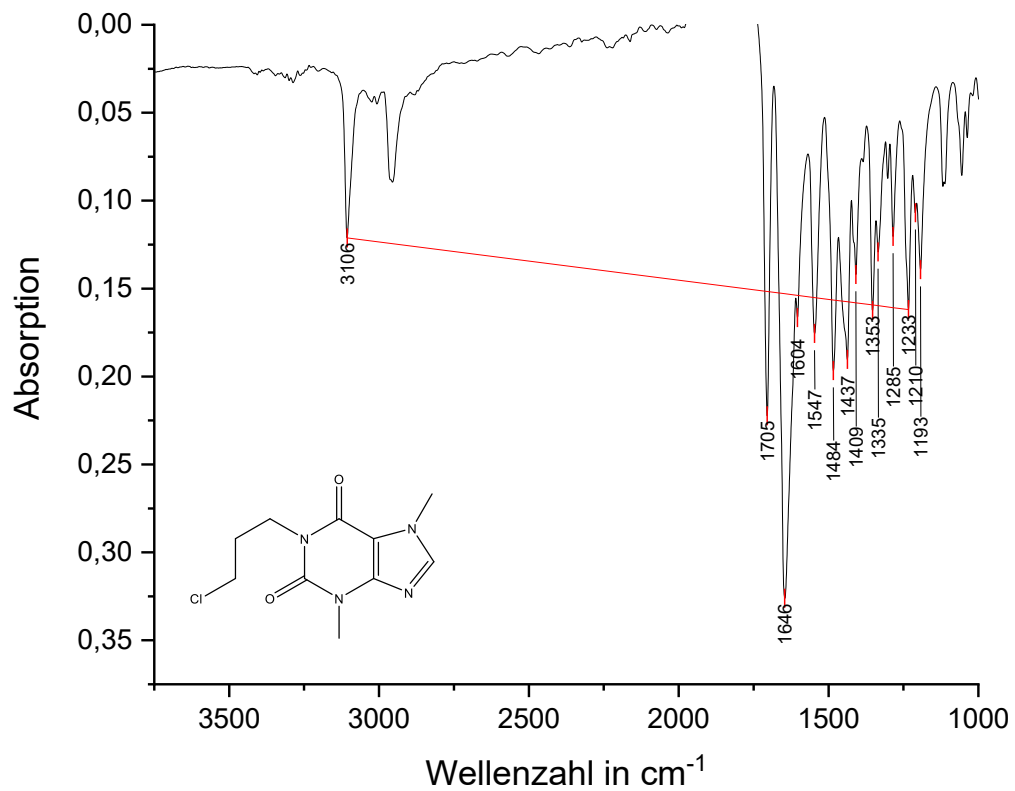
Abbildung 101 ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von RYR-4

Abbildung 102 IR-Spektrum von RYR-4.

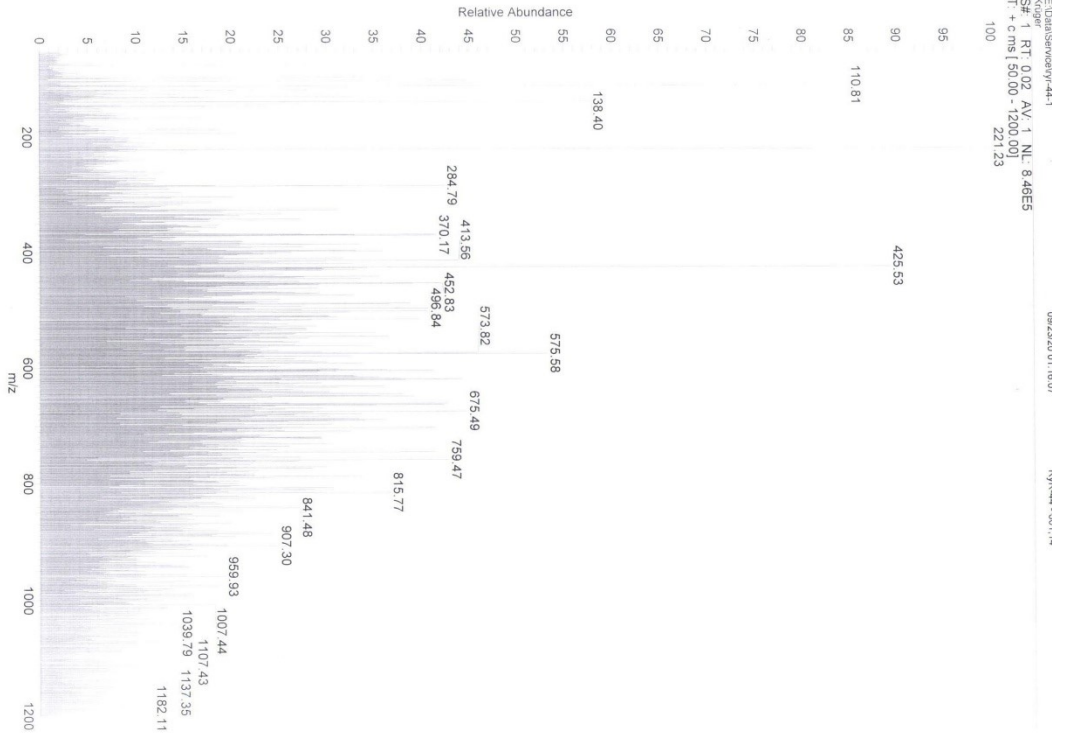


Abbildung 103 Massenspektrogramm mit positiver Ionisierung für RYR-4.

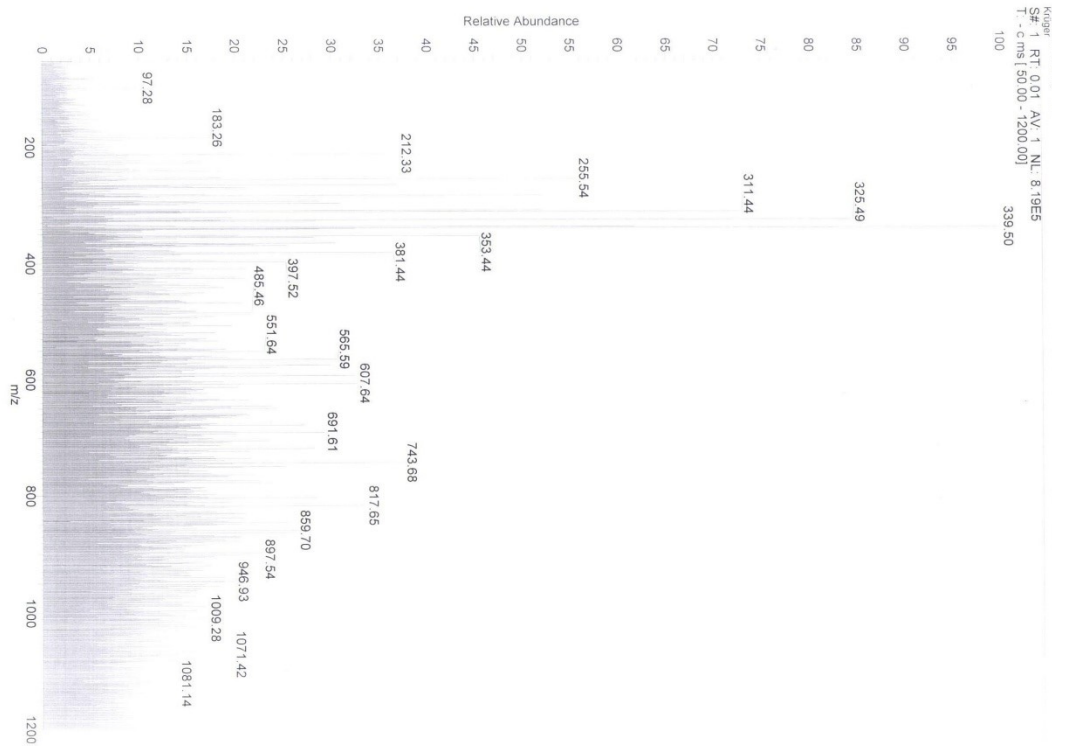


Abbildung 104 Massenspektrogramm mit negativer Ionisierung für RYR-4.

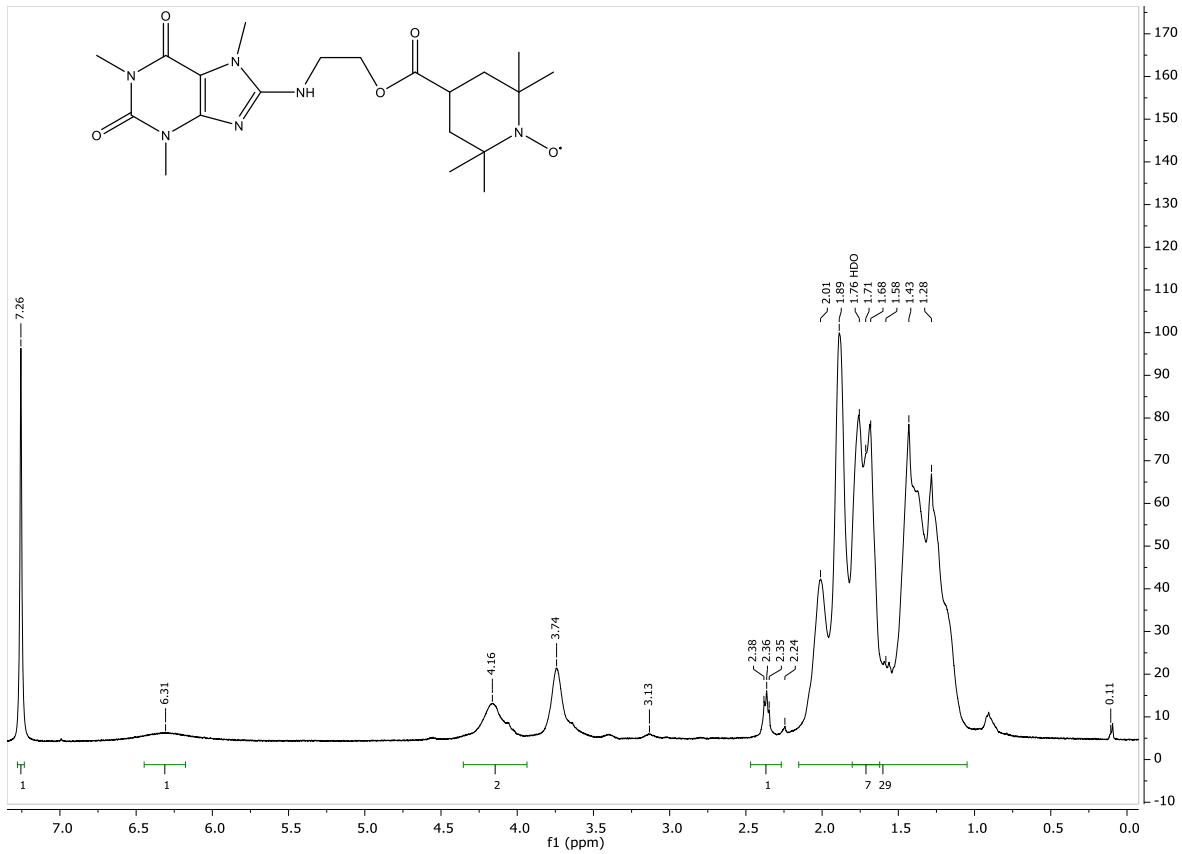
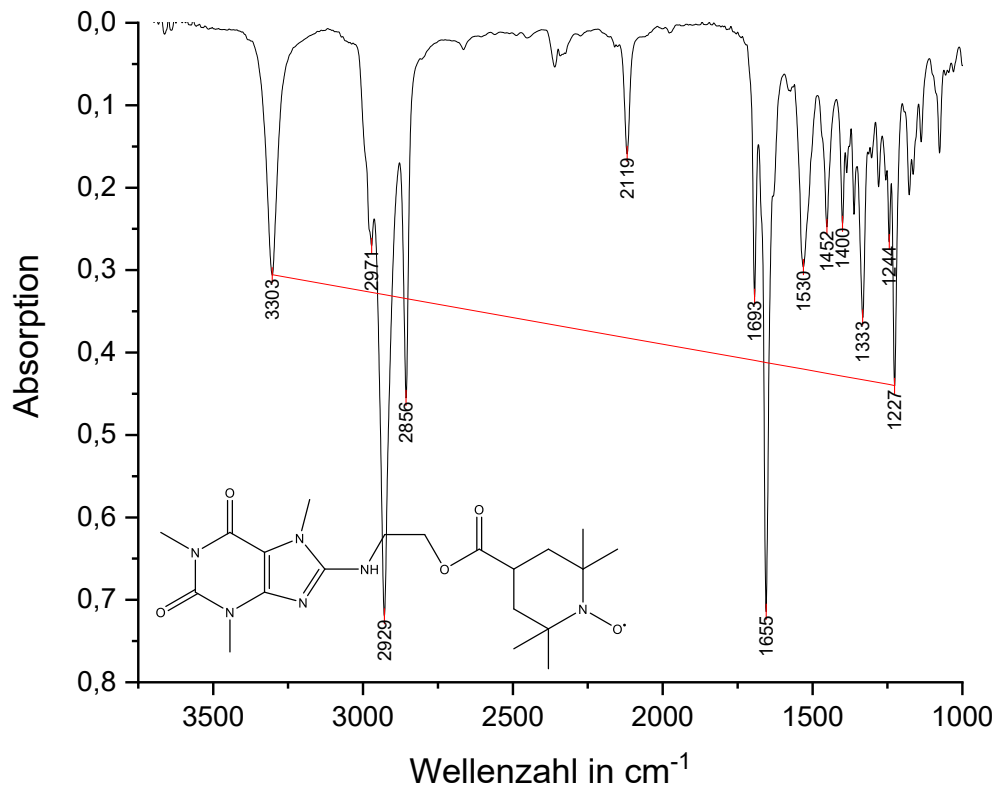
Abbildung 105 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von RYR-5

Abbildung 106 IR-Spektrum von RYR-5.



Abbildung 107 Massenspektrogramm mit positiver Ionisierung für RYR-5.

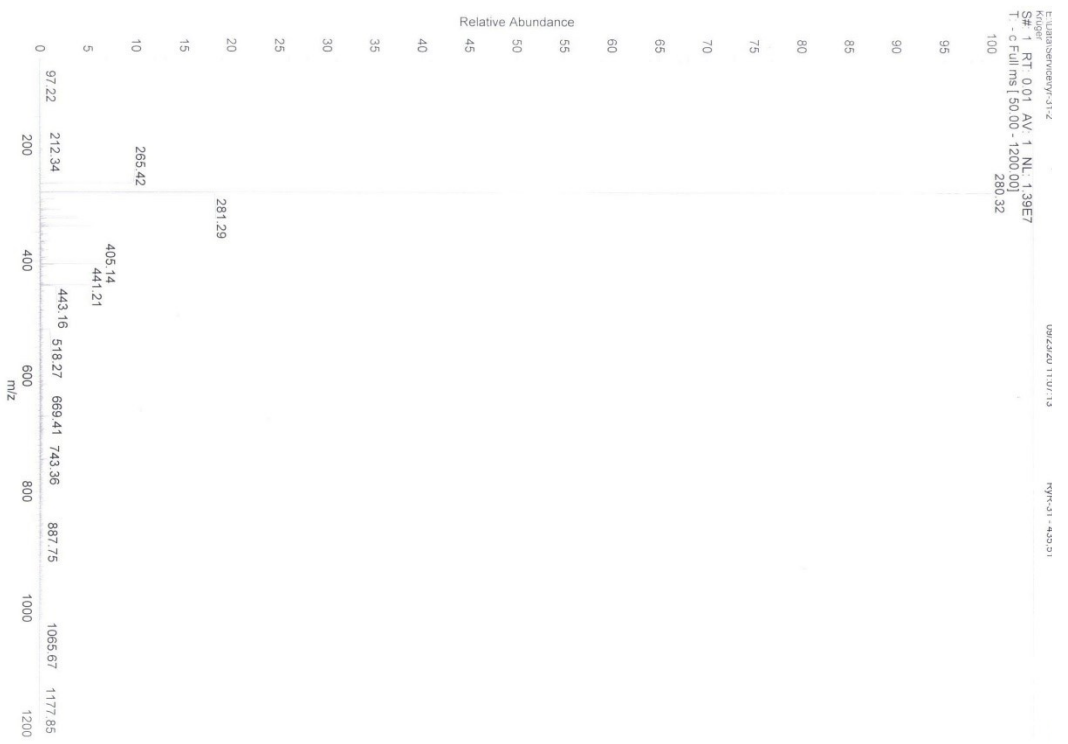


Abbildung 108 Massenspektrogramm mit negativer Ionisierung für RYR-5.

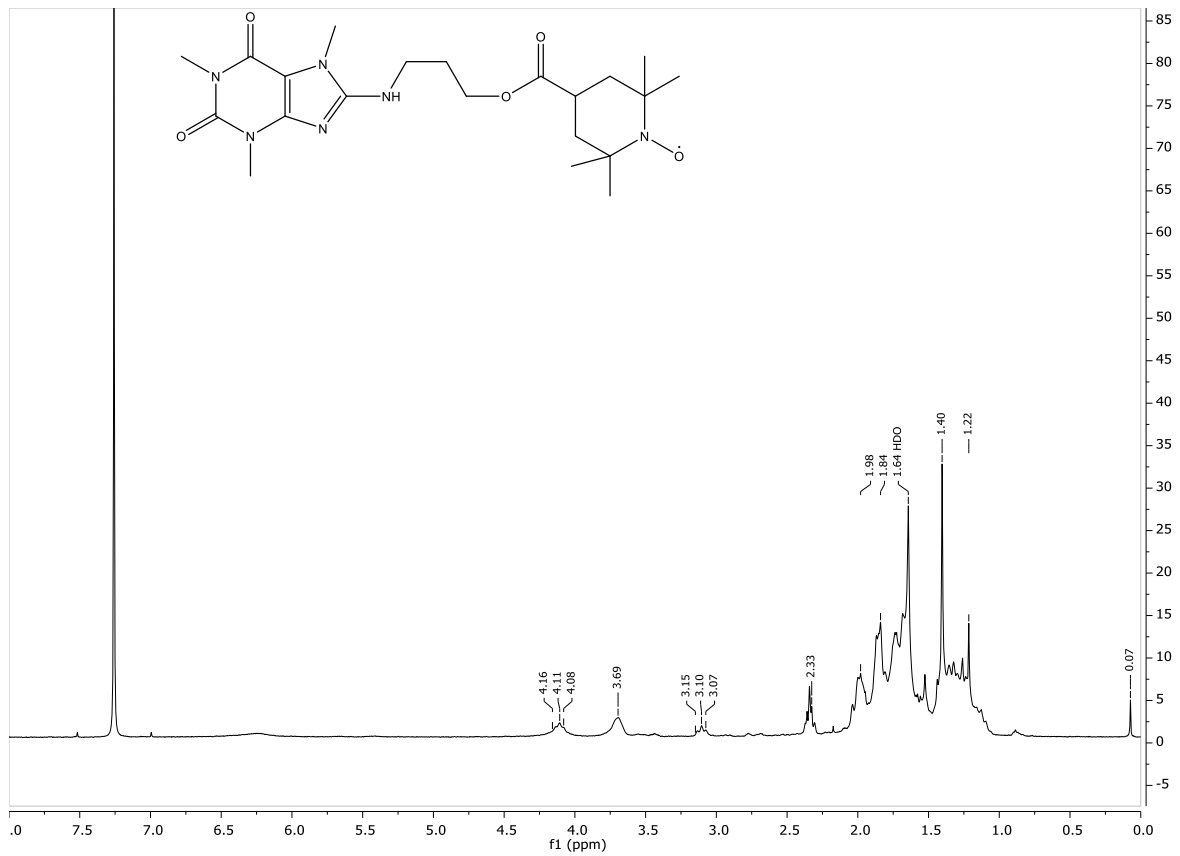
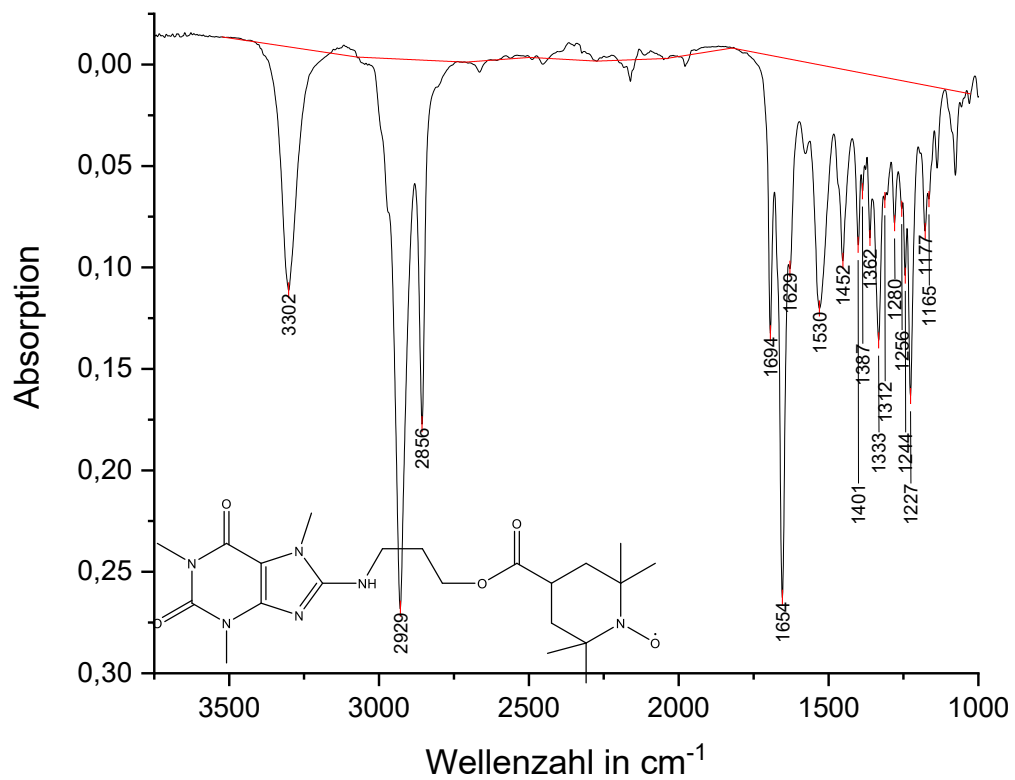
Abbildung 109 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von RYR-6

Abbildung 110 IR-Spektrum von RYR-6.

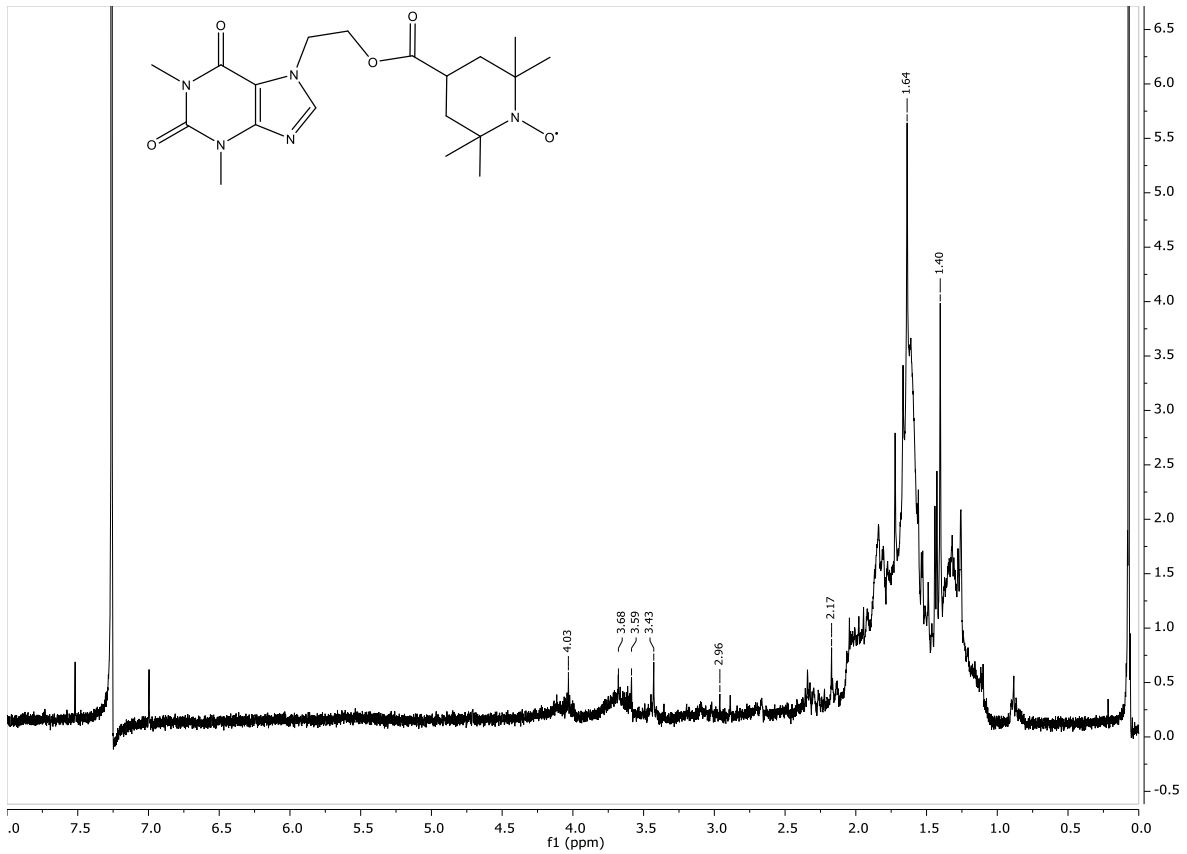
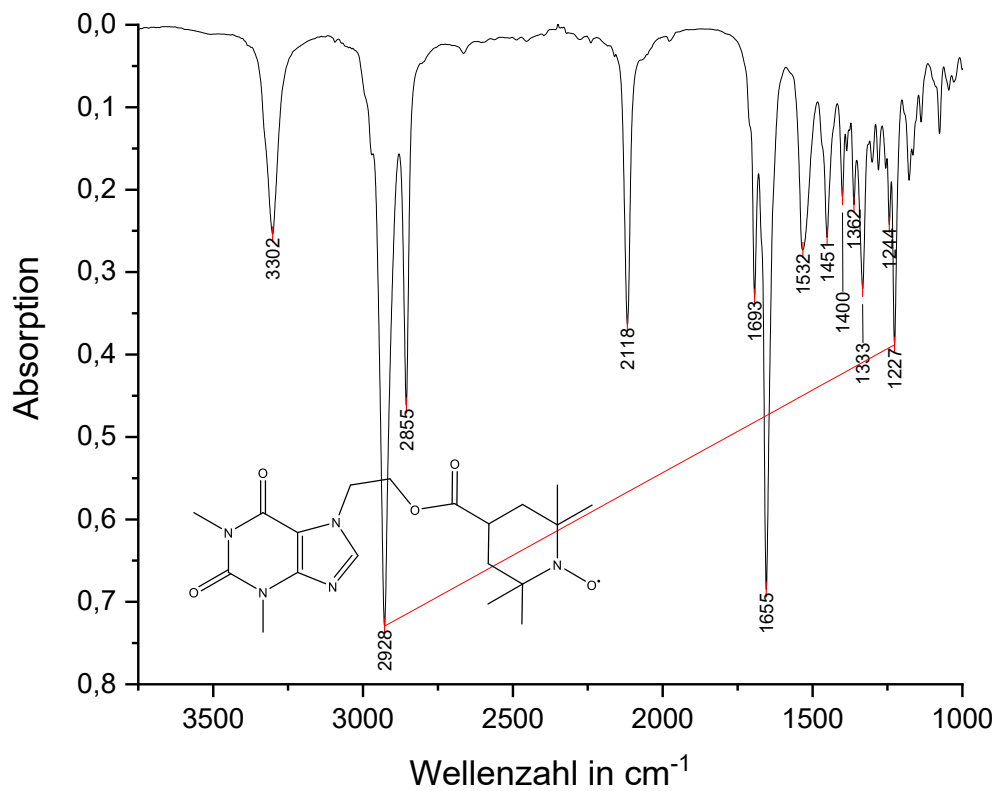
Abbildung 113 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von RYR-7

Abbildung 114 IR-Spektrum von RYR-7.

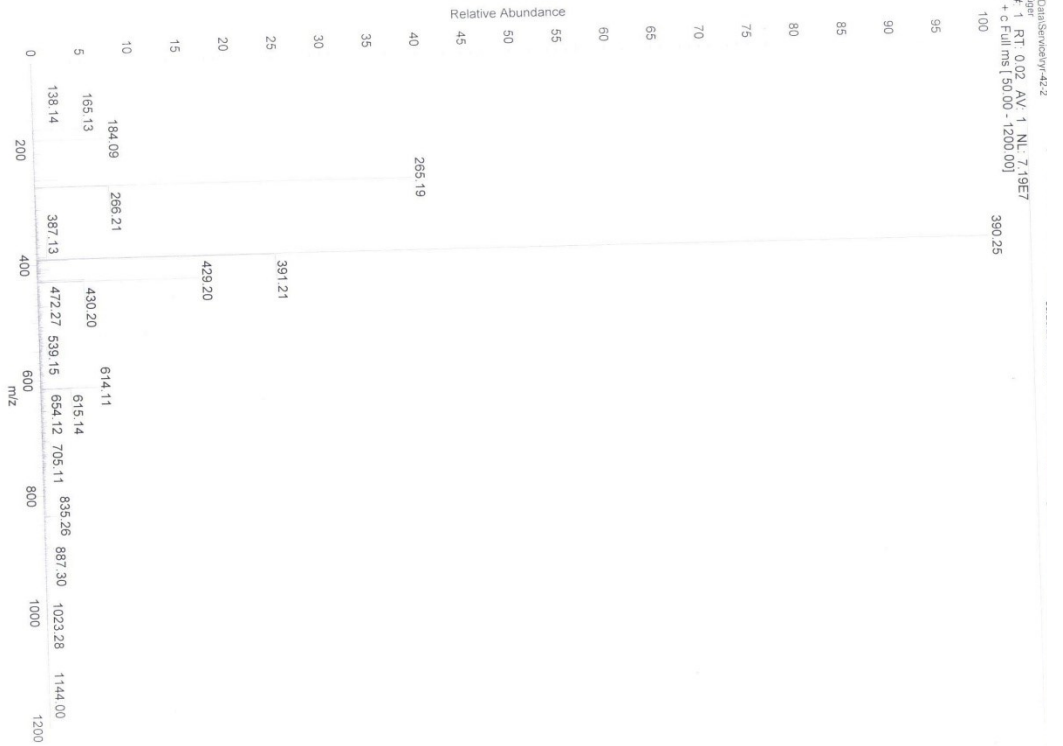


Abbildung 115 Massenspektrogramm mit positiver Ionisierung für RYR-7.

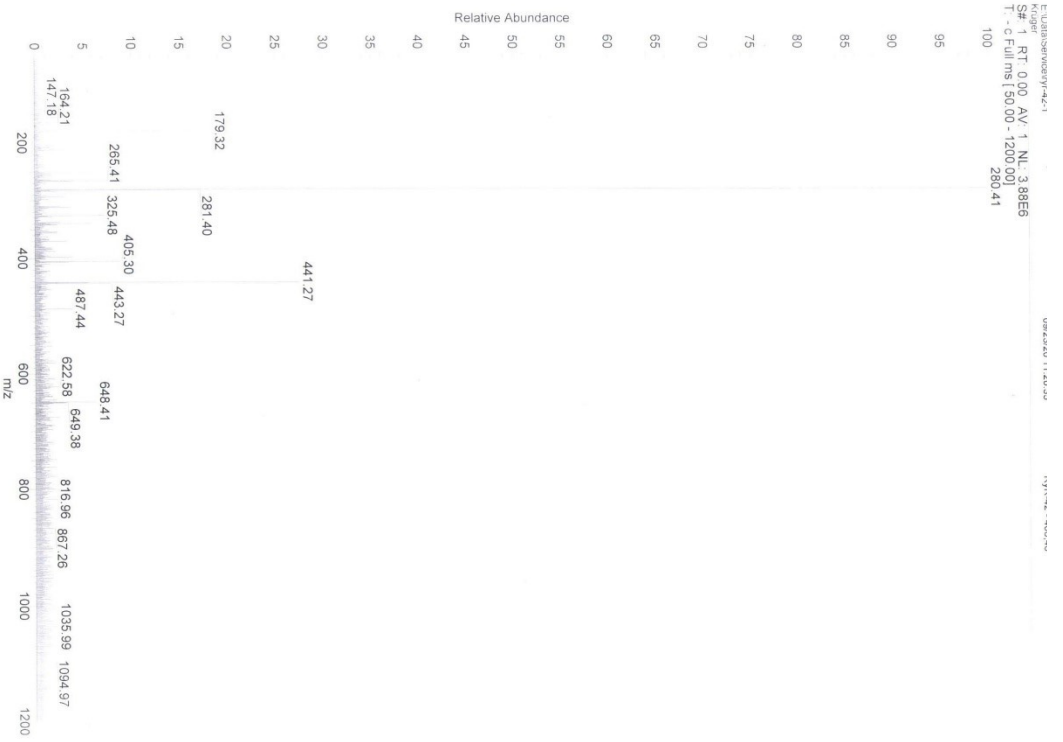


Abbildung 116 Massenspektrogramm mit negativer Ionisierung für RYR-7.

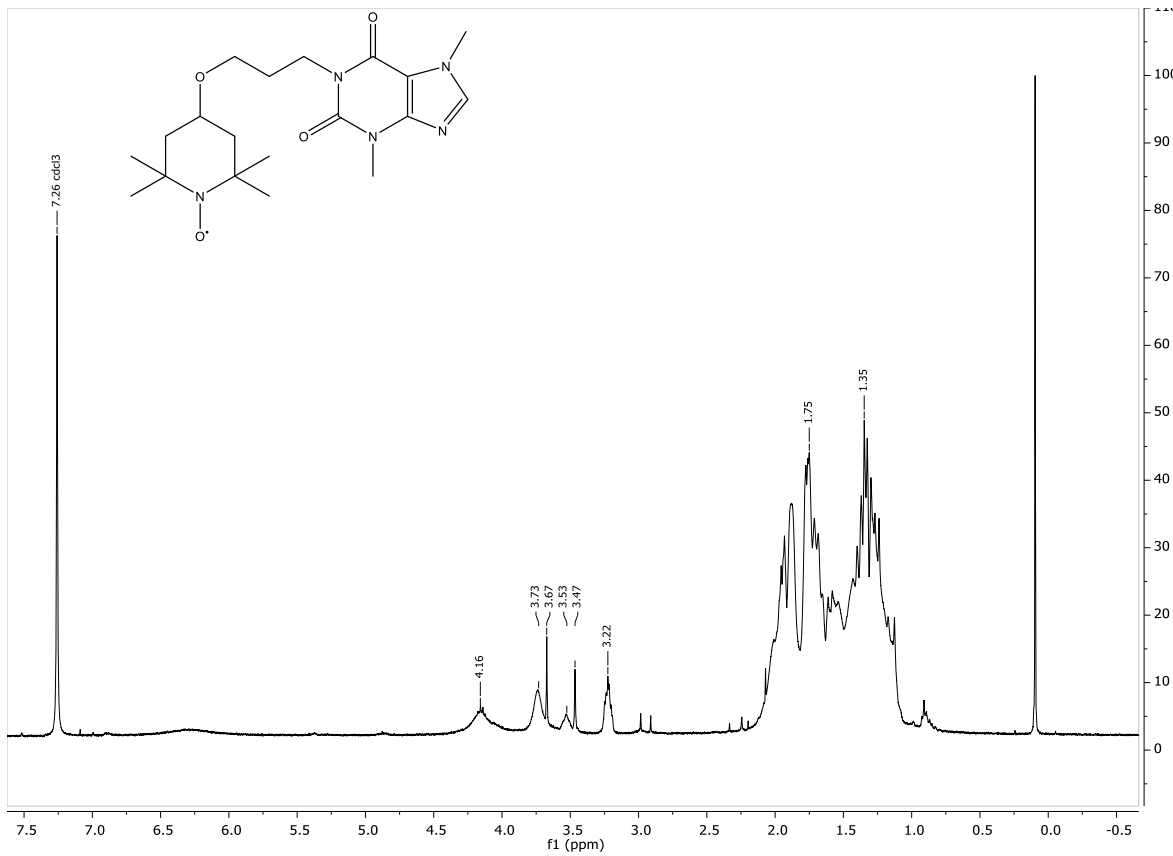
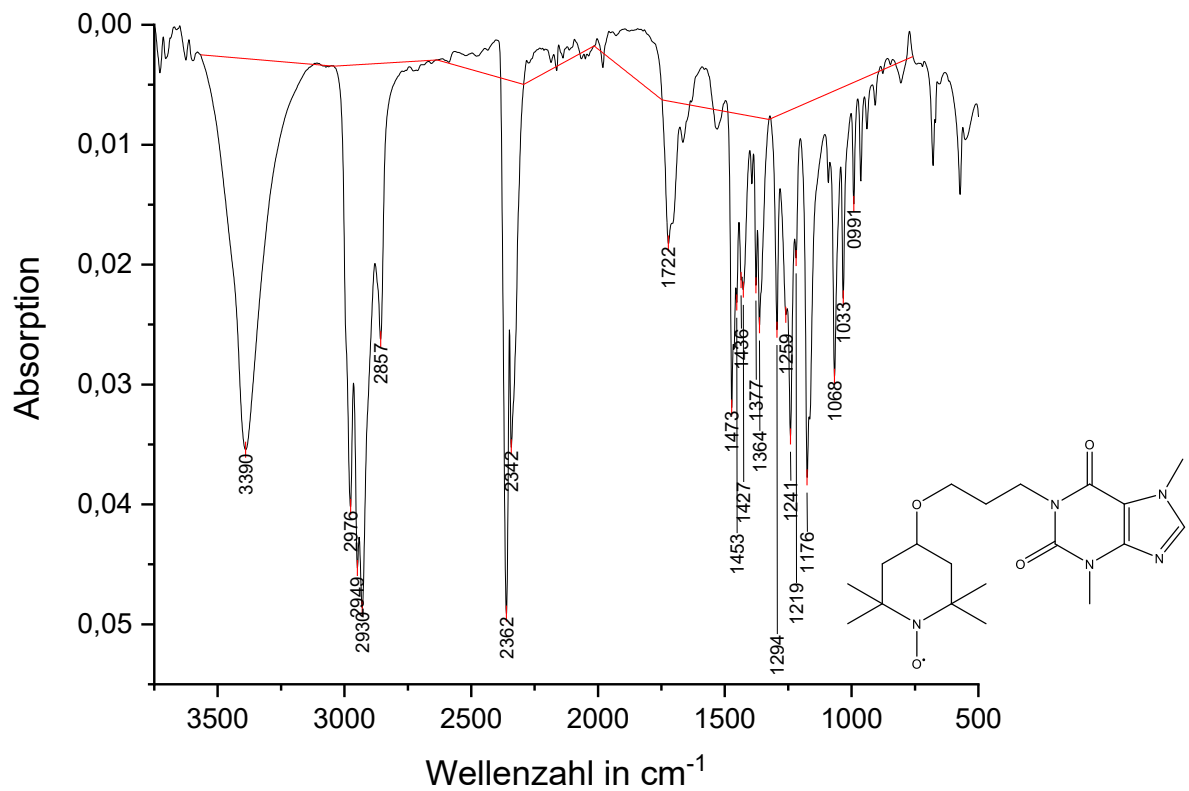
Abbildung 117 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400 MHz, CDCl_3) von RYR-8

Abbildung 118 IR-Spektrum von RYR-8.

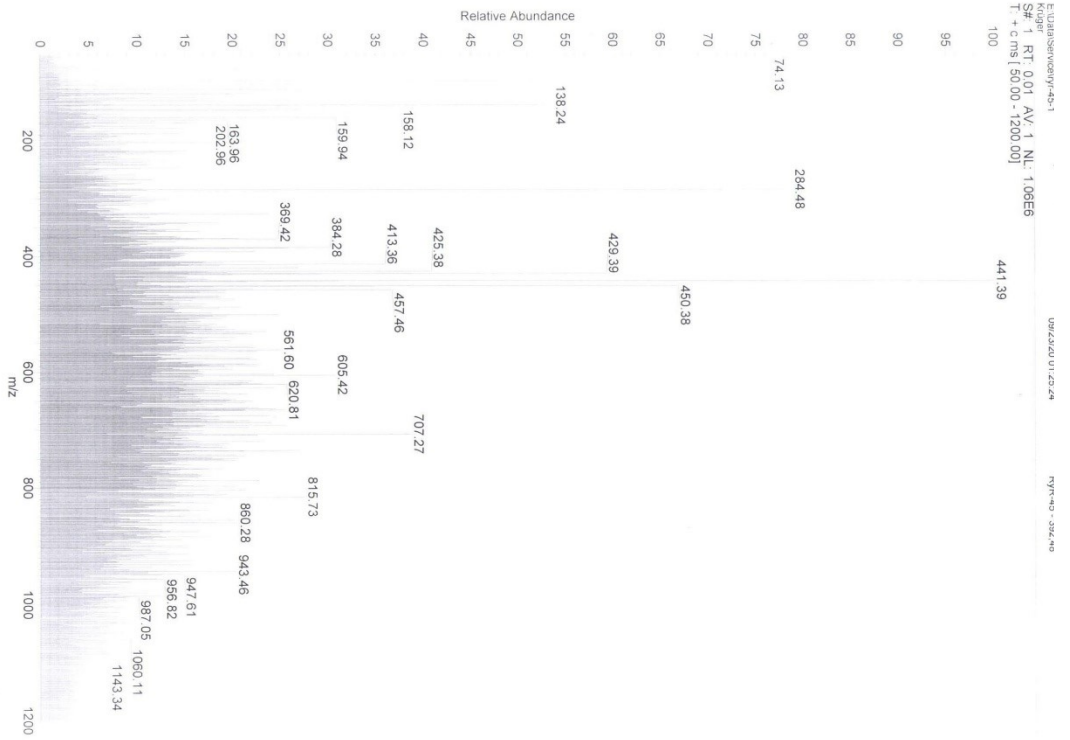


Abbildung 119 Massenspektrogramm mit positiver Ionisierung für RYR-8.

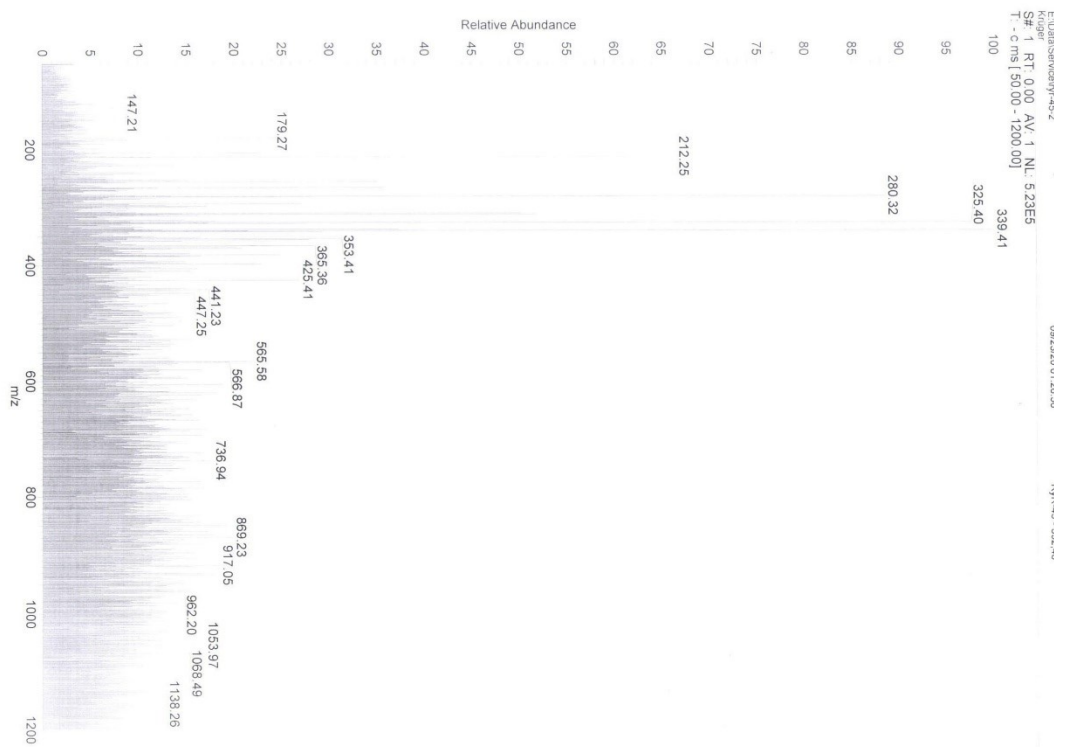


Abbildung 120 Massenspektrogramm mit negativer Ionisierung für RYR-8.

8.2.2. cwEPR Analytik

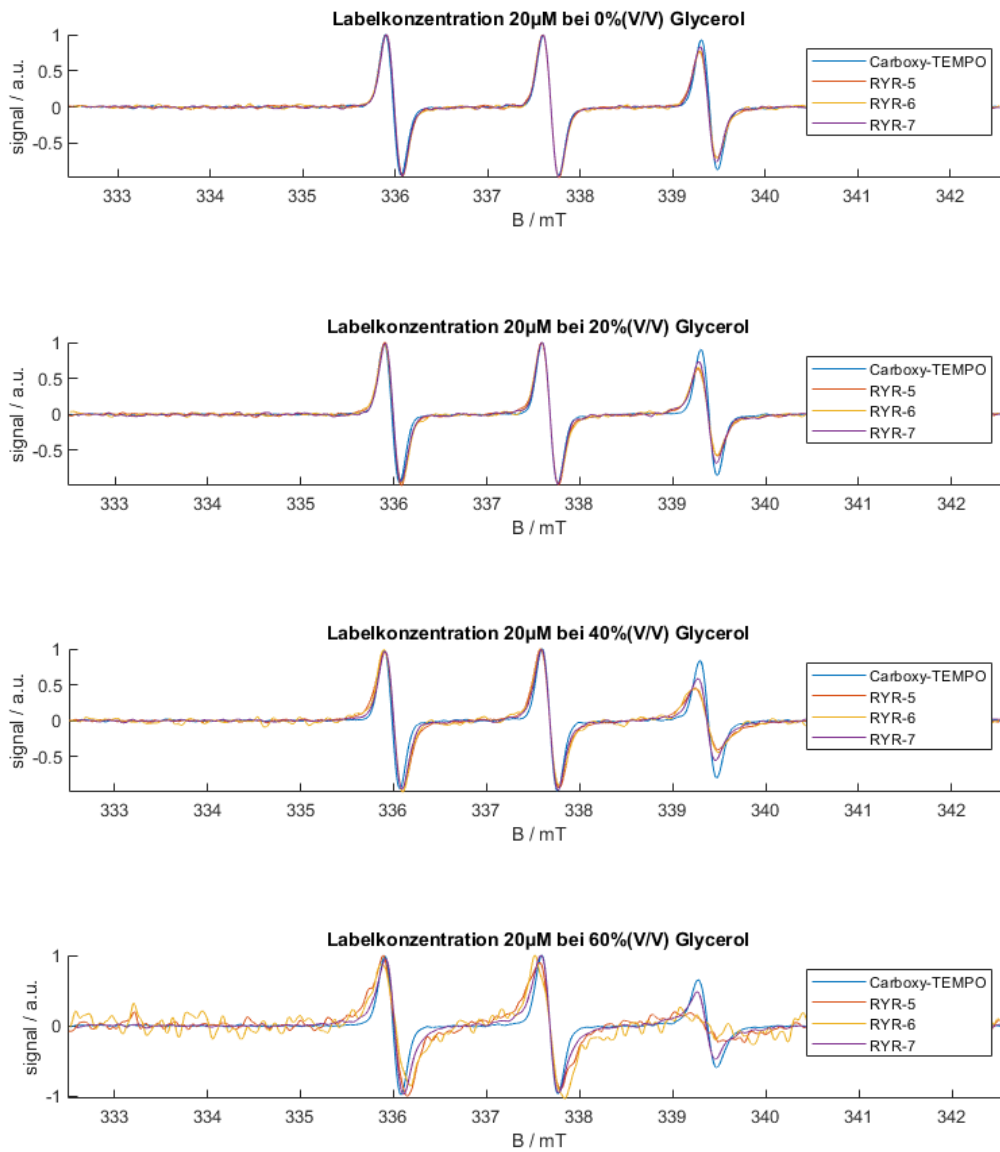


Abbildung 121 cwEPR X-Band Messung von Carboxy-TEMPO, RYR-5, RYR-6, RYR-7 bei 20 μ M Labelkonzentration in MiliQ bei variabler Glycerolkonzentration

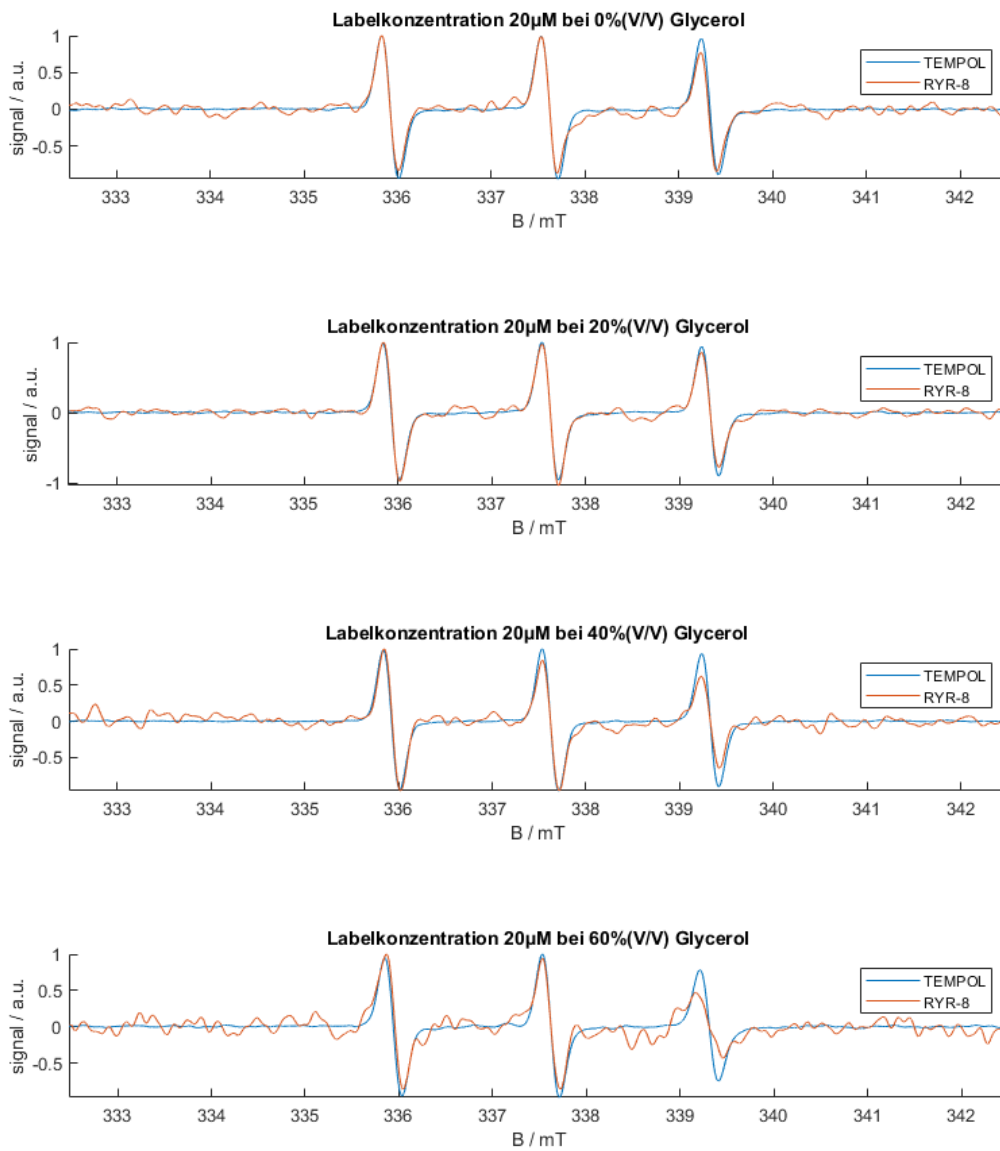


Abbildung 122 cwEPR X-Band Messung von TEMPOL, RYR-8 bei 20 μM Labelkonzentration in MilliQ bei variabler Glycerolkonzentration

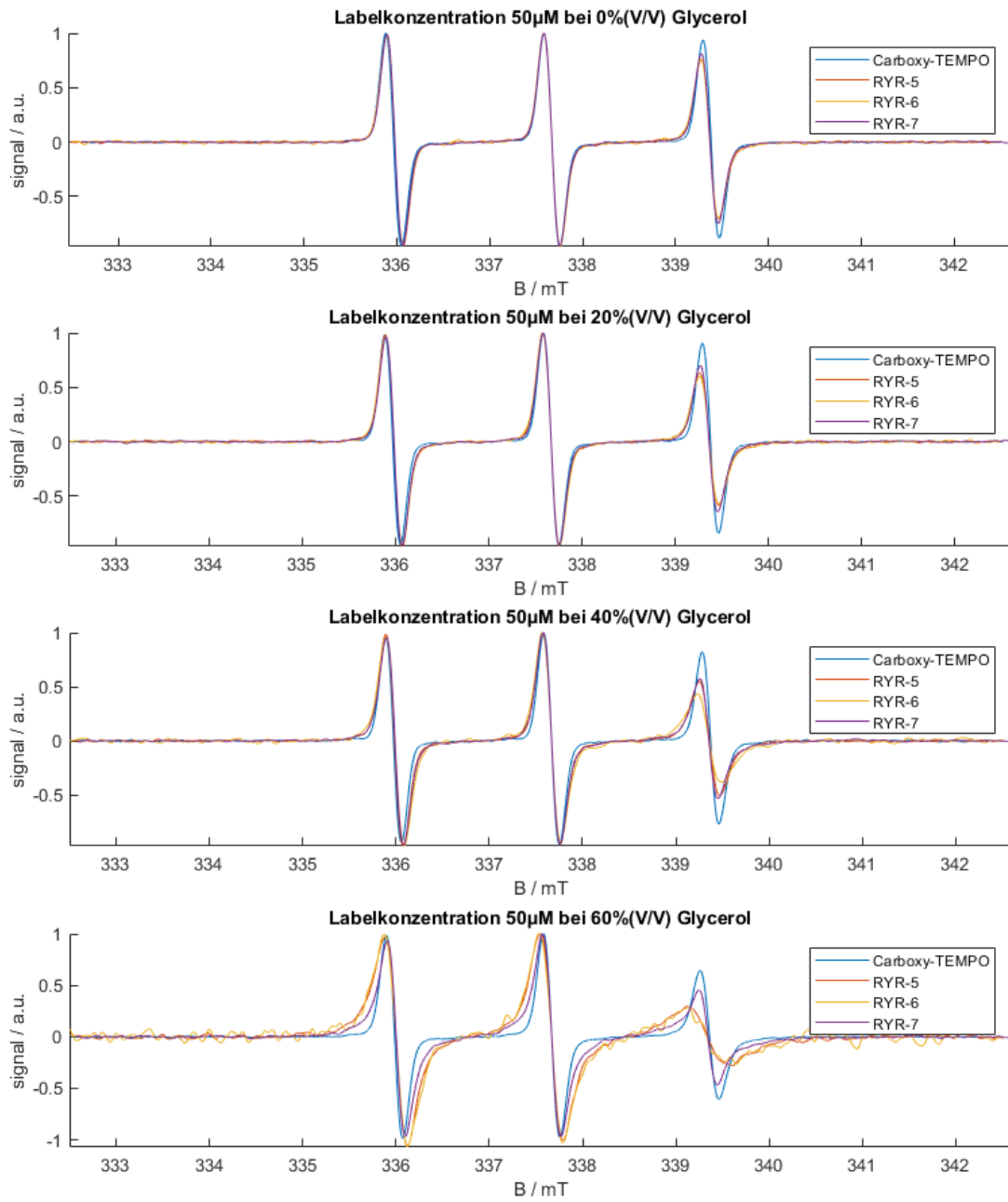


Abbildung 123 cwEPR X-Band Messung von Carboxy-TEMPO, RYR-5, RYR-6, RYR-7 bei 50 μM Labelkonzentration in MiliQ bei variabler Glycerolkonzentration

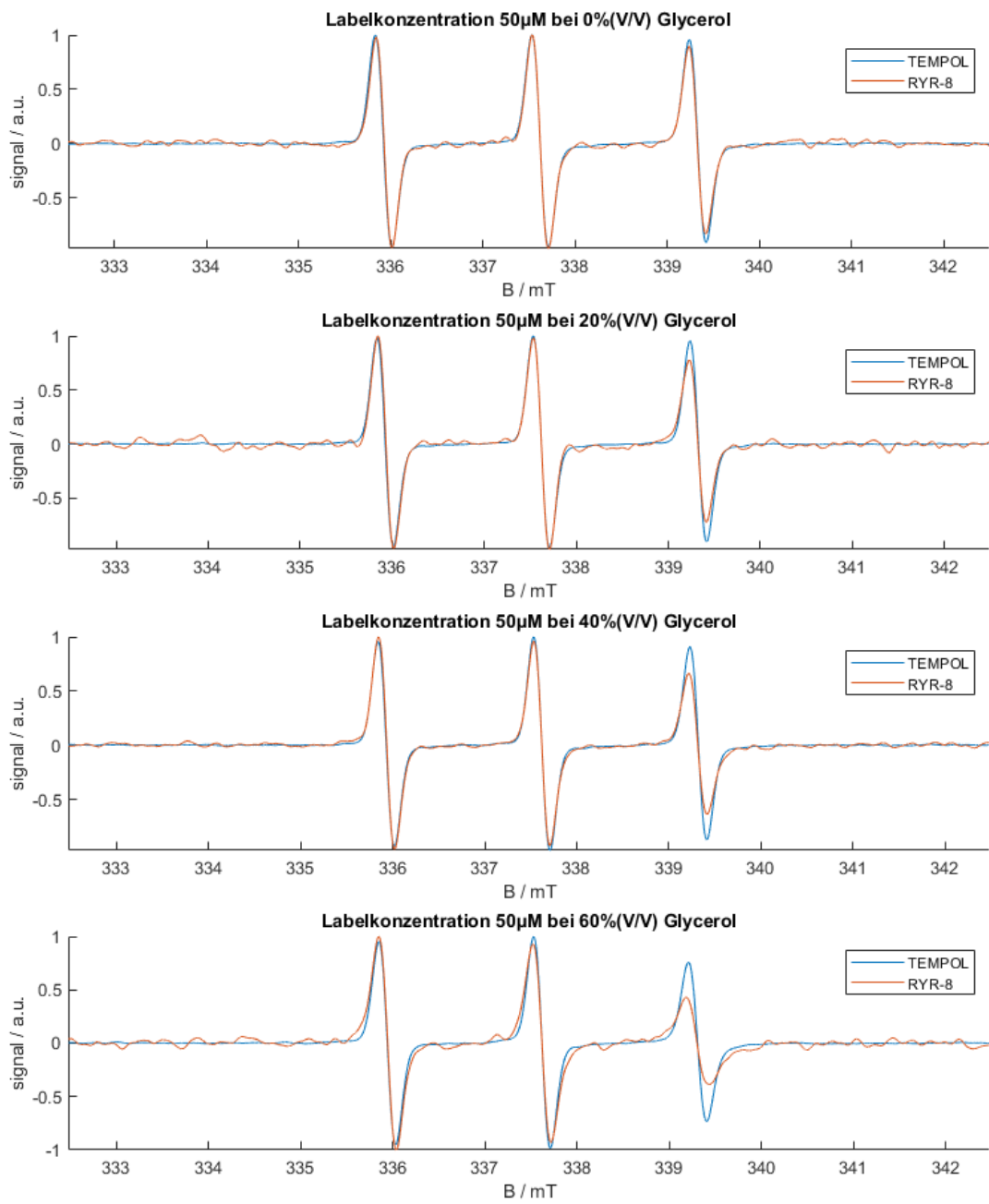


Abbildung 124 cwEPR X-Band Messung von TEMPOL, RYR-8, bei 50 μM Labelkonzentration in MiliQ bei variabler Glycerolkonzentration

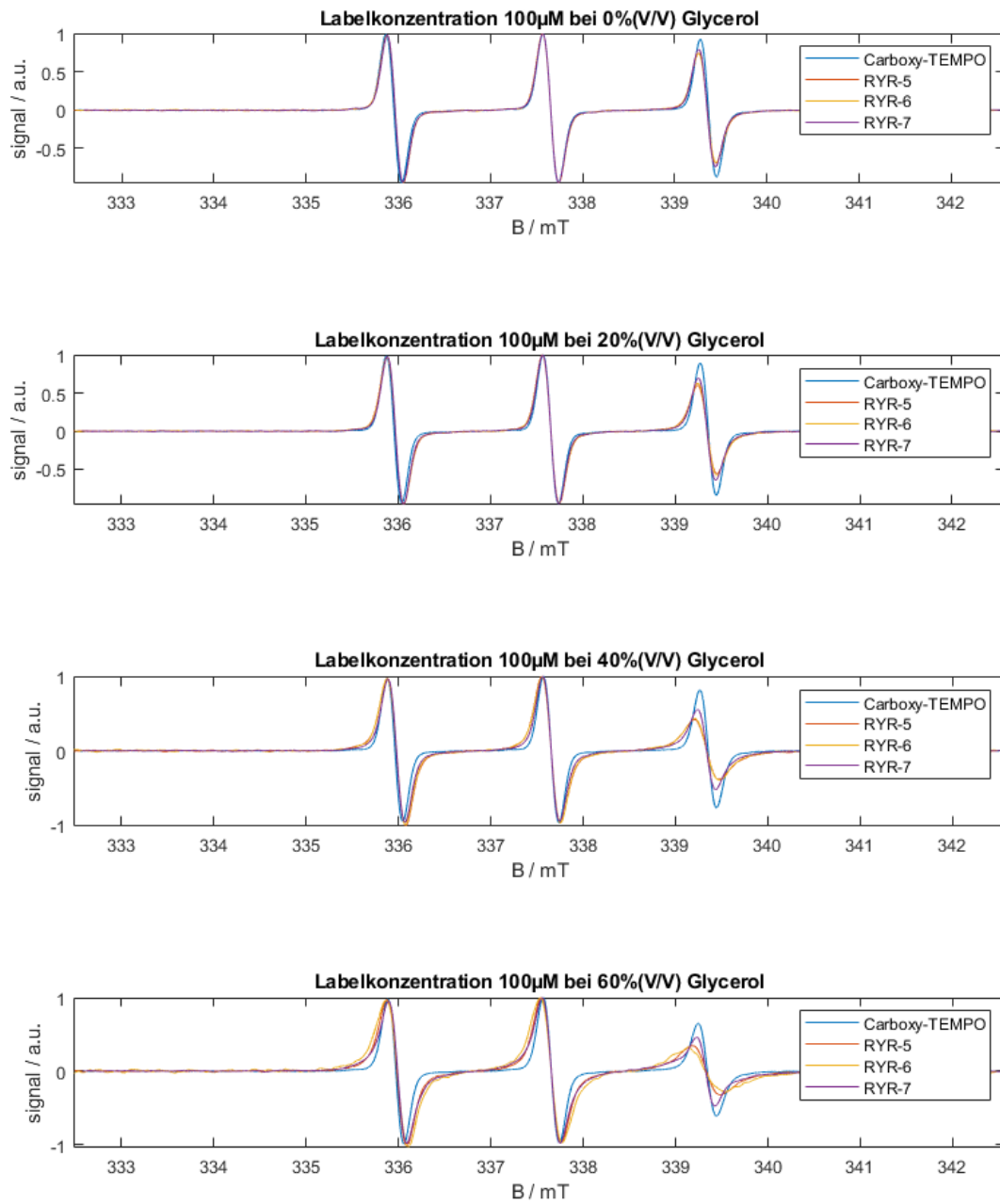


Abbildung 125 cwEPR X-Band Messung von Carboxy-TEMPO, RYR-5, RYR-6, RYR-7 bei 100 μM Labelkonzentration in MiliQ bei variabler Glycerolkonzentration

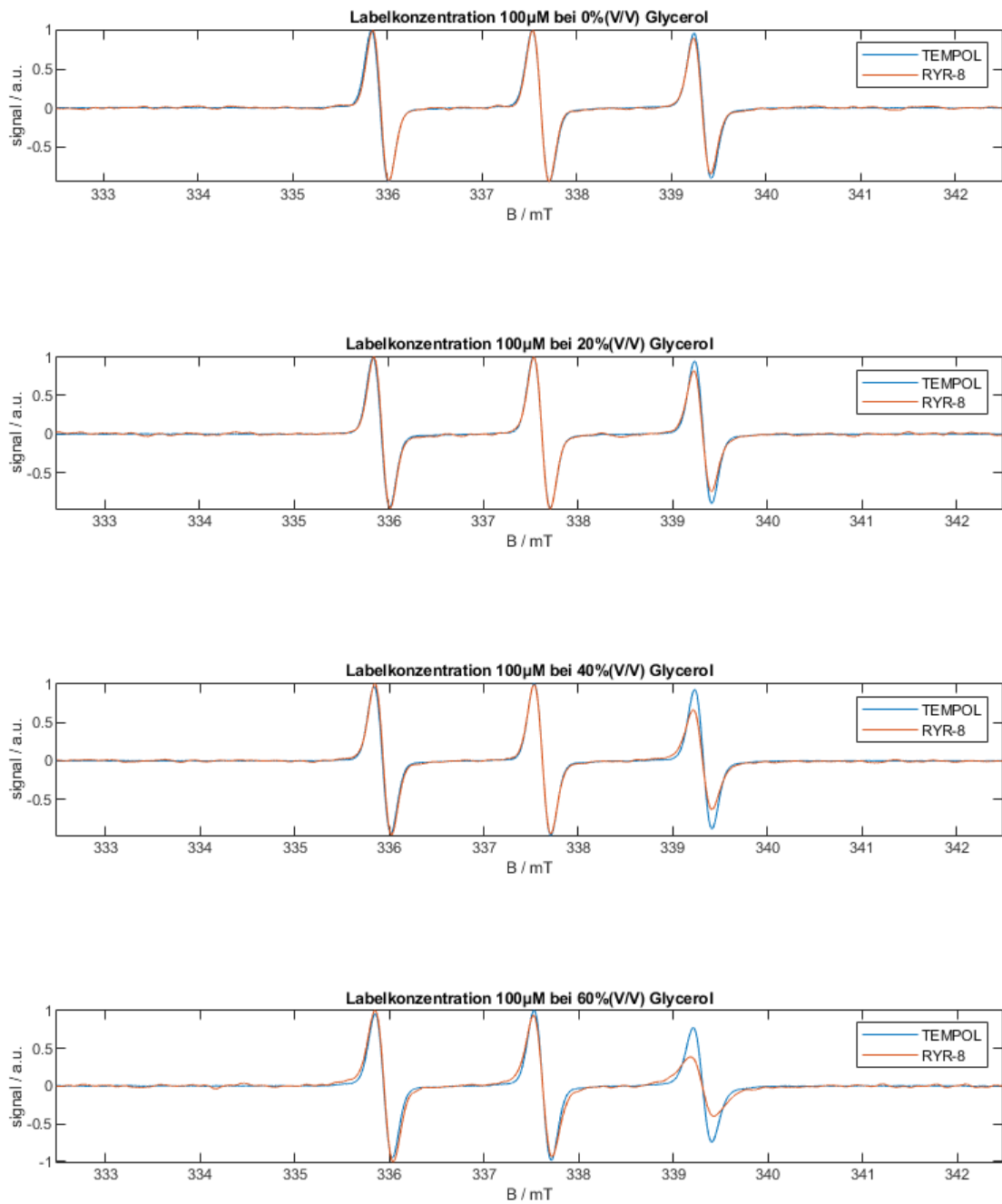


Abbildung 126 cwEPR X-Band Messung von TEMPOL, RYR-8 bei 100 μM Labelkonzentration in MiliQ bei variabler Glycerolkonzentration

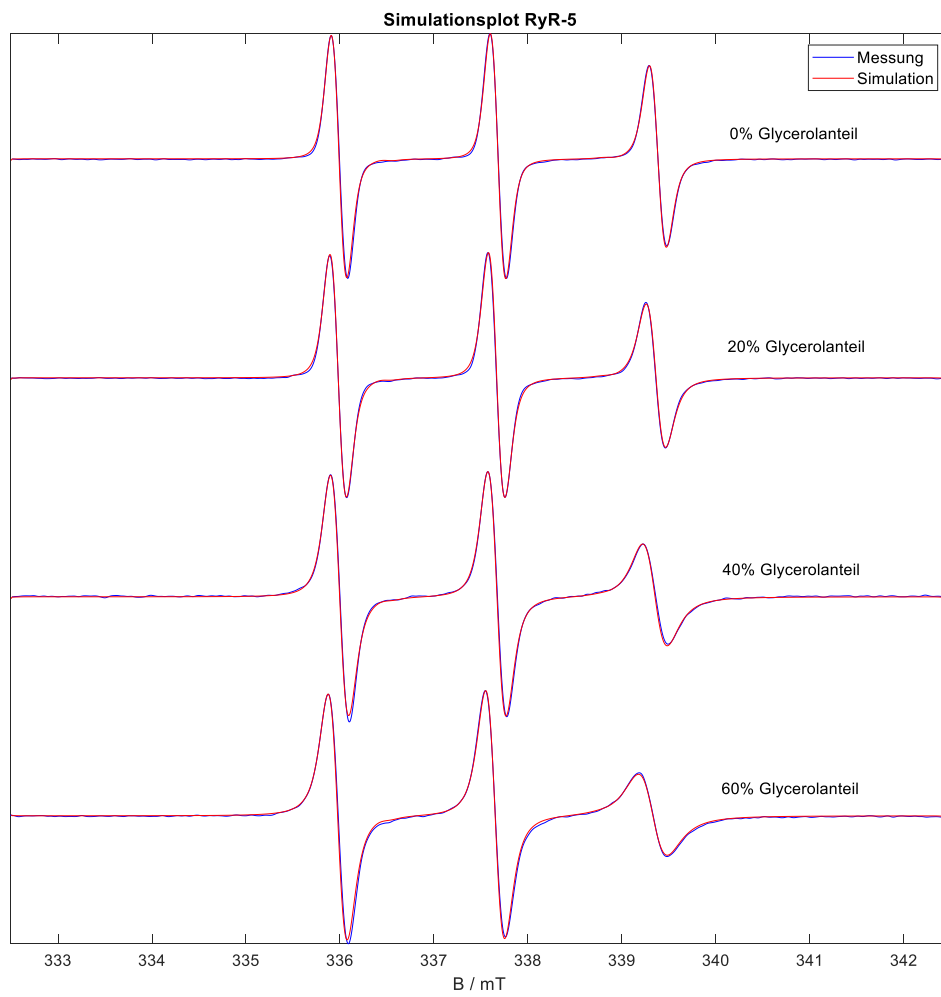


Abbildung 127 Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) cwEPR-Spektren X-Band für RYR-5 bei 100 μM und variabler Glycerolkonzentration

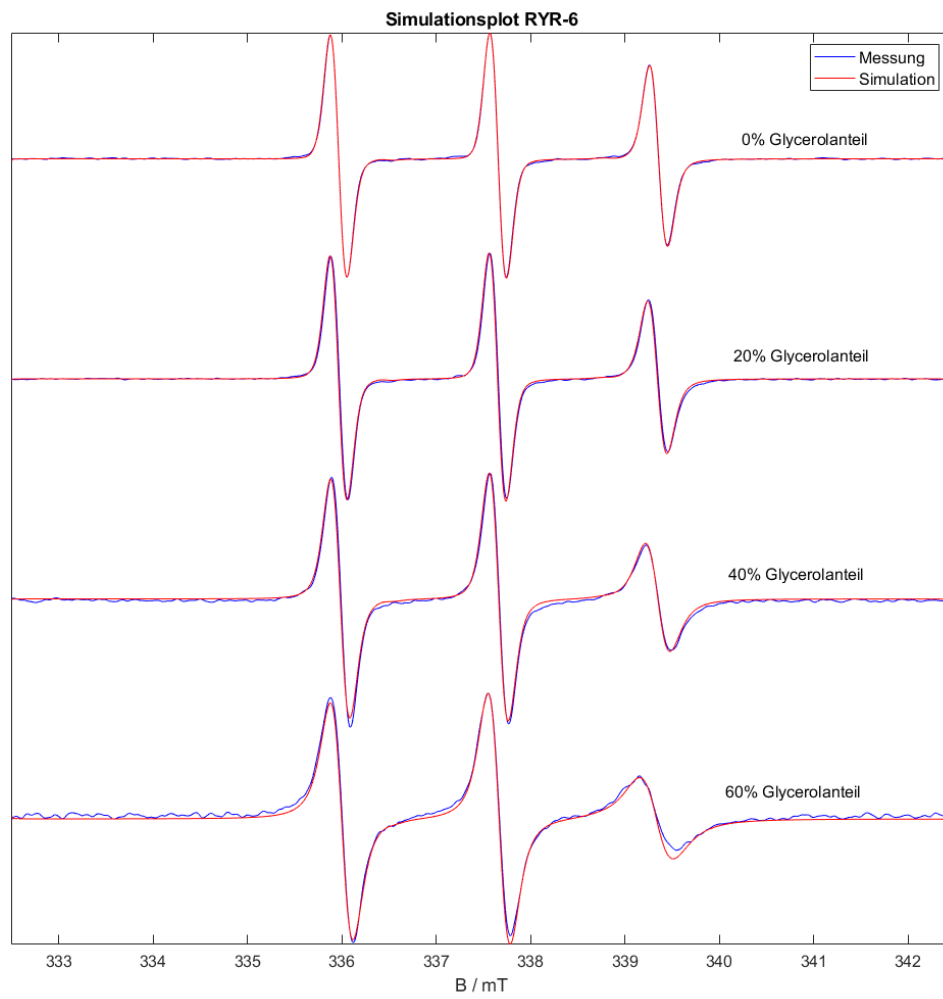


Abbildung 128 Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) cwEPR-Spektren X-Band für RYR-6 bei 100 μM und variabler Glycerolkonzentration

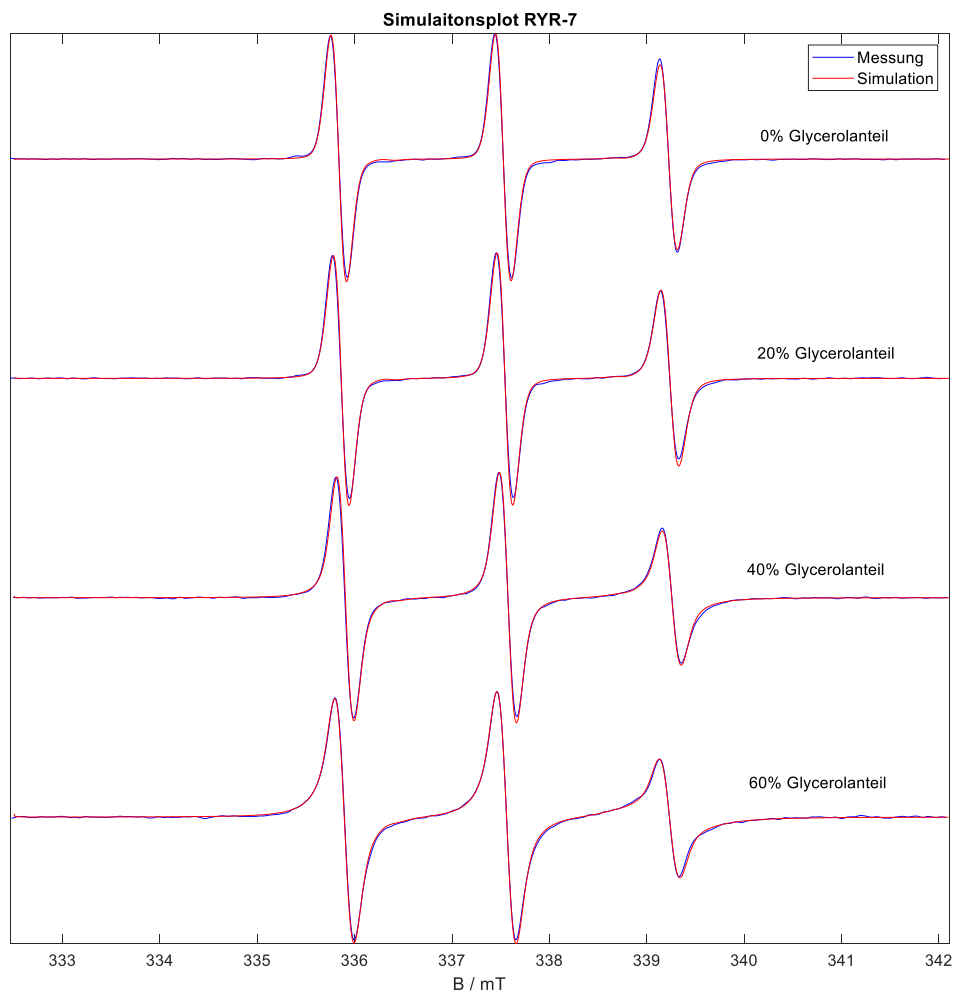


Abbildung 129 Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) cwEPR-Spektren X-Band für RYR-7 bei 100 μM und variabler Glycerolkonzentration

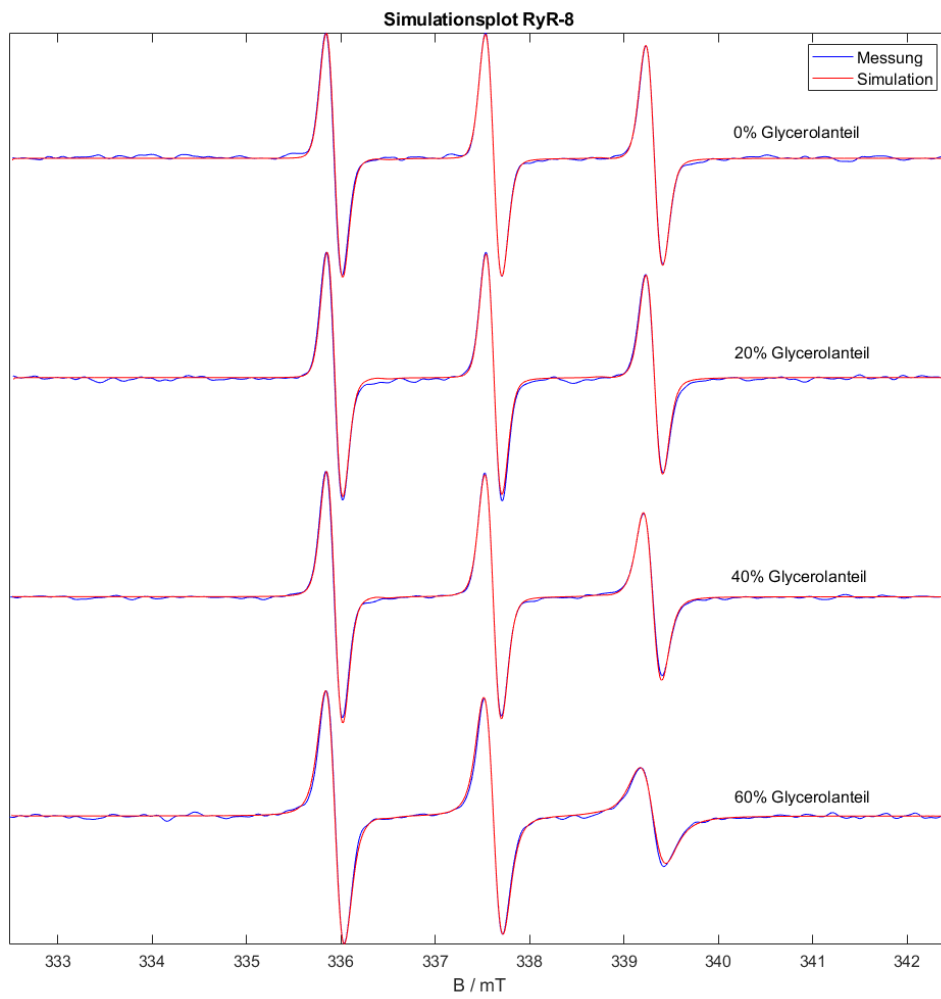


Abbildung 130 Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) cwEPR-Spektren X-Band für RYR-8 bei 100 μM und variabler Glycerolkonzentration

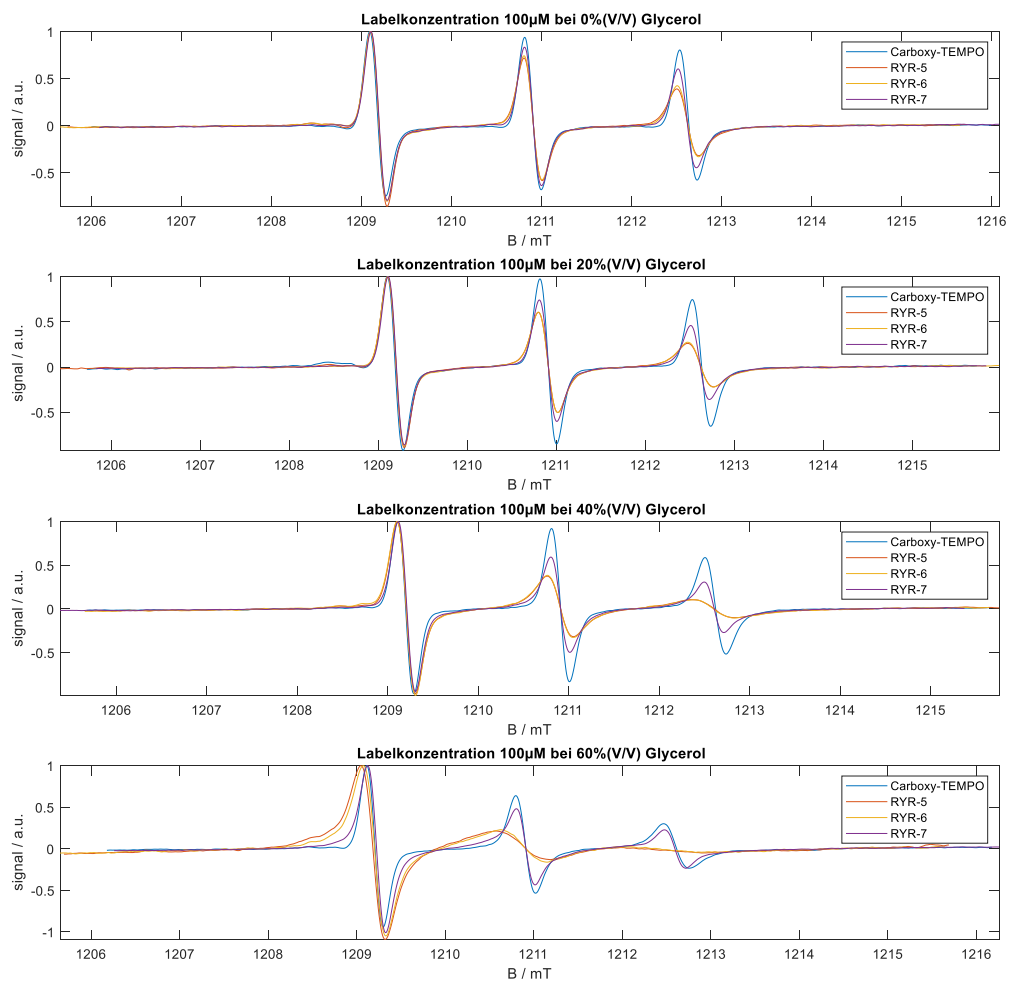


Abbildung 131 cwEPR Q-Band Messung von Carboxy-TEMPO, RYR-5, RYR-6, RYR-7 bei 100 μM Labelkonzentration in MiliQ bei variabler Glycerolkonzentration

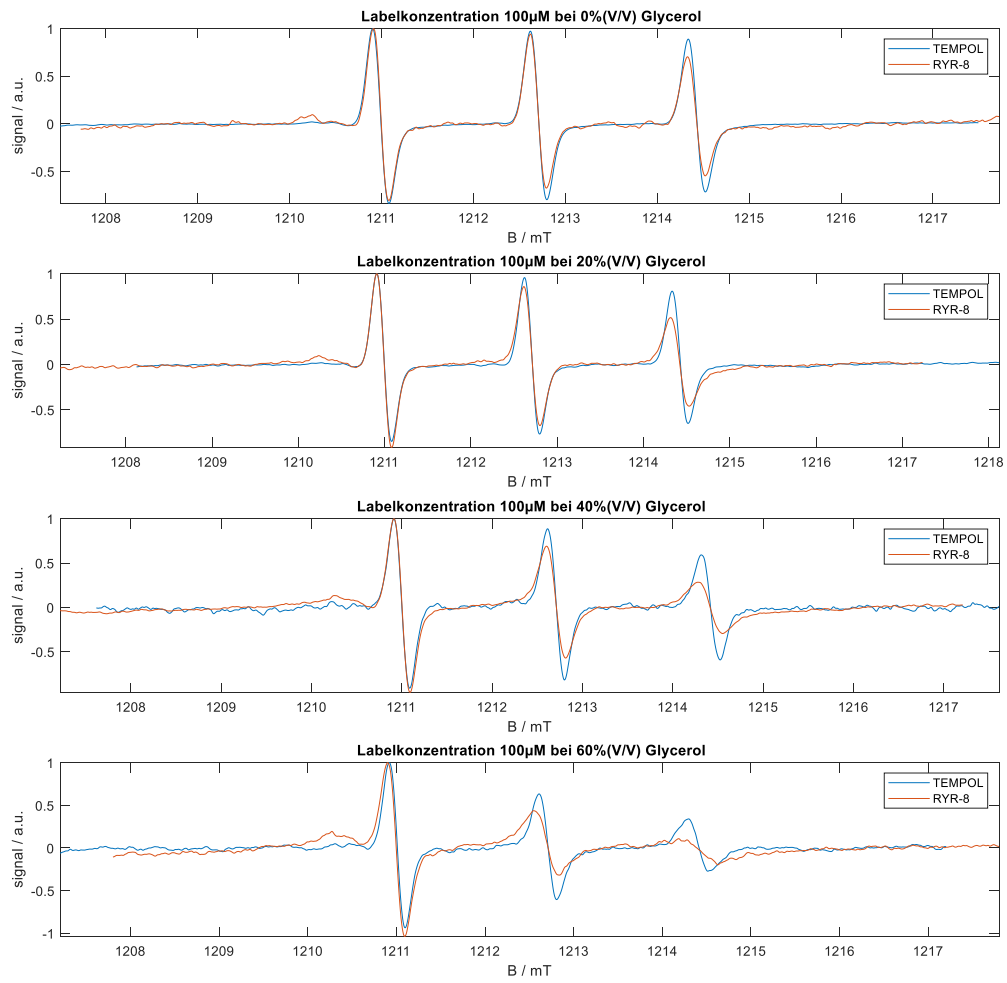


Abbildung 132 cwEPR Q-Band Messung von TEMPOL, RYR-8 bei 100 μM Labelkonzentration in MiliQ bei variabler Glycerolkonzentration

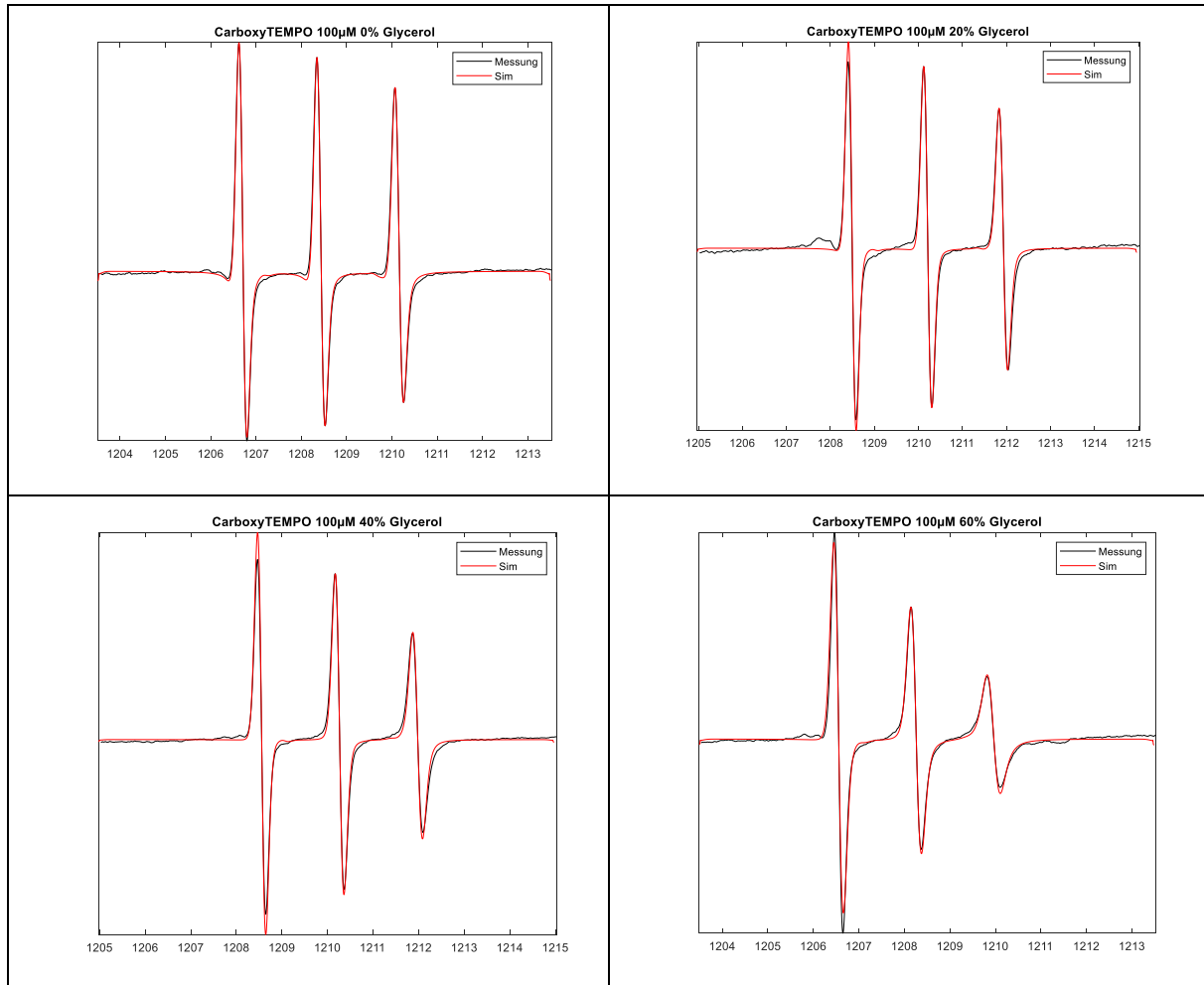


Abbildung 133 Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) cwEPR-Spektren Q-Band für Carboxy-TEMPO bei 100μM und variabler Glycerolkonzentration

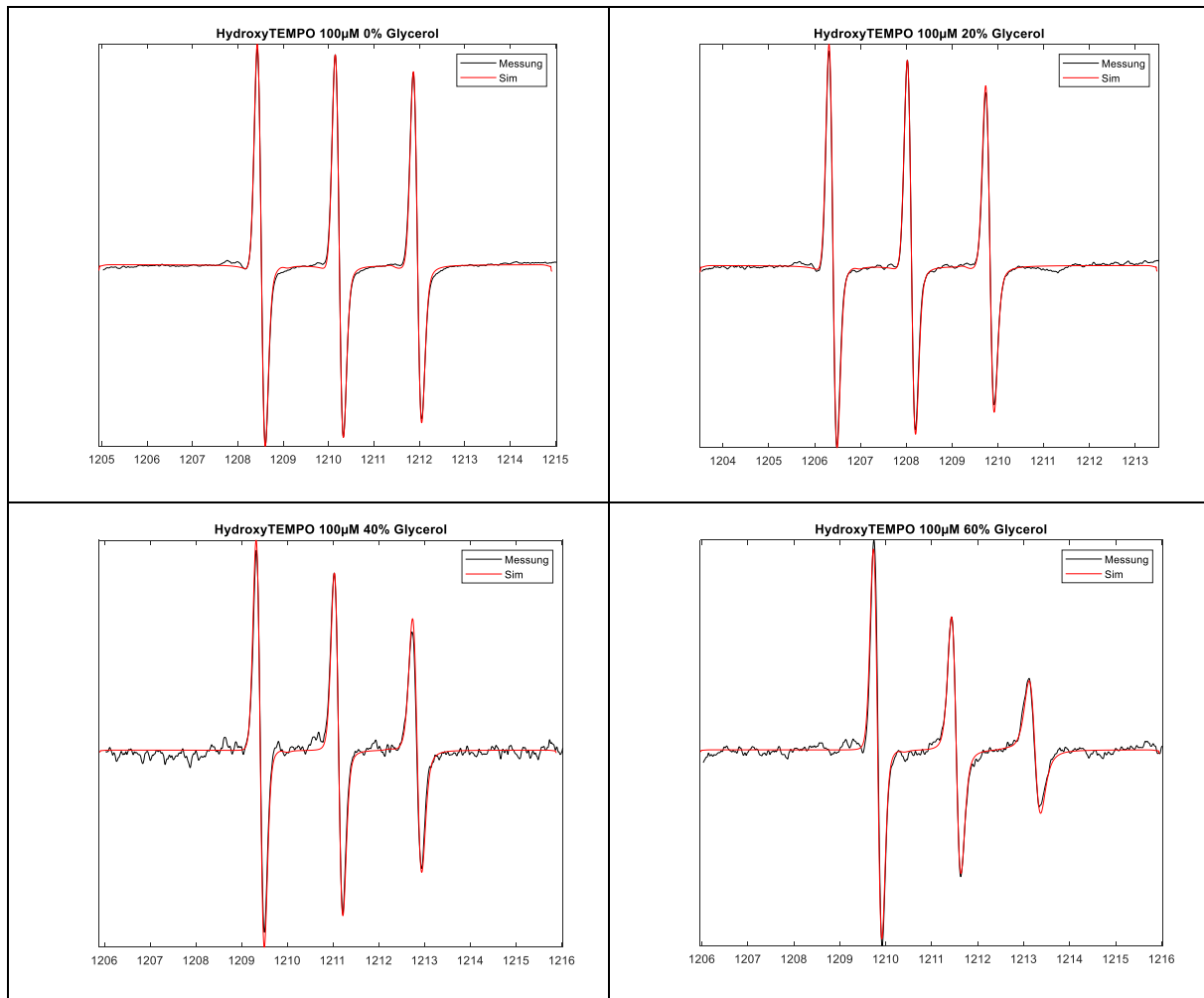


Abbildung 134 Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) cwEPR-Spektren Q-Band für TEMPOL bei 100 μ M und variabler Glycerolkonzentration

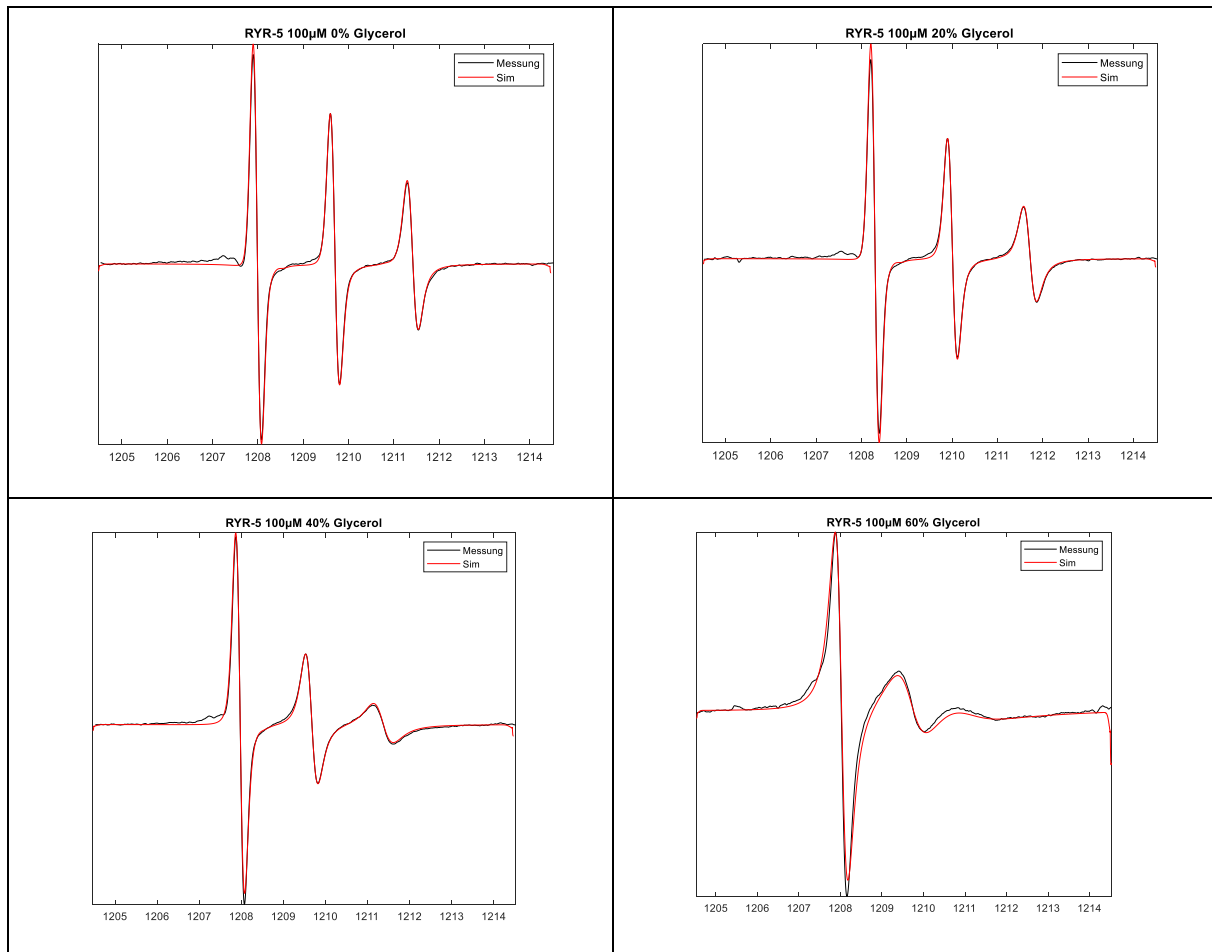


Abbildung 135 Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) cwEPR-Spektren Q-Band für RYR-5 bei 100 μM und variabler Glycerolkonzentration

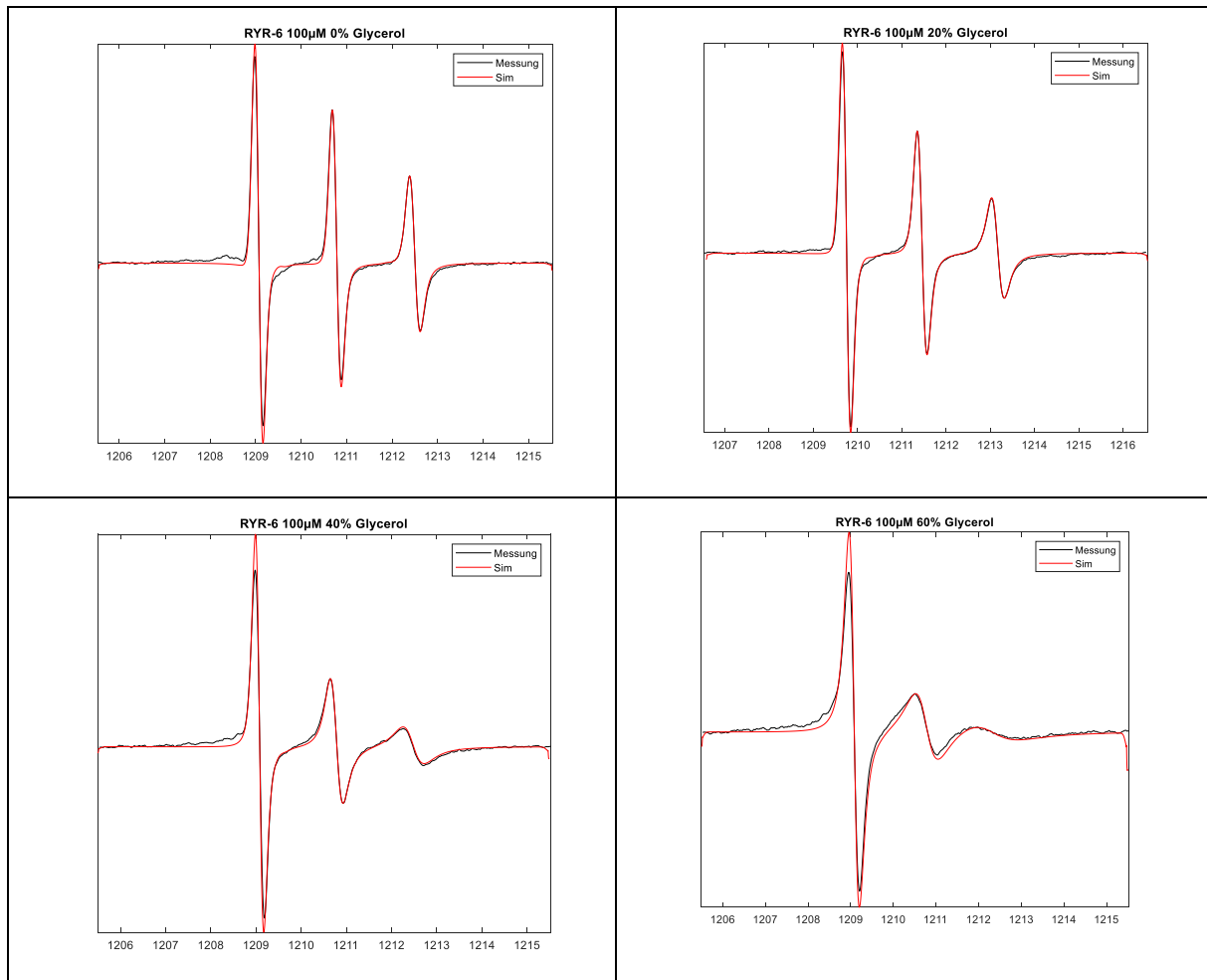


Abbildung 136 Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) cwEPR-Spektren Q-Band für RYR-6 bei 100 μM und variabler Glycerolkonzentration

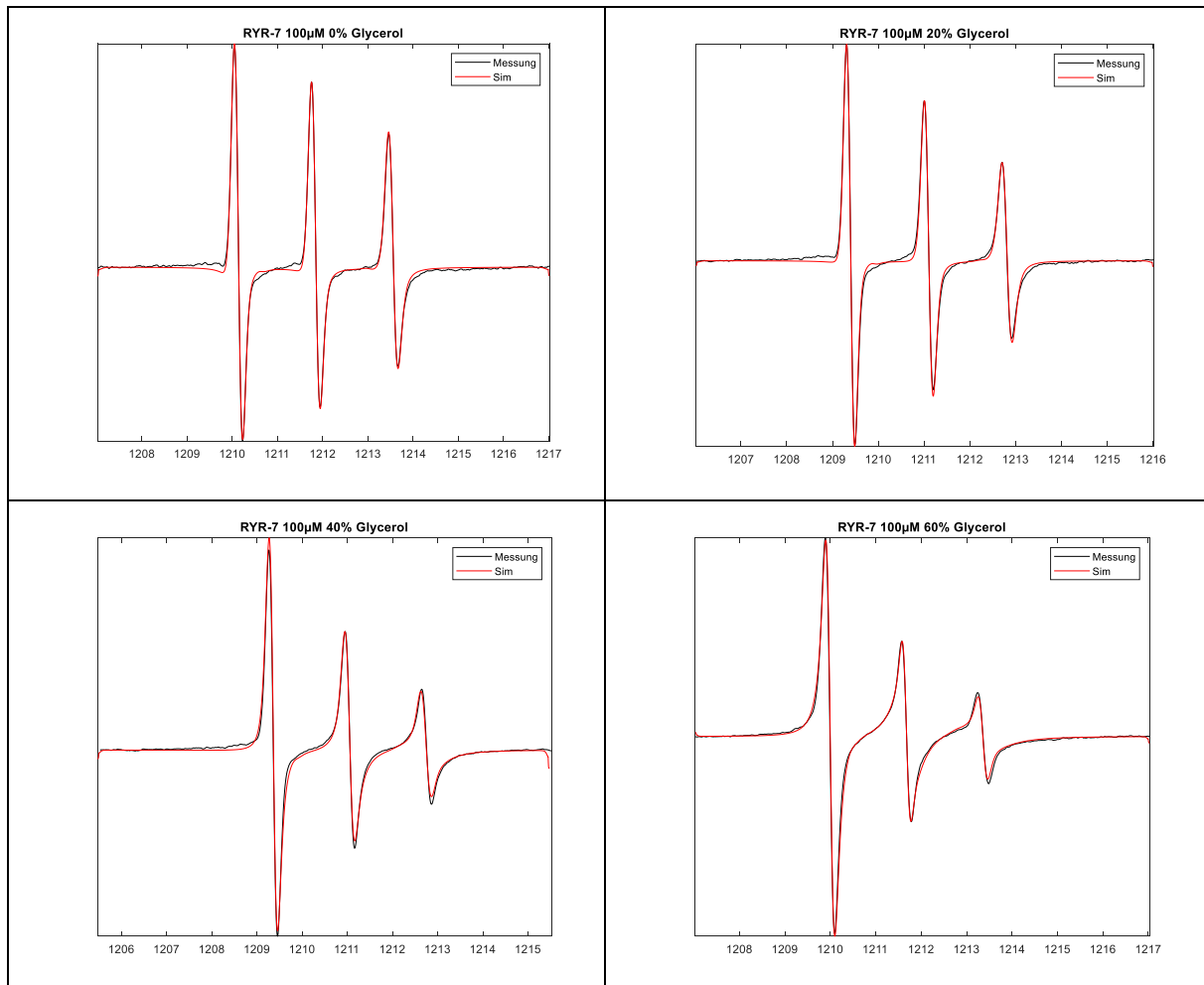


Abbildung 137 Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) cwEPR-Spektren Q-Band für RYR-7 bei 100 μM und variabler Glycerolkonzentration

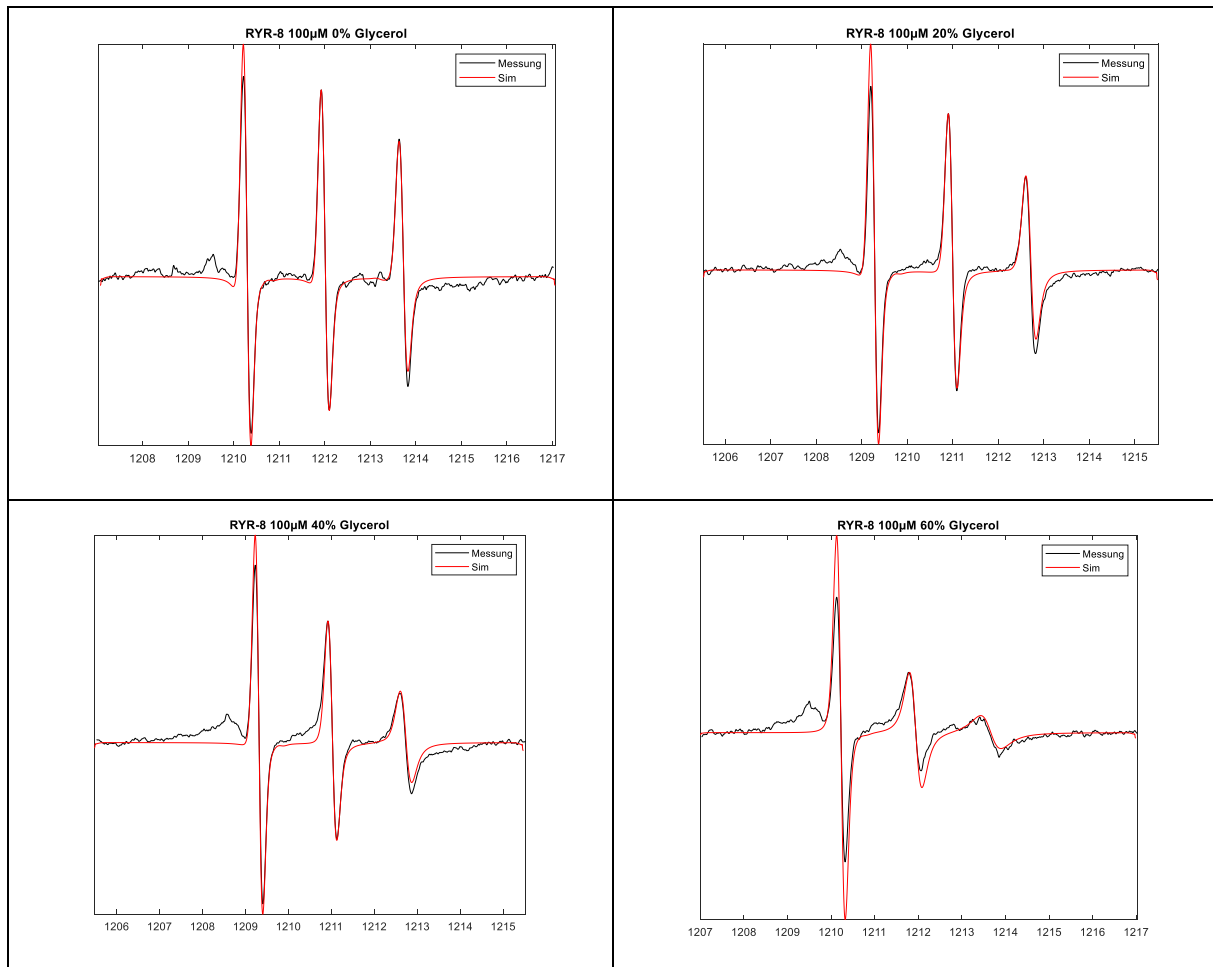


Abbildung 138 Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) cwEPR-Spektren Q-Band für RYR-8 bei 100 μM und variabler Glycerolkonzentration

Tabelle 16 cwEPR Simulationsparameter für X-Band und Q-band, g-Tensoren und a-Tensoren bei 100µM Labelkonzentration und 0% Glycerolkonzentration

	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	A_{xx} [MHz]	A_{yy} [MHz]	A_{zz} [MHz]
RYR-5 0% Gly.						
X Band	2,0085	2,0058	2,0023	21,52	16,4	105
Q Band	2,0094	2,0063	2,0026	21,12	16,4	106,8
RYR-6 0% Gly.						
X Band	2,0085	2,0058	2,0023	21,12	16,4	105,28
Q Band	2,0094	2,0062	2,0026	21,12	16,4	106,8
RYR-7 0% Gly.						
X-Band 1. Komp	2,0096	2,0062	2,0022	21,5	16,4	104,3
X-Band 2. Komp	2,0092	2,0060	2,0022	21,5	16,4	103,7
Q-Band, 0% , 20%	2,0094	2,0062	2,0022	21,12	16,4	106,6
Q-Band, 40%,60% 1. Komp	2,00938	2,0064	2,0023	21,5	16,4	104,2
Q-Band, 40%,60% 2. Komp	2,00938	2,0064	2,0023	21,5	16,4	104,9
Carboxy-TEMPO						
X Band	2,0088	2,006	2,0022	21,12	16,4	106,28
Q Band	2,009	2,0063	2,0026	21,12	16,4	107,78

Tabelle 17 cwEPR Simulationsparameter für X-Band und Q-band, g-Tensoren und a-Tensoren bei 100µM Labelkonzentration und 0% Glycerolkonzentration

	g_{xx}	g_{yy}	g_{zz}	A_{xx} [MHz]	A_{yy} [MHz]	A_{zz} [MHz]
RYR-8 0% Gly.						
X Band	2,0085	2,006	2,0022	21,5	16,4	104,5
Q Band	2,0094	2,0062	2,0023	21,12	16,4	107
TEMPOL						
X Band	2,0088	2,0058	2,003	21,5	16,4	105,6
Q Band	2,009	2,0063	2,0026	21,12	16,4	107,58

Tabelle 18 cwEPR Simulationsparameter für X-Band und Q-band, D-Tensoren und D-Tensoren in relativem Verhältnis zu einander bei 100µM Labelkonzentration und 0% Glycerolkonzentration

	Reales Verhältnis			Relatives Verhältnis			β- Euler
	D _{xx}	D _{yy}	D _{zz}	D _{xx}	D _{yy}	D _{zz}	
RYR-5 0% Gly.							
X Band	7,50E8	7,50E8	3,68E9	1	1	4,9	50°
Q Band	7,12E8	7,12E8	3,42E9	1	1	4,8	50°
RYR-6 0% Gly.							
X Band	7,20E8	7,20E8	3,52E9	1	1	4,9	50°
Q Band	7,87E8	7,87E8	3,78E9	1	1	4,8	50°
RYR-7 0% Gly.							
X-Band 1. Komp	2,7E8	2,7E9	4,05E9	1	10	15	50°
X-Band 2.Komp	1,3E8	1,3E9	1,95E9	1	10	15	50°
Q-Band, 0% , 20%	3E8	3E9	7,5E9	1	10	25	50°
Q-Band, 40%,60% 1. Komp	4,8E7	4,8E7	7,8E9	1	1	162,5	50°
Q-Band, 40%,60% 2. Komp	4,2E7	4,2E7	1,35E9	1	1	32,1	50°
Carboxy-TEMPO							
X Band	4,4E9	8,1E9	8,5E9	1	1,8	1,9	50°
Q Band	3,3E9	1,2E10	3,3E9	1	3,6	1	50°

Tabelle 19 cwEPR Simulationsparameter für X-Band und Q-band, D-Tensoren und D-Tensoren in relativem Verhältnis zu einander bei 100µM Labelkonzentration und 0% Glycerolkonzentration

	Reales Verhältnis			Relatives Verhältnis			β- Euler
	D _{xx}	D _{yy}	D _{zz}	D _{xx}	D _{yy}	D _{zz}	
RYR-8 0% Gly.							
X Band	8E9	2,5E9	2,5E9	1	0,31	0,31	0
Q Band	5,85E9	1,17E10	1,17E10	1	2	2	50
TEMPOL							
X Band	6,54E9	1,8E9	1,8E9	1	0,27	0,27	0
Q Band	8E9	8E9	2,5E10	1	1	3,125	50

Tabelle 20 cwEPR Simulationsparameter für X-Band für g_{iso} , A_{iso} , Linienbreite und τ_{uc} 100 μ M Labelkonzentration und variabler Glycerolkonzentration

	Glycerolanteil	g_{iso}	A_{iso}	Linienbreite [mT]		τ_{uc} [ps]
				Gauss	Lorenz	
RYR-5	0 %	2,00552	47.6400	0.155	0.07	130.6261
	20 %	2,0056	47.4733	0.155	0.07	253.7173
	40 %	2,0056	47.1400	0.155	0.065	503.1298
	60 %	2,00567	47.2000	0.151	0.05	715.8961

Tabelle 21 cwEPR Simulationsparameter für X-Band für g_{iso} , A_{iso} , Linienbreite und τ_{uc} 100 μ M Labelkonzentration und variabler Glycerolkonzentration

	Glycerolanteil	g_{iso}	A_{iso}	Linienbreite [mT]		τ_{uc} [ps]
				Gauss	Lorenz	
RYR-6	0	2,00553	47,60	0.19	0.015	136,16014
	20	2,0056	47,43	0.185	0.015	228,71782
	40	2,0056	47,26	0.19	0.015	472,7701
	60	2,0056	46.9733	0.18	0.05	845,14261

Tabelle 22 cwEPR Simulationsparameter für X-Band für g_{iso} , A_{iso} , Linienbreite und $\tau_{c, 100\mu M}$ Labelkonzentration und variabler Glycerolkonzentration

	Glycerolanteil [%]	spektraler Anteil [%]	g_{iso}	A_{iso}	Linienbreite [mT]		$\tau_{c, [ps]}$
					Gauss	Lorenz	
RYR-7	0	0,66	2,00598	47,4	0,19	0	116,17
		0,33	2,0058	47,2	0,1	0,1	241,29
	20	0,55	2,00597	47,2667	0,19	0,01	130,69
		0,45	2,00593	47,033	0,1	0,1	313,67
	40	0,36	2,00585	46,8	0,18	0	209,11
		0,64	2,00573	46,8	0,1	0,1	1045,59
	60	0,25	2,00585	46,6	0,19	0,011	241,29
		0,75	2,00598	46,8	0,1	0,1	1568,39

Tabelle 23 cwEPR Simulationsparameter für X-Band für g_{iso} , A_{iso} , Linienbreite und $\tau_{c, 100\mu M}$ Labelkonzentration und variabler Glycerolkonzentration

	Glycerolanteil	g_{iso}	A_{iso}	Linienbreite [mT]		$\tau_{c, [ps]}$
				Gauss	Lorenz	
RYR-8	0	2,00557	47,4667	0.19	0,03	45,24029
	20	2,0057	47,4667	0.18	0,03	82,25508
	40	2,0057	47,1333	0.18	0,03	180,96117
	60	2,0057	47,1333	0.18	0,03	565,50367

Tabelle 24 cwEPR Simulationsparameter für X-Band für g_{iso} , A_{iso} , Linienbreite und τ_{uc} 100 μ M Labelkonzentration und variabler Glycerolkonzentration

	Glycerolanteil	g_{iso}	A_{iso}	Linienbreite [mT]		τ_{uc} [ps]
				Gauss	Lorenz	
Carboxy- TEMPO	0	2,00567	47,93333	0,192	0,01	24,69087
	20	2,00568	47,77333	0,187	0,01	36,54249
	40	2,00568	47,60667	0,185	0,01	76,13019
	60	2,00573	47,36667	0,185	0,01	182,71246

Tabelle 25 cwEPR Simulationsparameter für X-Band für g_{iso} , A_{iso} , Linienbreite und τ_{uc} 100 μ M Labelkonzentration und variabler Glycerolkonzentration

	Glycerolanteil	g_{iso}	A_{iso}	Linienbreite [mT]		τ_{uc} [ps]
				Gauss	Lorenz	
TEMPOL	0	2,00587	47,83333	0,2	0,02	17,94759
	20	2,0058	47,76667	0,2	0,02	21,21079
	40	2,0058	47,63333	0,195	0,02	38,88645
	60	2,00587	47,3	0,195	0,02	122,79932

Tabelle 26 cwEPR Simulationsparameter für Q-Band für g_{iso} , A_{iso} , Linienbreite und τ_{uc} 100 μ M Labelkonzentration und variabler Glycerolkonzentration

	Glycerolanteil	g_{iso}	A_{iso}	Linienbreite [mT]		τ_{uc} [ps]
				Gauss	Lorenz	
RZR-5	0	2,0061	48,10667	0,19	0,04	138,6703
	20	2,0061	47,97333	0,19	0,025	219,56132
	40	2,0061	47,70667	0,19	0,05	487,91403
	60	2,0062	48,04	0,11	0,11	1587,19023

Tabelle 27 cwEPR Simulationsparameter für Q-Band für g_{iso} , A_{iso} , Linienbreite und τ_{uc} 100 μ M Labelkonzentration und variabler Glycerolkonzentration

	Glycerolanteil	g_{iso}	A_{iso}	Linienbreite [mT]		τ_{uc} [ps]
				Gauss	Lorenz	
RZR-6	0	2,00607	48,10667	0,19	0,02	125,46361
	20	2,00607	48,04	0,19	0,04	212,47869
	40	2,00613	47,84	0,15	0,04	572,76865
	60	2,00607	47,67333	0,12	0,04	1463,7421

Tabelle 28 cwEPR Simulationsparameter für Q-Band für g_{iso} , A_{iso} , Linienbreite und τ_{uc} 100 μ M Labelkonzentration und variabler Glycerolkonzentration

	Glycerolanteil [%]	spektraler Anteil [%]	g_{iso}	A_{iso}	Linienbreite [mT]		τ_{uc} [ps]
					Gauss	Lorenz	
RZR-7	0	1	2,00593	48,04	0,2	0,02	88,18895
	20	1	2,006	47,97333	0,19	0,02	143,0091
	40	0,275	2,006	47,6	0,19	0	636,29
		0,725	2,00599	47,838	0,1	0,06	1248,06719
	60	0,15	2,006	47,36	0,15	0	763,55
		0,85	2,00599	47,6035	0,1	0,06	1872,10079

Tabelle 29 cwEPR Simulationsparameter für Q-Band für g_{iso}, A_{iso}, Linienbreite und tau_c 100µM Labelkonzentration und variabler Glycerolkonzentration

	Glycerolanteil	g _{iso}	A _{iso}	Linienbreite [mT]		tau _c [ps]
				Gauss	Lorenz	
RZR-8	0	2,00597	48,17333	0,19	0	60,2293
	20	2,00607	48,17333	0,19	0,01	103,25023
	40	2,006	48,00667	0,19	0,01	190,1978
	60	2,00587	48,00667	0,19	0,01	361,37581

Tabelle 30 cwEPR Simulationsparameter für Q-Band für g_{iso}, A_{iso}, lw und tau_c 100µM Labelkonzentration und variabler Glycerolkonzentration

	Glycerolanteil	g _{iso}	A _{iso}	Linienbreite [mT]		tau _c [ps]
				Gauss	Lorenz	
Carboxy- TEMPO	0	2,00597	48,43333	0,197	0,01	32,84322
	20	2,006	48,2	0,2	0	54,7387
	40	2,006	48,06667	0,2	0	99,5249
	60	2,006	47,83333	0,225	0	218,95479

Tabelle 31 cwEPR Simulationsparameter für Q-Band für g_{iso}, A_{iso}, lw und tau_c 100µM Labelkonzentration und variabler Glycerolkonzentration

	Glycerolanteil	g _{iso}	A _{iso}	Linienbreite [mT]		tau _c [ps]
				Gauss	Lorenz	
TEMPOL	0	2,00597	48,36667	0,197	0,02	14,2498
	20	2,00597	48,1	0,197	0,02	23,74967
	40	2,00597	48,17333	0,197	0,02	56,9992
	60	2,00597	48,03333	0,197	0,02	149,99789

Tabelle 32 Verhältnis von Middelfield Peak gegen High Field Peak - X Band Messungen Carboxy-TEMPO gegen RYR5, RYR6, RYR7 und TEMPOL gegen RYR-8

Name	Glycerolanteil	Peakverhältnis Middel/High Field	Glycerolanteil	Peakverhältnis Middel/High Field
Carboxy-T	0%	1:0,93	40 %	1:0,82
	20 %	1:0,90	60 %	1:0,65
RYR-5	0%	1:0,75	40 %	1:0,42
	20 %	1:0,60	60 %	1:0,350,1 0,1
RyR-6	0%	1:0,75	40 %	1:0,43
	20 %	1:0,63	60 %	1:0,33
RYR-7	0%	1:0,80	40 %	1:0,56
	20 %	1:0,70	60 %	1:0,46
TEMPOL	0%	1:0,96	40 %	1:0,76
	20 %	1:0,94	60 %	1:0,76
RYR-8	0%	1:0,90	40 %	1:0,67
	20 %	1:0,82	60 %	1:0,41

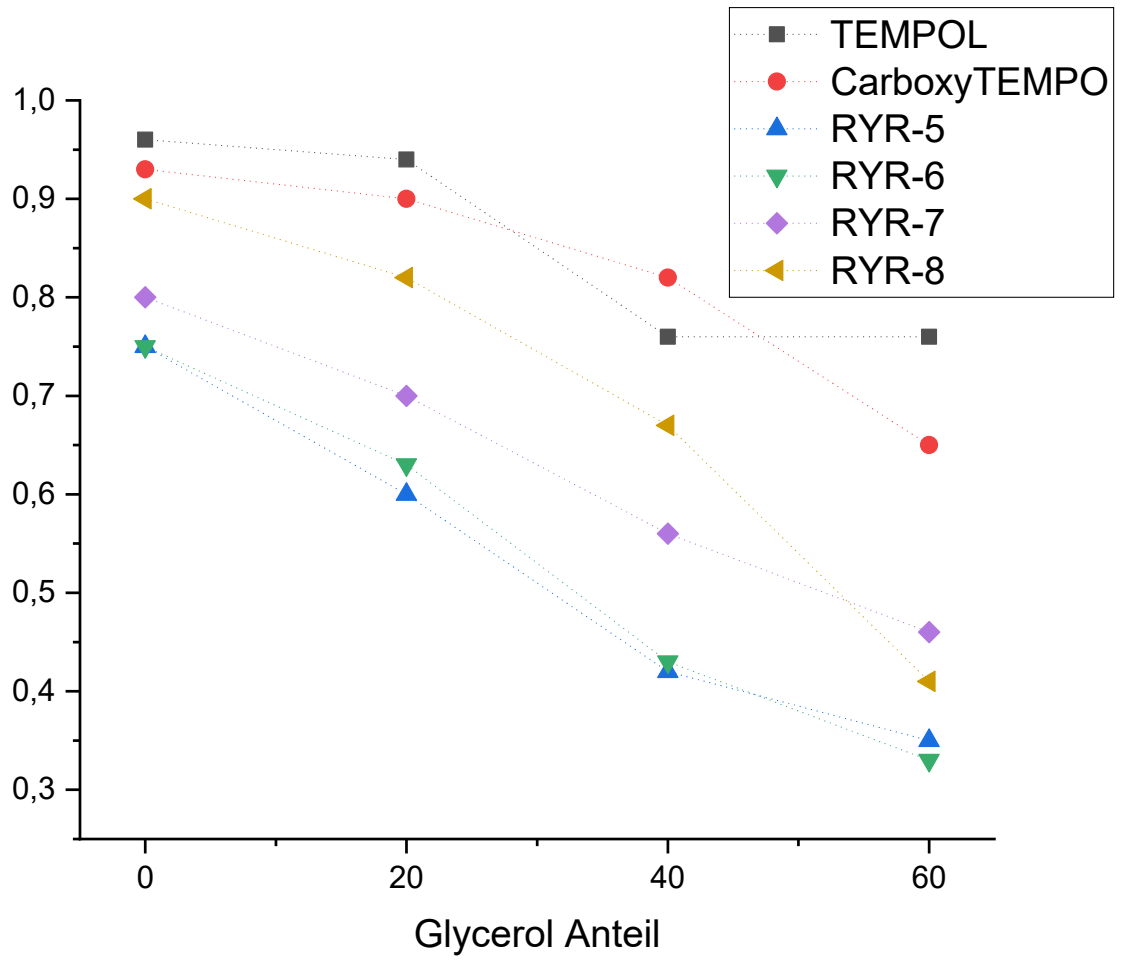


Abbildung 139 Grafische Darstellung des Verhältnis von Middelfield Peak gegen High Field Peak - X Band Messungen
Carboxy-TEMPO gegen RYR5, RYR6, RYR7 und TEMPOL gegen RYR-8

8.3. Nano Disc Anhang

Messung und Berechnung des ζ -Potenzials

Das ζ -Potential beschreibt das elektrische Potential an der Scherebene zwischen einer Schicht gebundener Ionen und dem diffusen Bereich, der aus frei diffundierenden Ionen um teilweise geladene Teilchen besteht.²¹⁵ Es korreliert mit dem elektrischen Oberflächenpotential, ist jedoch an einer anderen Stelle in der elektrischen Doppelschicht definiert. Daher verwenden wir das ζ -Potential als messbaren Ersatz für die Oberflächenladung der drei Polymere. Die Berechnung des ζ -Potenzials erfordert die Messung der elektroforetischen Mobilität μ_e sowie die Kenntnis der Lösungsmittelviskosität, der Ionenstärke und der Partikelgröße. Das ζ -Potential hängt somit von den gemessenen Partikeln und den Eigenschaften des Lösungsmittels ab und sollte daher zwischen verschiedenen Polymeren sowie bei unterschiedlicher Ionenstärke variieren. Unter einem angelegten elektrischen Feld bewegen sich geladene Teilchen aufgrund ihres ζ -Potentials. Dieses kann nicht direkt gemessen werden und wird aus der elektroforetischen Mobilität μ_e der Teilchen abgeleitet.²¹⁵ Die elektroforetische Mobilität selbst ist definiert als:

$$\mu_e = \frac{v}{E} \quad 18$$

mit v als Geschwindigkeit der geladenen Teilchen und E als elektrische Feldstärke. Durch elektroforetische Lichtstreuung (hier PALS) wird die Geschwindigkeit der beweglichen Teilchen durch die Frequenzverschiebung zwischen dem von der Probe gestreuten Licht und dem ursprünglichen Laserlicht (Dopplerverschiebung) bestimmt.

²¹⁶ Das ζ -Potential wird mit der gemessenen elektroforetischen Beweglichkeit μ_e nach der Henry-Gleichung berechnet:

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon_0\varepsilon_r\zeta F(\kappa a)}{3\eta} \quad 19$$

mit ε_0 als Vakuumpermittivität, ε_r als relative Permittivität, $F(\kappa a)$ als Henry-Funktion und η als Viskosität. Die Henry-Funktion selbst hängt von der Dicke der elektrischen Doppelschicht κ^{-1} und dem Partikelradius a ab, die wir jeweils durch den Mittelwert der gemessenen

hydrodynamischen Radien R_H für jedes Polymer ersetzt haben. Um die tatsächlichen ζ -Potentialwerte zu erhalten, haben wir die relative Permittivität und Viskosität von reinem Wasser direkt aus der Datenbank der Kalliope-Software (Anton Paar GmbH, Graz, Österreich) verwendet. Die Dicke der elektrischen Doppelschicht, auch bekannt als Debye-Länge λ_D , kann berechnet werden:

$$\lambda_D = \kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r k_B T}{2e^2 I N_A}} \quad 20$$

unter Anwendung der Elementarladung e , der Avogadro-Konstante N_A und der Ionenstärke I . Die Ionenstärke innerhalb jeder getesteten Probe hängt von der Konzentration c_i und der Ladung z_i der enthaltenen ionischen Struktureinheiten ab und kann mit

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2 \quad 21$$

Die Ionenstärke der Polymerlösungen hängt sowohl von ihrer Konzentration als auch von ihrer Monomerladung ab. Bei neutralem pH-Wert ist die Maleinsäure in SMA und DIBMA monoanionisch, daher wurde die Ionenstärke in diesen Proben entsprechend ihrem Polymerisationsgrad (siehe Tabelle 9) mit 80 mM und 74 mM in Wasser (für eine 10 mM SMA-Lösung bzw. eine 2 mM DIBMA-Lösung) geschätzt, während I in Salzpuffer auf 300 mM geschätzt wurde. In der SMA-SB-Lösungen wurde für eine Polymerkonzentration von 3,6 mM auf 30 mM geschätzt.

Für die Henry-Funktion $F(\kappa a)$ verwendeten wir den von Swan und Furst eingeführten approximativen mathematischen Ausdruck.²¹⁷

$$F(\kappa a) = \frac{16 + 18\kappa a + 3(\kappa a)^2}{16 + 18\kappa a + 2(\kappa a)^2} \quad 22$$

Die ermittelten Werte für die Ionenstärke und die Henry-Funktion, die zur Übertragung der gemessenen elektrophoretischen Mobilität in das endgültige ζ -Potential verwendet wurden, sind in Tabelle 33 aufgeführt.

Tabelle 33 Gemessene Parameter zur Bestimmung des ζ -Potenzials.

Polymer	R_H^a / nm	l / mM	$F(\kappa a)$	μ_e^b / ($\mu\text{m} \cdot \text{cm} / \text{V} \cdot \text{s}$)	ζ / mV
Polymere gelöst in Wasser					
SMA	0.6	80	1.01	-2.49	-52.0
DIBMA	235.0	74	1.49	-2.54	-36.3
SMA-SB ^c	1.7	30	1.02	1.03	21.3
Polymere gelöst in wässrigem TRIS-Puffer (50 mM TRIS, 300 mM NaCl)					
SMA	2.2	300	1.13	-1.29	-24.0
DIBMA	3.7	300	1.20	-0.78	-13.8
SMA-SB	3.1	300	1.17	-0.61	-11.0

^a berechnet als gewichteter Durchschnitt aus allen Größen, die in der Massengewichteten Größenverteilung vorkommen

^b Durchschnittswerte von drei Messungen derselben Probe

^c SMA-SB in Wasser wurde bei 50 °C über seinem UCST (46 °C) gemessen.

Spektrale Simulationen von CW-EPR-Spektren bei X- und Q-Band-Frequenzen

Die spektralen Simulationen aller gemessenen CW-EPR-Spektren basieren auf einem selbst geschriebenen MatLab-Skript unter Verwendung der Toolbox EasySpin (v. 5.2.25) von Stoll und Schweiger.²¹⁸ Wir haben die Simulationsfunktion „chili“ angewendet, die die Schneider-Freed-Theorie zur Lösung der Schrödinger-Gleichung für langsam taumelnde Nitroxide nutzt, um die gemessenen Spektren nachzubilden.²¹⁹ Die jeweiligen Simulationsparameter wurden durch einen iterativen manuellen Vorgang angepasst, um die beste Übereinstimmung zwischen Messung und Simulation zu erzielen. Beachten Sie, dass die Qualität der Anpassung durch Berechnung der quadratischen Mittelwertabweichung (RMSD) für die Differenzspektren kontrolliert werden kann, wie in Jeschke¹⁸⁵ gezeigt.

Zu Beginn der Simulation wurden wir die folgenden Literaturwerte für (i) die verschiedenen TEMPO Spezies²²⁰ und, (ii), Fremy's Salz²²¹ verwendet.:

TEMPO:

$$g_{xx} = 2.0093, g_{yy} = 2.0062, g_{zz} = 2.0025$$

$$A_{xx} = 8 \text{ G}, A_{yy} = 6 \text{ G}, A_{zz} = 37.3 \text{ G}$$

Fremy's Salz:

$$g_{xx} = 2.0086, g_{yy} = 2.0064, g_{zz} = 2.0029$$

$$A_{xx} = 5.3 \text{ G}, A_{yy} = 5.5 \text{ G}, A_{zz} = 28.3 \text{ G}$$

Die diskutierten Informationen zur Linienbreite korrelieren mit dem isotropen Verbreiterungsmodell, das im EasySpin-Programmpaket implementiert ist. Beachten Sie, dass diese Methode kein physikalisches Modell zugrunde legt, das die Linienverbreiterung verursacht.

Darüber hinaus mussten die Eulerwinkel α , β , γ in die Simulationsroutine implementiert werden, um die Ausrichtung des Diffusionstensors im molekularen Koordinatensystem der Nitroxidradikale zu beschreiben:

TEMPO:

$$\alpha = 0^\circ, \beta = 50^\circ, \gamma = 0^\circ$$

Fremy's Salz:

$$\alpha = 65^\circ, \beta = 90^\circ, \gamma = 15^\circ$$

Wenn die Simulation der CW-EPR-Spektren mit mehr als einer Spezies durchgeführt wurde, haben wir ihnen einen Spektralanteilsfaktor f zugewiesen, um das Gesamtspektrum S_{total} durch Addition der so gewichteten einzelnen Komponentenspektren s_1 und s_2 zu erhalten.

$$S_{\text{total}} = f_1 s_1 + f_2 s_2 = f s_1 + (1 - f) s_2$$

dynamische Lichtstreuung

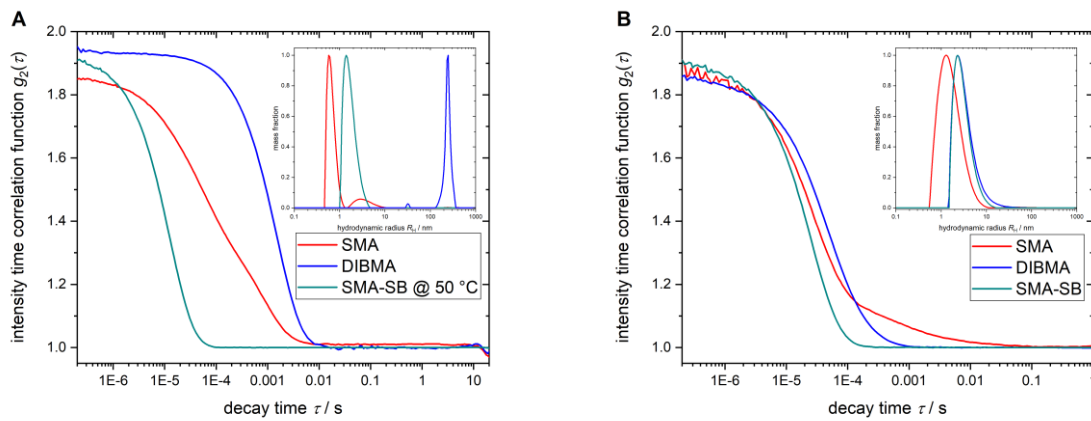


Abbildung 140 Dynamische Lichtstreuungsergebnisse aller Polymere in (A) Wasser und (B) salzhaltigem Tris-Puffer (50 mM Puffersalz und 300 mM NaCl). Dargestellt sind die Intensitäts-Zeit-Korrelationsfunktionen mit den jeweiligen massengewichteten Größenverteilungsfunktionen. Alle Messungen wurden bei 20 °C durchgeführt, mit Ausnahme von SMA-SB in Wasser, das oberhalb seiner UCST bei 50 °C gemessen wurde, um nur vollständig gelöstes Polymer zu beobachten.

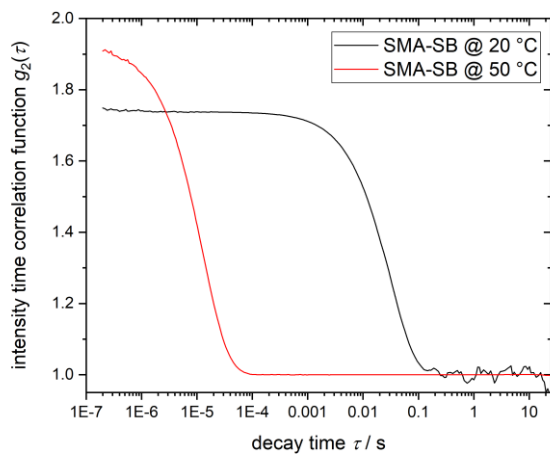


Abbildung 141 Intensitäts-Zeit-Korrelationsfunktion von SMA-SB unterhalb (schwarz) und oberhalb (rot) seiner UCST.

Continuous Wave Electron Paramagnetic Spectroscopy (cwEPR)

Interaktionsmuster bei X- und Q-Band-Frequenzen

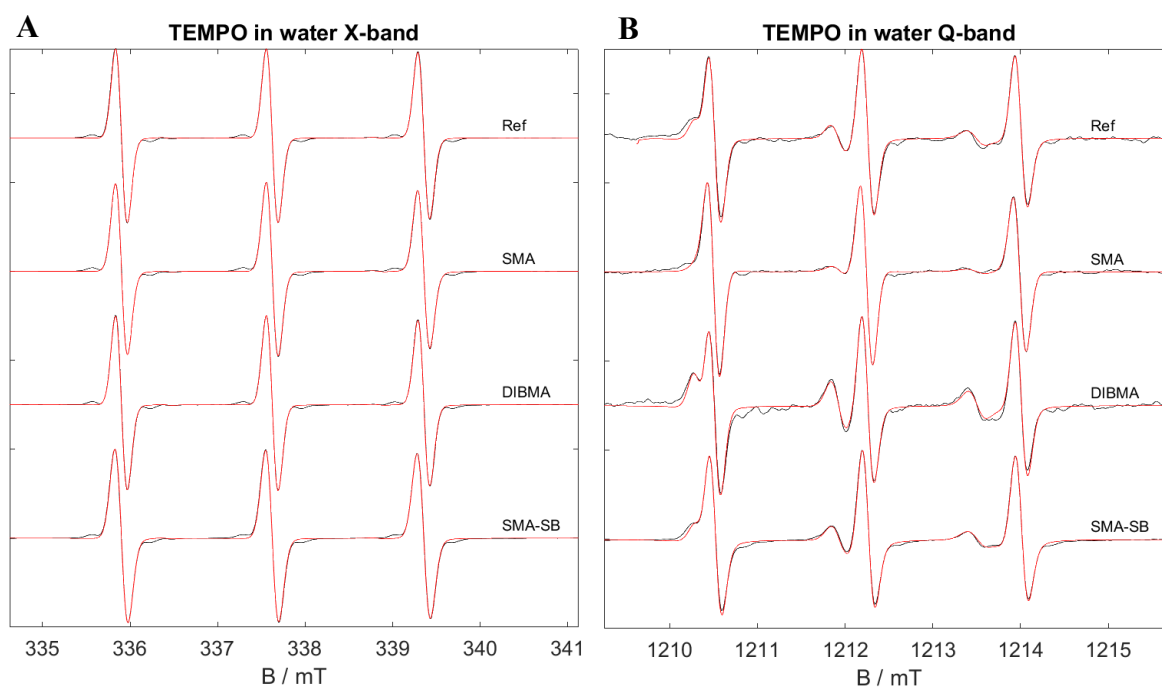


Abbildung 142 Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) cwEPR-Spektren bei (A) X-Band- und (B) Q-Band-Frequenzen für Spin-Sonde-TEMPO in Wasser.

Tabelle 34 Zusammenfassung der Simulationsergebnisse für Spin-Probe-TEMPO in Kombination mit den jeweiligen freien Polymeren SMA, DIBMA und SMA-SB in Wasser.

System	Band	$f / \%$	g_{iso}	$a_{\text{iso}} / \text{MHz}$	lw / mT	τ_c / ps
TEMPO	X	100	2.00587	48.49	0.155	11.67
	Q	76	2.00590	49.07	0.160	15.68
		24	2.00647	43.83	0.180	131.74
SMA + TEMPO	X	100	2.00555	48.48	0.156	34.13
	Q	88	2.00609	49.03	0.158	26.64
		12	2.00660	43.83	0.180	167.79
DIBMA + TEMPO	X	100	2.00593	48.51	0.155	14.63
	Q	65	2.00586	49.10	0.158	16.16
		35	2.00642	44.27	0.180	115.56
SMA-SB + TEMPO	X	100	2.00592	48.48	0.172	23.68
	Q	70	2.00571	49.02	0.165	17.21
		30	2.00627	44.00	0.230	131.74

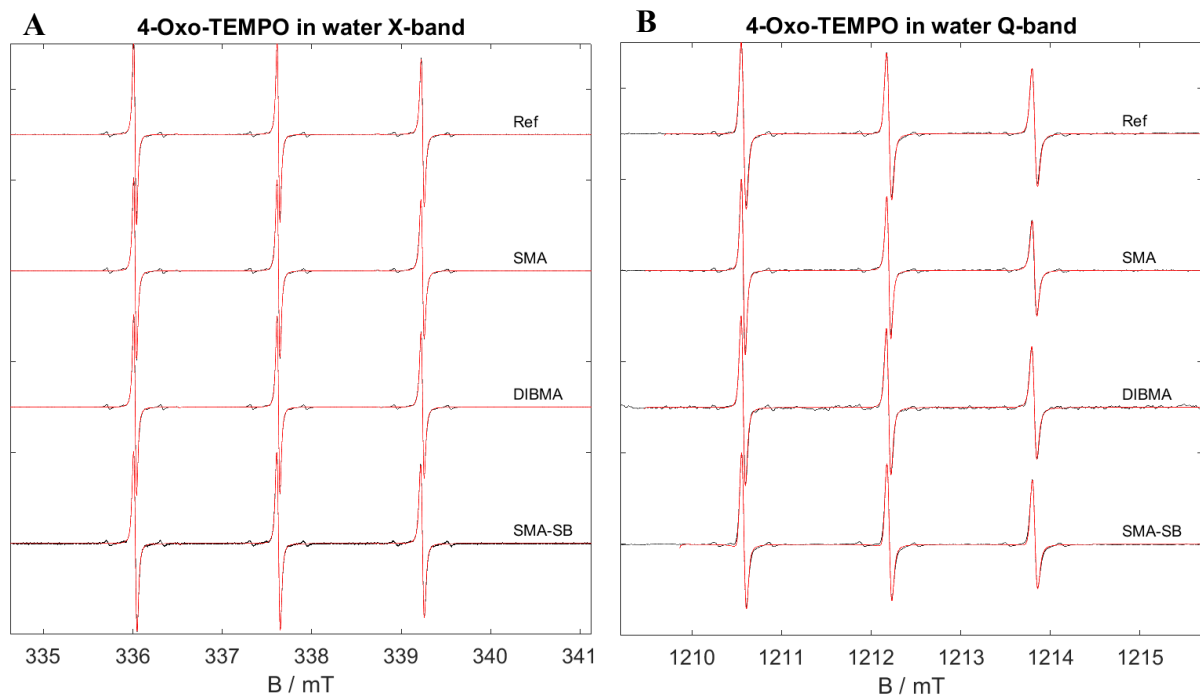


Abbildung 143 Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) cwEPR-Spektren bei (A) X-Band- und (B) Q-Band-Frequenzen für die Spinprobe 4-Oxo-TEMPO in Wasser.

Tabelle 35 Zusammenfassung der Simulationsergebnisse für die Spinprobe 4-Oxo-TEMPO in Kombination mit den jeweiligen freien Polymeren SMA, DIBMA und SMA-SB in Wasser.

System	Band	$f / \%$	g_{iso}	$a_{\text{iso}} / \text{MHz}$	lw / mT	τ_c / ps
4-Oxo-TEMPO	X	100	2.00594	45.16	0.049	17.65
	Q	100	2.00588	45.60	0.082	15.58
SMA + 4-Oxo- TEMPO	X	100	2.00552	45.13	0.050	24.79
	Q	100	2.00599	45.62	0.065	29.52
DIBMA + 4- Oxo-TEMPO	X	100	2.00594	45.13	0.050	19.26
	Q	100	2.00587	45.60	0.075	19.49
SMA-SB + 4- Oxo-TEMPO	X	100	2.00592	45.08	0.058	18.19
	Q	100	2.00573	45.58	0.071	17.26

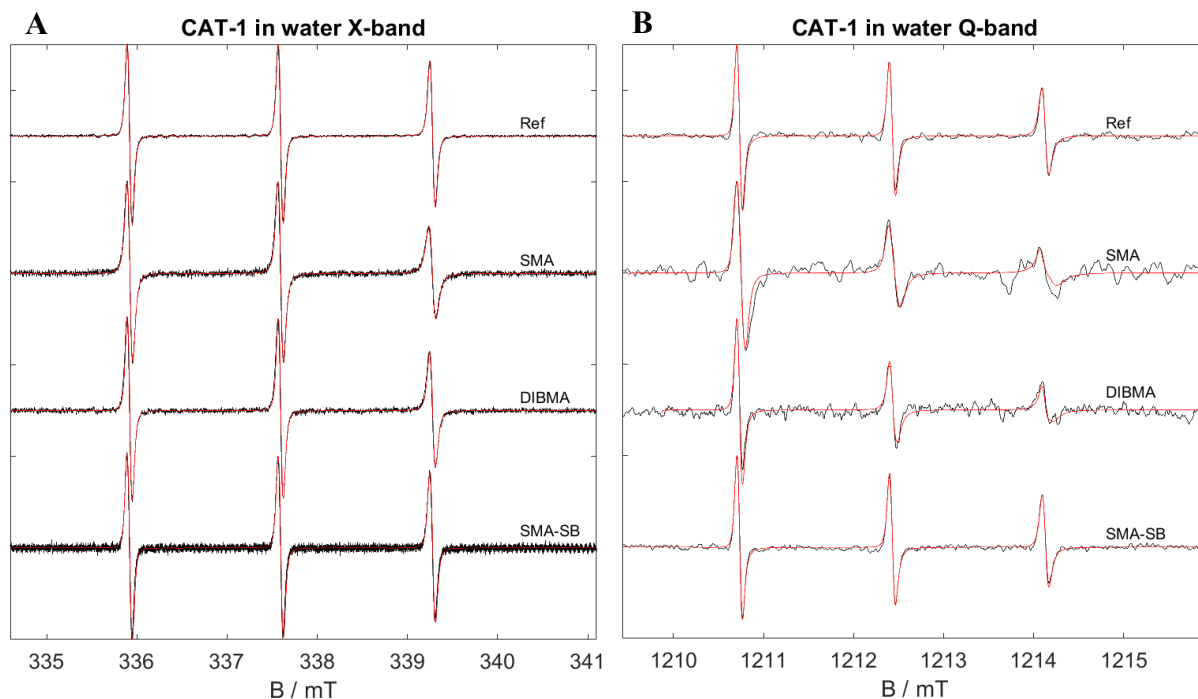


Abbildung 144 Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) CW-EPR-Spektren bei (A) X-Band- und (B) Q-Band-Frequenzen für Spin-Sonde CAT-1 in Wasser.

Tabelle 36 Zusammenfassung der Simulationsergebnisse für Spin-Probe-CAT-1 in Kombination mit den jeweiligen freien Polymeren SMA, DIBMA und SMA-SB in Wasser.

System	Band	$f / \%$	g_{iso}	a_{iso} / MHz	lw / mT	τ_c / ps
CAT-1	X	100	2.00613	47.17	0.079	26.25
	Q	100	2.00601	47.68	0.095	44.65
SMA + CAT-1	X	100	2.00570	47.10	0.078	102.69
	Q	10	2.00611	47.57	0.095	33.33
90		2.00602	48.03	0.113	137.01	
DIBMA + CAT-1	X	100	2.00611	47.17	0.071	57.00
	Q	15	2.00602	47.70	0.075	29.52
		85	2.00598	48.10	0.087	105.70
SMA-SB + CAT-1	X	100	2.00608	47.17	0.080	23.75
	Q	100	2.00594	47.71	0.095	24.83

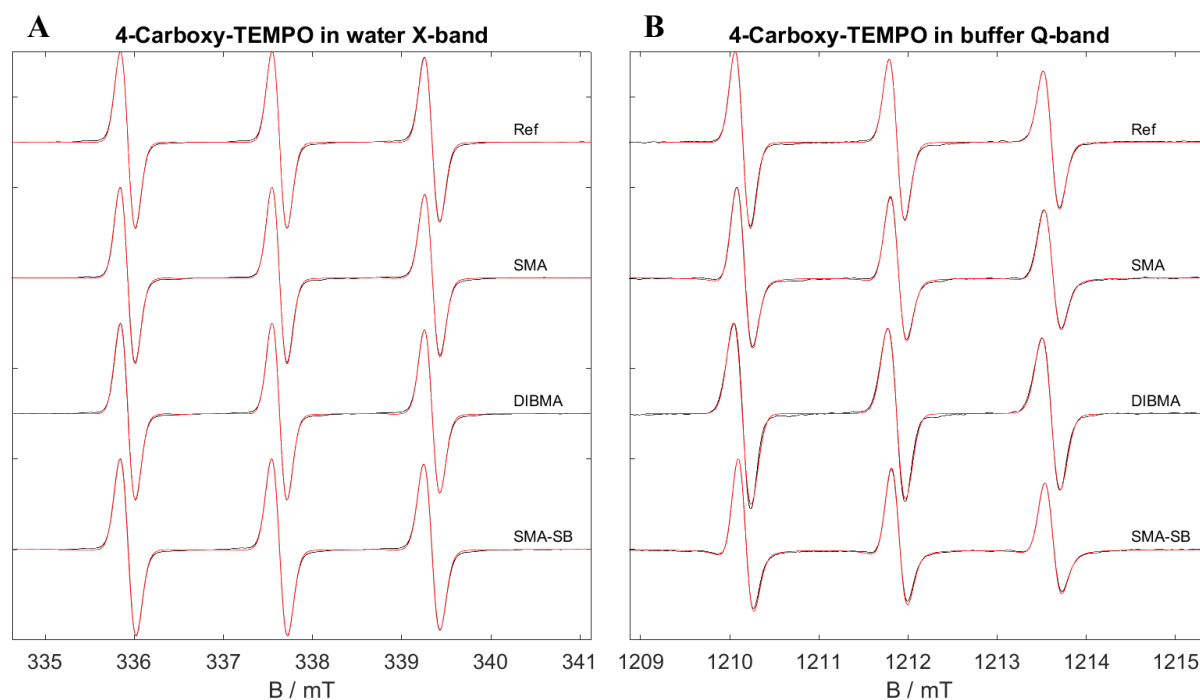


Abbildung 145 Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) CW-EPR-Spektren bei (A) X-Band- und (B) Q-Band-Frequenzen für die Spinprobe 4-Carboxy-TEMPO in Wasser.

Tabelle 37 Zusammenfassung der Simulationsergebnisse für die Spinprobe 4-Carboxy-TEMPO in Kombination mit den freien jeweiligen Polymeren SMA, DIBMA und SMA-SB in Wasser

System	Band	$f / \%$	g_{iso}	a_{iso} / MHz	lw / mT	τ_c / ps
4-Carboxy-TEMPO	X	100	2.00607	47.93	0.193	26.83
	Q	100	2.00589	48.57	0.205	40.06
SMA + 4-Carboxy-TEMPO	X	100	2.00576	48.02	0.195	31.84
	Q	100	2.00610	48.58	0.200	35.78
DIBMA + 4-Carboxy-TEMPO	X	100	2.00593	47.95	0.195	32.01
	Q	100	2.00588	48.47	0.205	21.47
SMA-SB + 4-Carboxy-TEMPO	X	100	2.00596	47.85	0.207	24.37
	Q	100	2.00574	48.28	0.210	32.90

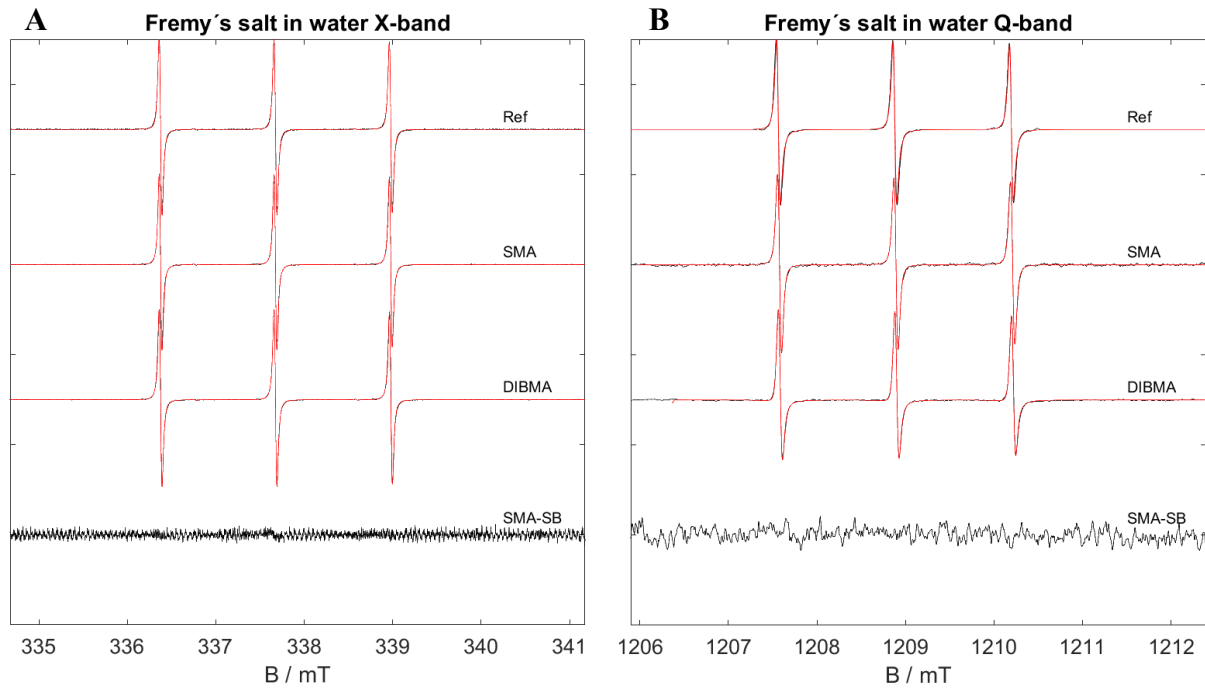


Abbildung 146 Experimental (black) and simulated (red) CW EPR spectra at (A) X-band and (B) Q-band frequencies for spin probe Frémy's Salz in water.

Tabelle 38 Zusammenfassung der Simulationsergebnisse für Spin-Probe-Frémy-Salz in Kombination mit den freien jeweiligen Polymeren SMA und DIBMA in Wasser.

System	Band	$f / \%$	g_{iso}	$a_{iso} /$ MHz	lw / mT	τ_c / ps
Frémy's Salz	X	100	2.00582	36.54	0.057	4.57
	Q	100	2.00571	36.95	0.065	3.33
SMA + Frémy's Salz	X	100	2.00582	36.53	0.055	4.69
	Q	100	2.00589	36.97	0.080	5.16
DIBMA + Frémy's Salz	X	100	2.00569	36.55	0.056	4.69
	Q	100	2.00578	36.97	0.080	3.87

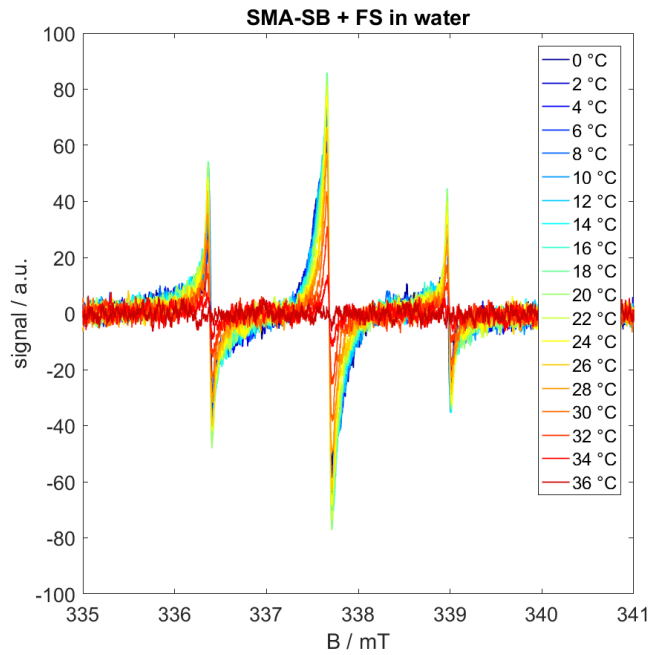


Abbildung 147 A X-Band-CW-EPR-Spektren wiederholter Messungen von SMA-SB mit Fremysalz in Wasser. Wie in den unnormalisierten Spektren zu sehen ist, ist die Signalintensität eher schwach und das Signal selbst verschwindet bei Temperaturen über 34 °C.

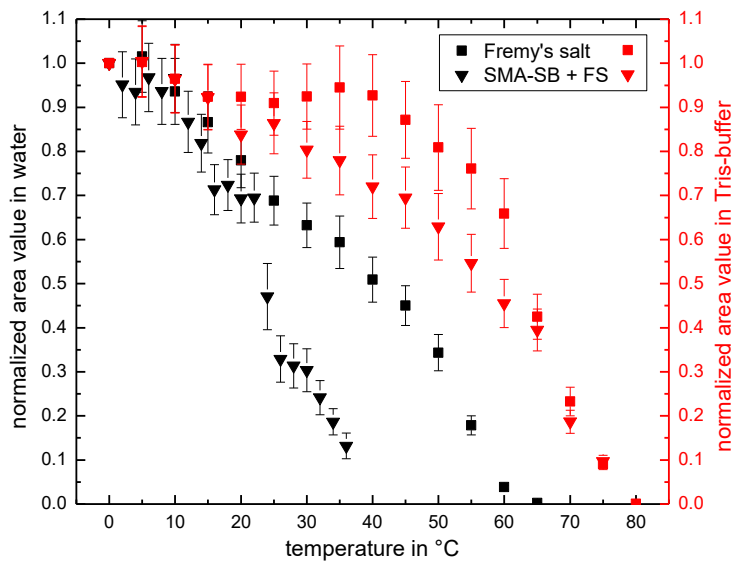


Abbildung 148 Darstellung der berechneten Flächenwerte für die CW-EPR-Messungen von reinem Fremysalz (FS) und SMA-SB mit FS in Wasser (schwarze Symbole) und in salzhaltiger Tris-Pufferlösung (rote Symbole).

Einfluss der Puffersalze auf die Interaktionsmuster

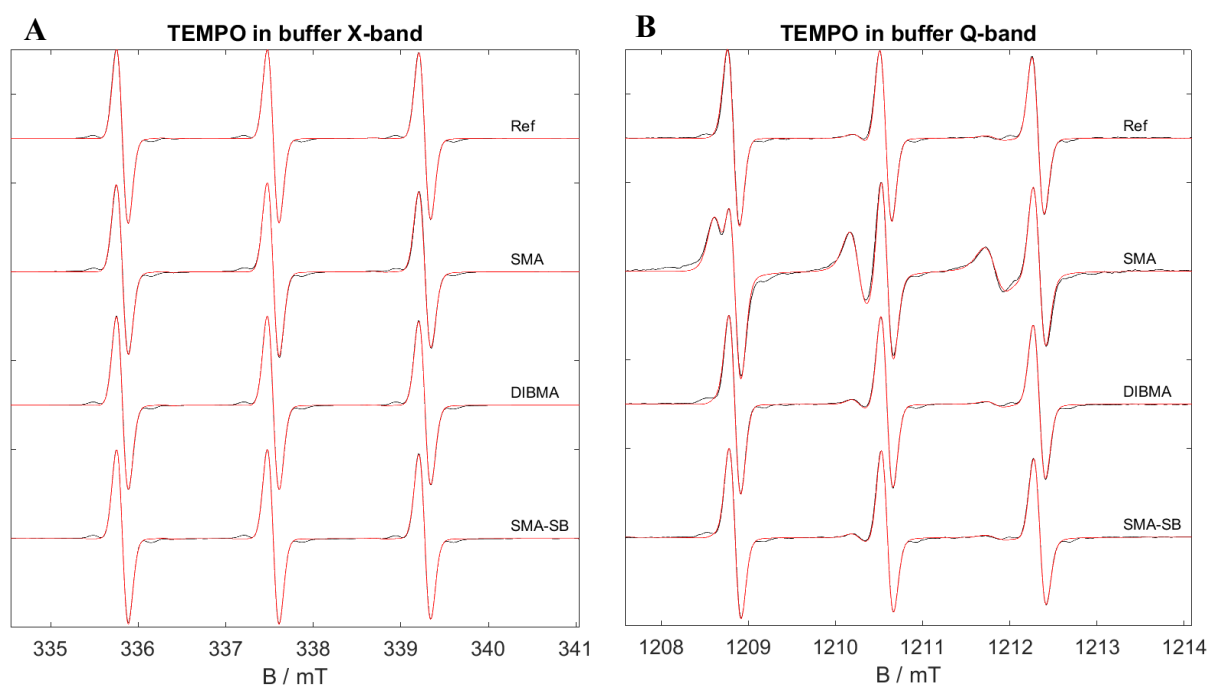


Abbildung 149 Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) cwEPR-Spektren bei (A) X-Band- und (B) Q-Band-Frequenzen für Spin-Sonde-TEMPO in salzhaltiger Tris-Pufferlösung.

Tabelle 39 Zusammenfassung der Simulationsergebnisse für Spin-Sonde-TEMPO in Kombination mit den jeweiligen freien Polymeren SMA, DIBMA und SMA-SB in salzhaltiger Tris-Pufferlösung.

System	Band	$f / \%$	g_{iso}	$a_{\text{iso}} / \text{MHz}$	lw / mT	τ_c / ps
TEMPO	X	100	2.00605	48.51	0.154	12.04
	Q	90	2.00585	49.03	0.157	18.52
		10	2.00633	43.37	0.180	141.91
SMA + TEMPO	X	100	2.00566	48.49	0.157	37.66
	Q	40	2.00589	48.98	0.159	27.40
		60	2.00644	43.93	0.270	142.50
DIBMA + TEMPO	X	100	2.00625	48.51	0.157	17.88
	Q	90	2.00589	49.03	0.157	20.22
		10	2.00642	43.53	0.180	123.97
SMA-SB + TEMPO	X	100	2.00634	48.50	0.155	15.97
	Q	90	2.00609	49.09	0.158	14.25
		10	2.00662	43.50	0.190	142.50

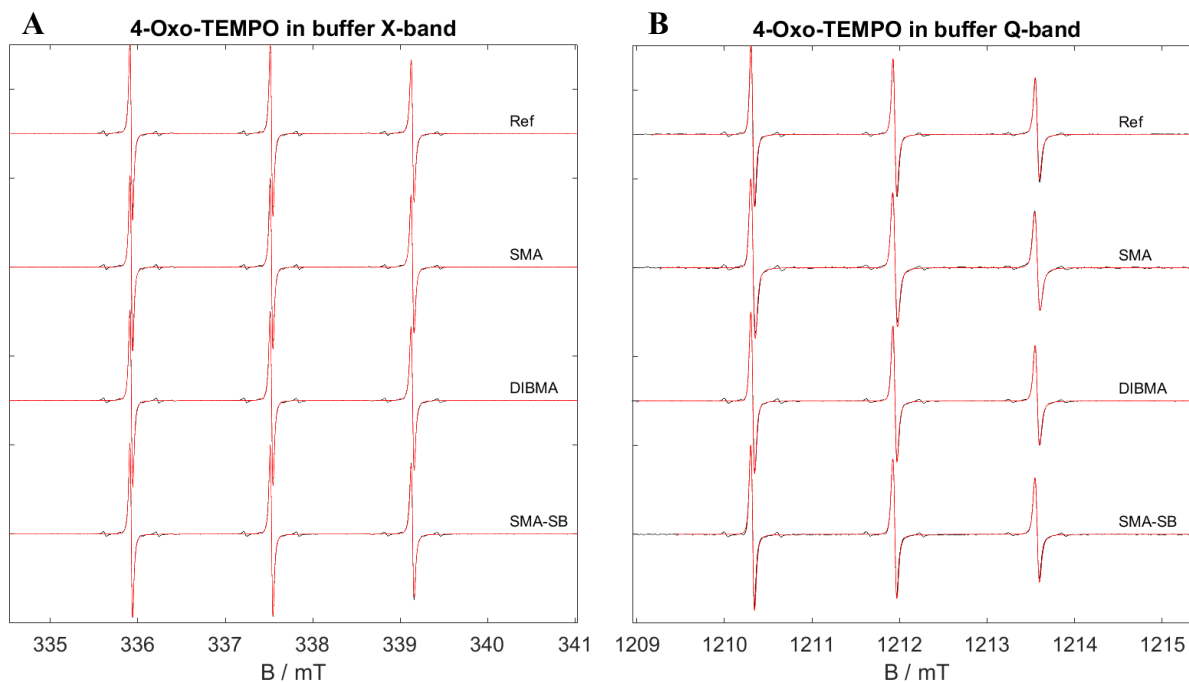


Abbildung 150 Experimental (black) and simulated (red) cwEPR spectra at (A) X-band and (B) Q-band frequencies for spin probe 4-Oxo-TEMPO in saline tris buffer solution.

Tabelle 40 Zusammenfassung der Simulationsergebnisse für die Spin-Sonde 4-Oxo-TEMPO in Kombination mit den jeweiligen freien Polymeren SMA, DIBMA und SMA-SB in salzhaltiger Tris-Pufferlösung.

System	Band	$f / \%$	g_{iso}	a_{iso} / MHz	lw / mT	τ_c / ps
4-Oxo-TEMPO	X	100	2.00629	45.15	0.047	16.24
	Q	100	2.00581	45.65	0.065	17.26
SMA + 4-Oxo-TEMPO	X	100	2.00575	45.17	0.048	28.03
	Q	100	2.00588	45.62	0.078	22.92
DIBMA + 4-Oxo-TEMPO	X	100	2.00632	45.14	0.048	20.92
	Q	100	2.00578	45.65	0.066	20.04
SMA-SB + 4-Oxo-TEMPO	X	100	2.00638	45.17	0.045	23.72
	Q	100	2.00594	45.67	0.068	17.50

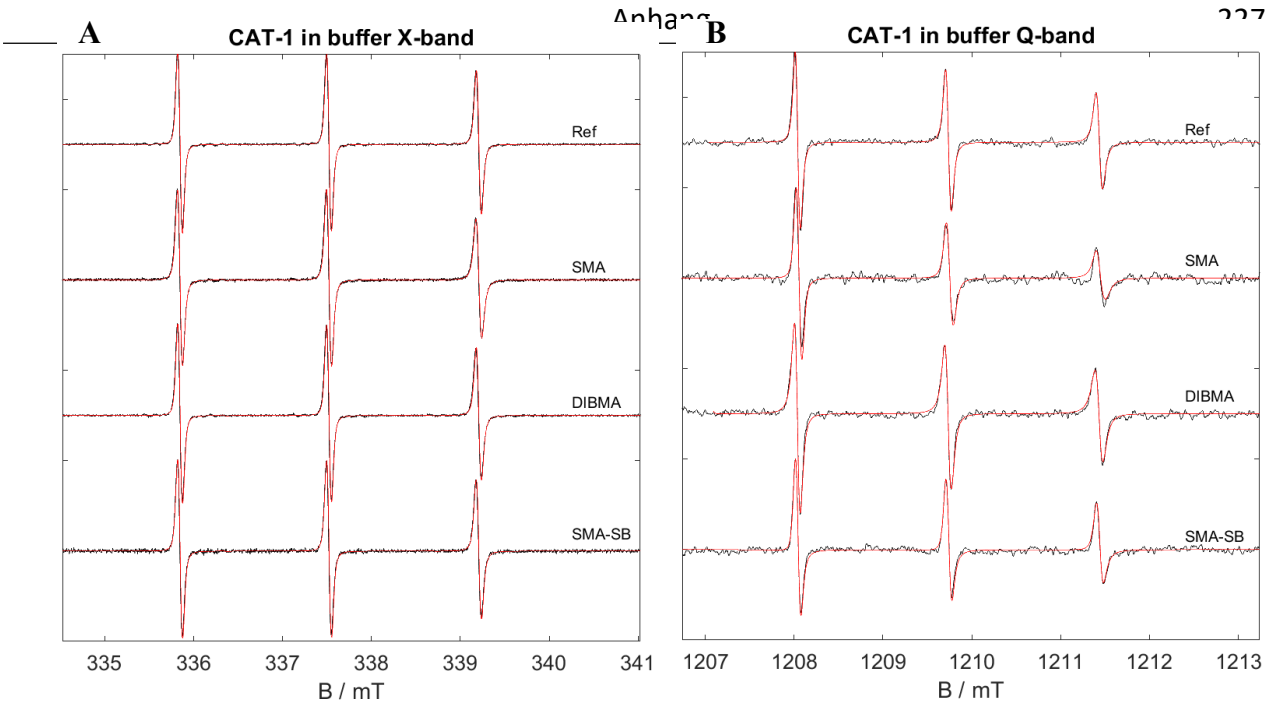


Abbildung 151 Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) CW-EPR-Spektren bei (A) X-Band- und (B) Q-Band-Frequenzen für Spin-Sonde CAT-1 in salzhaltiger Tris-Pufferlösung.

Tabelle 41 Zusammenfassung der Simulationsergebnisse für Spin-Probe-CAT-1 in Kombination mit den freien jeweiligen Polymeren SMA, DIBMA und SMA-SB in salzhaltiger Tris-Pufferlösung.

System	Band	$f / \%$	g_{iso}	a_{iso} / MHz	lw / mT	τ_c / ps
CAT-1	X	100	2.00637	47.20	0.073	24.27
	Q	100	2.00595	47.67	0.094	28.89
SMA + CAT-1	X	100	2.00585	47.22	0.077	55.82
	Q	10	2.00610	47.47	0.082	33.33
90		2.00602	47.77	0.090	76.75	
DIBMA + CAT-1	X	100	2.00635	47.20	0.072	38.50
	Q	100	2.00594	47.70	0.112	39.21
SMA-SB + CAT-1	X	100	2.00642	47.20	0.080	33.63
	Q	100	2.00604	47.70	0.095	31.23

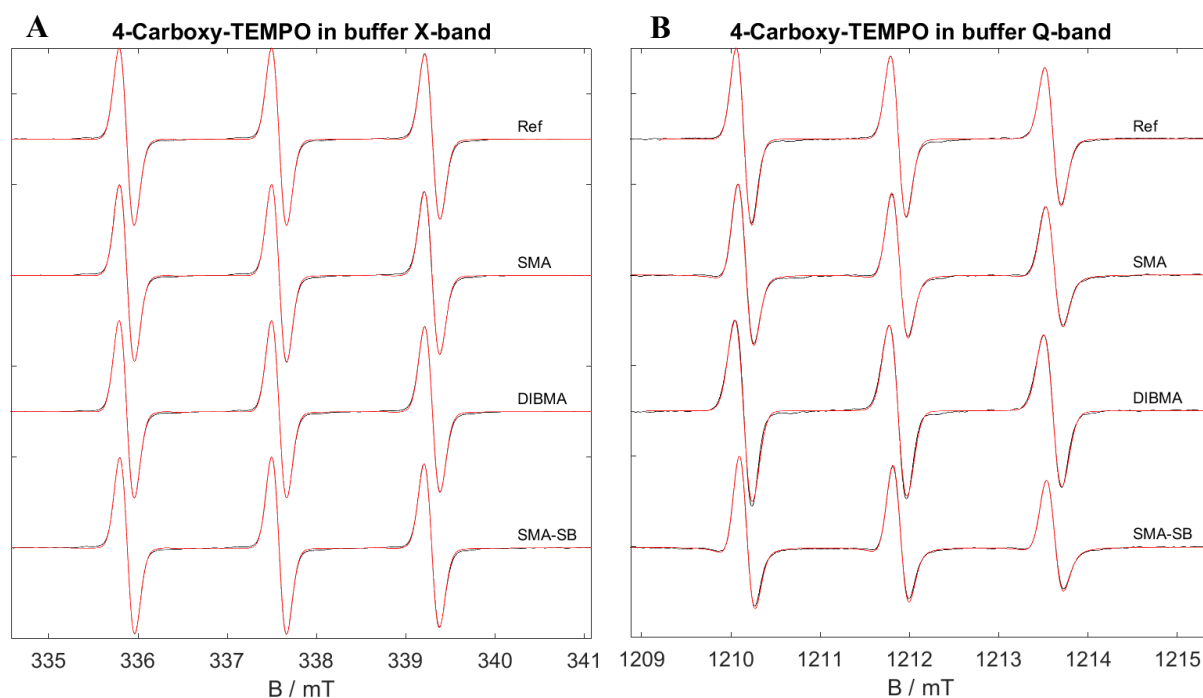


Abbildung 152 Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) CW-EPR-Spektren bei (A) X-Band- und (B) Q-Band-Frequenzen für die Spinsonde 4-Carboxy-TEMPO in Kochsalz-Tris-Pufferlösung.

Tabelle 42 Zusammenfassung der Simulationsergebnisse für die Spinsonde 4-Carboxy-TEMPO in Kombination mit den jeweiligen freien Polymeren SMA, DIBMA und SMA-SB in Kochsalzlösung und Tris-Puffer

System	Band	$f / \%$	g_{iso}	$a_{\text{iso}} / \text{MHz}$	lw / mT	τ_c / ps
4-Carboxy-TEMPO	X	100	2.00628	48.07	0.194	27.78
	Q	100	2.00588	48.60	0.200	28.89
SMA + 4-Carboxy-TEMPO	X	100	2.00580	47.99	0.194	34.52
	Q	100	2.00589	48.52	0.205	36.15
DIBMA + 4-Carboxy-TEMPO	X	100	2.00630	48.08	0.195	26.99
	Q	100	2.00588	48.65	0.228	30.91
SMA-SB + 4-Carboxy-TEMPO	X	100	2.00621	47.88	0.192	32.71
	Q	100	2.00598	48.38	0.200	39.21

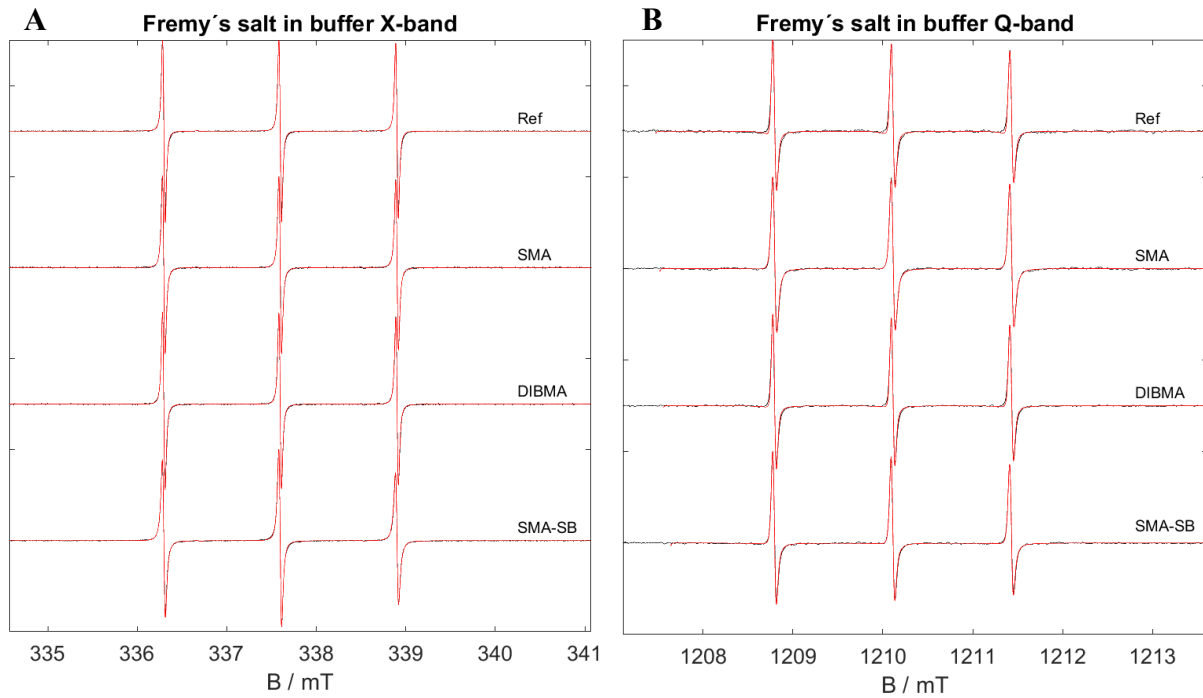


Abbildung 153 Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) CW-EPR-Spektren bei (A) X-Band- und (B) Q-Band-Frequenzen für die Spinsonde Frémy's Salz in salzhaltiger Tris-Pufferlösung.

Tabelle 43 Zusammenfassung der Simulationsergebnisse für die Spinsonde Frémy's Salz in Kombination mit den jeweiligen freien Polymeren SMA, DIBMA und SMA-SB in salzhaltiger Tris-Pufferlösung.

System	Band	$f / \%$	g_{iso}	$a_{iso} /$ MHz	lw / mT	τ_c / ps
Frémy's Salz	X	100	2.00623	36.56	0.048	5.05
	Q	100	2.00571	37.00	0.060	7.23
SMA + Frémy's Salz	X	100	2.00563	36.57	0.048	6.76
	Q	100	2.00578	37.00	0.077	4.00
DIBMA + Frémy's Salz	X	100	2.00617	36.59	0.046	6.35
	Q	100	2.00572	37.00	0.059	6.59
SMA-SB + Frémy's Salz	X	100	2.00602	36.57	0.040	46.93
	Q	100	2.00582	36.98	0.066	6.50

Einfluss der Temperatur auf die Parameter der Spinsonde

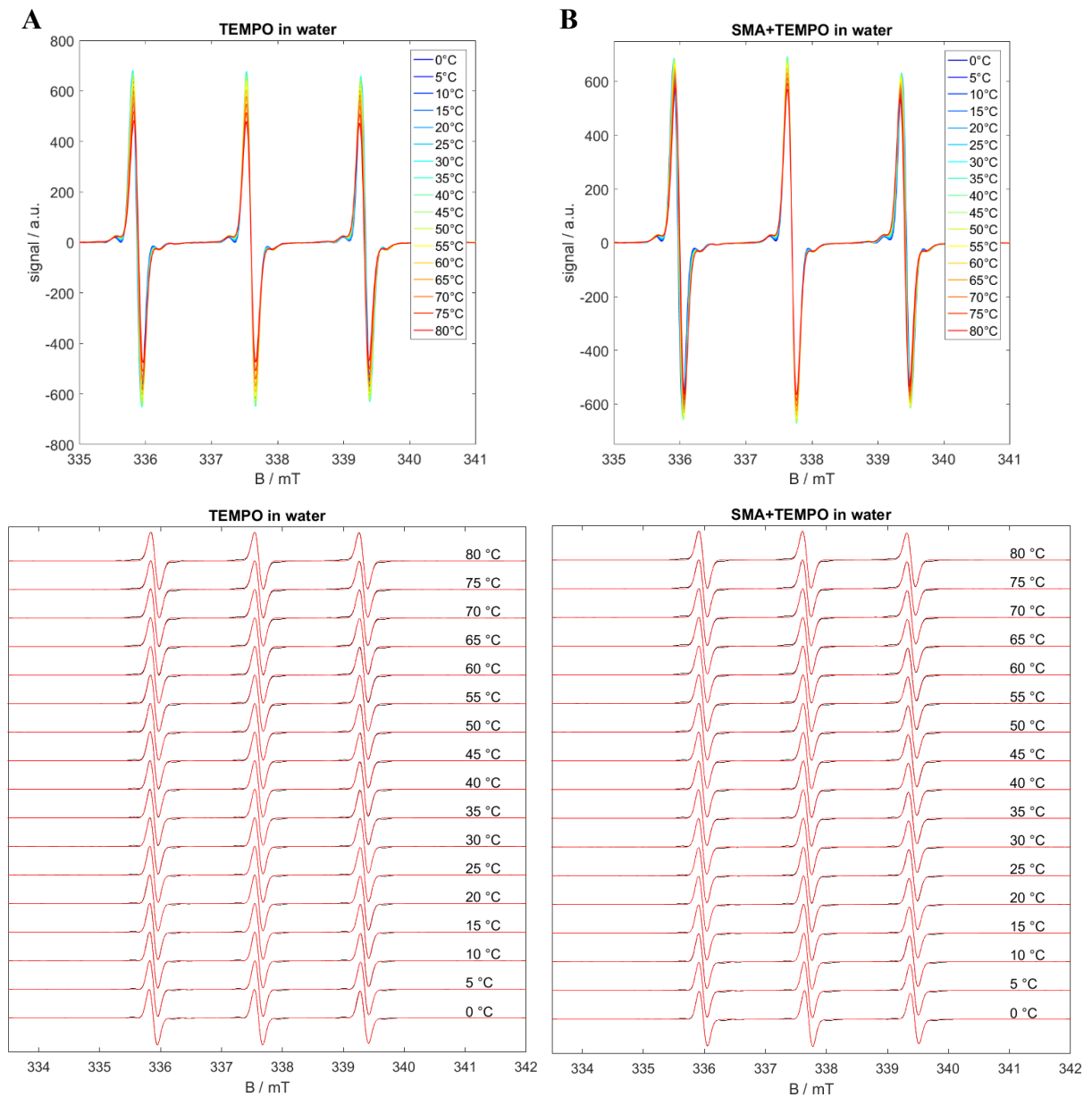


Abbildung 154 Temperaturabhängige CW-EPR-Spektren für (A) nur TEMPO und (B) SMA mit TEMPO in Wasser. Die normalisierten experimentellen (schwarz) und simulierten (rot) Spektren sind im gestapelten Diagramm überlagert.

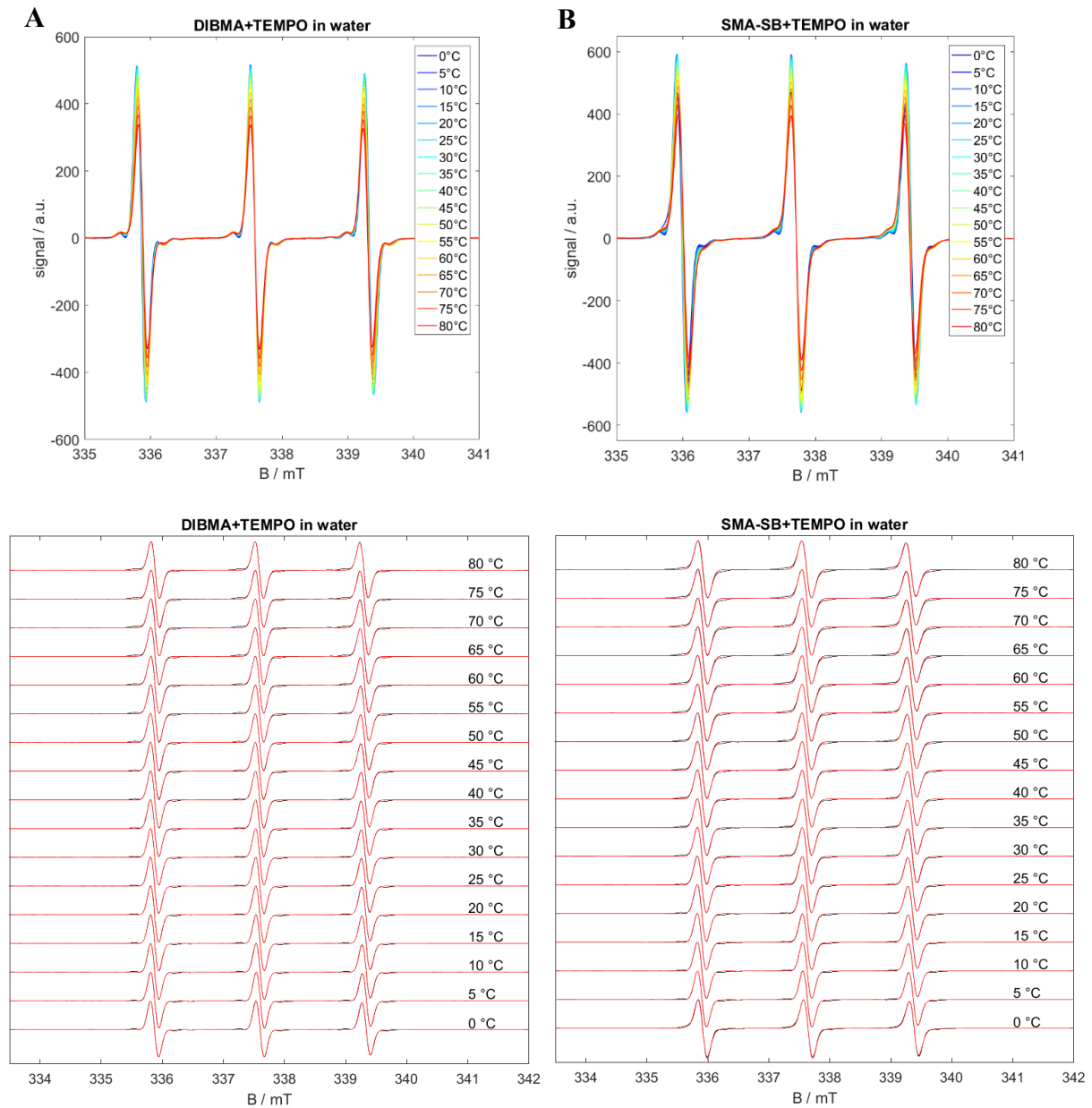


Abbildung 155 Temperaturabhängige CW-EPR-Spektren für (A) DIBMA und (B) SMA-SB mit TEMPO in Wasser. Die normalisierten experimentellen (schwarz) und simulierten (rot) Spektren sind im gestapelten Diagramm überlagert.

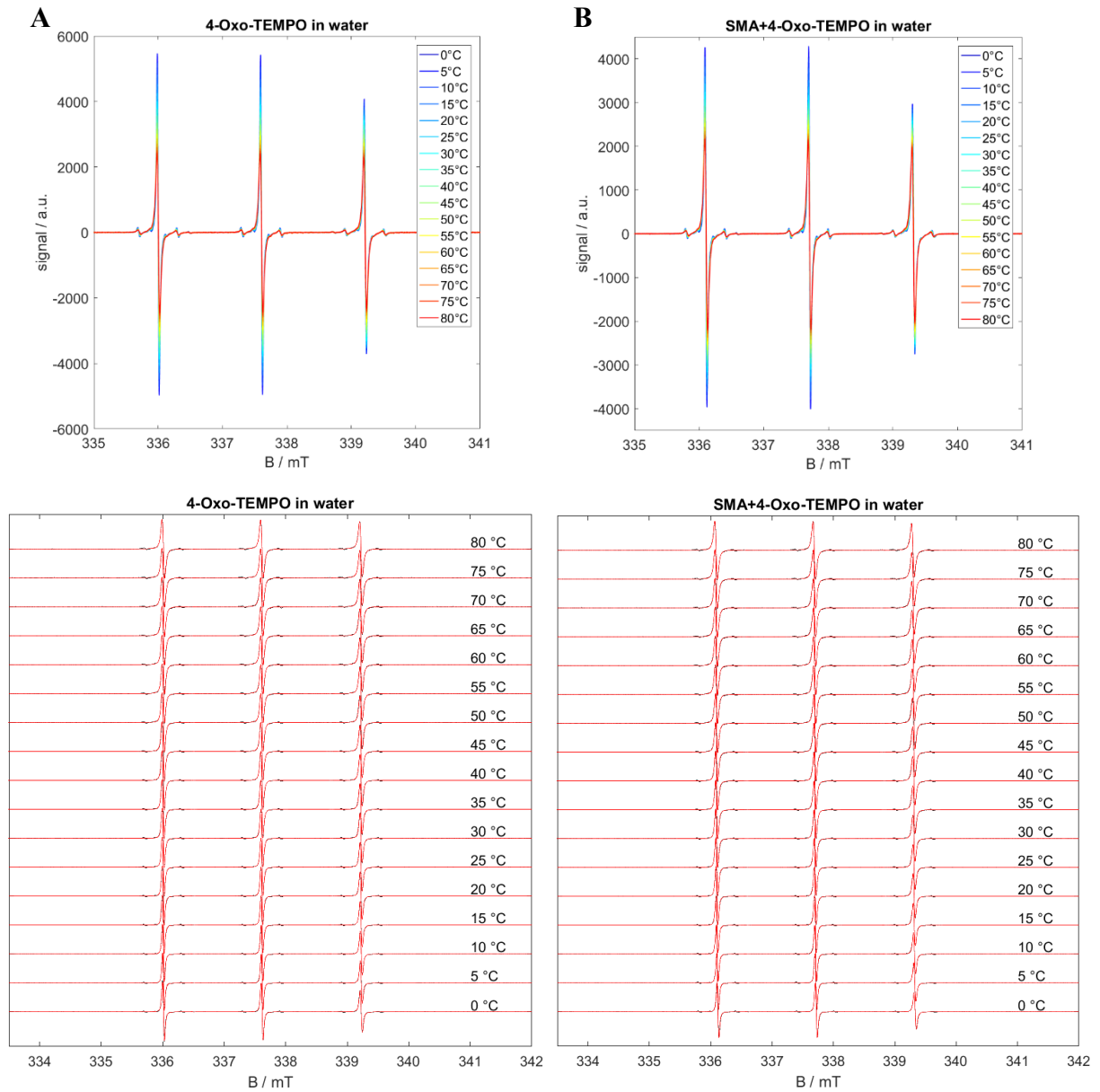


Abbildung 156 Temperaturabhängige CW-EPR-Spektren für (A) ausschließlich 4-Oxo-TEMPO und (B) SMA mit 4-Oxo-TEMPO in Wasser. Die normalisierten experimentellen (schwarz) und simulierten (rot) Spektren sind im gestapelten Diagramm überlagert.

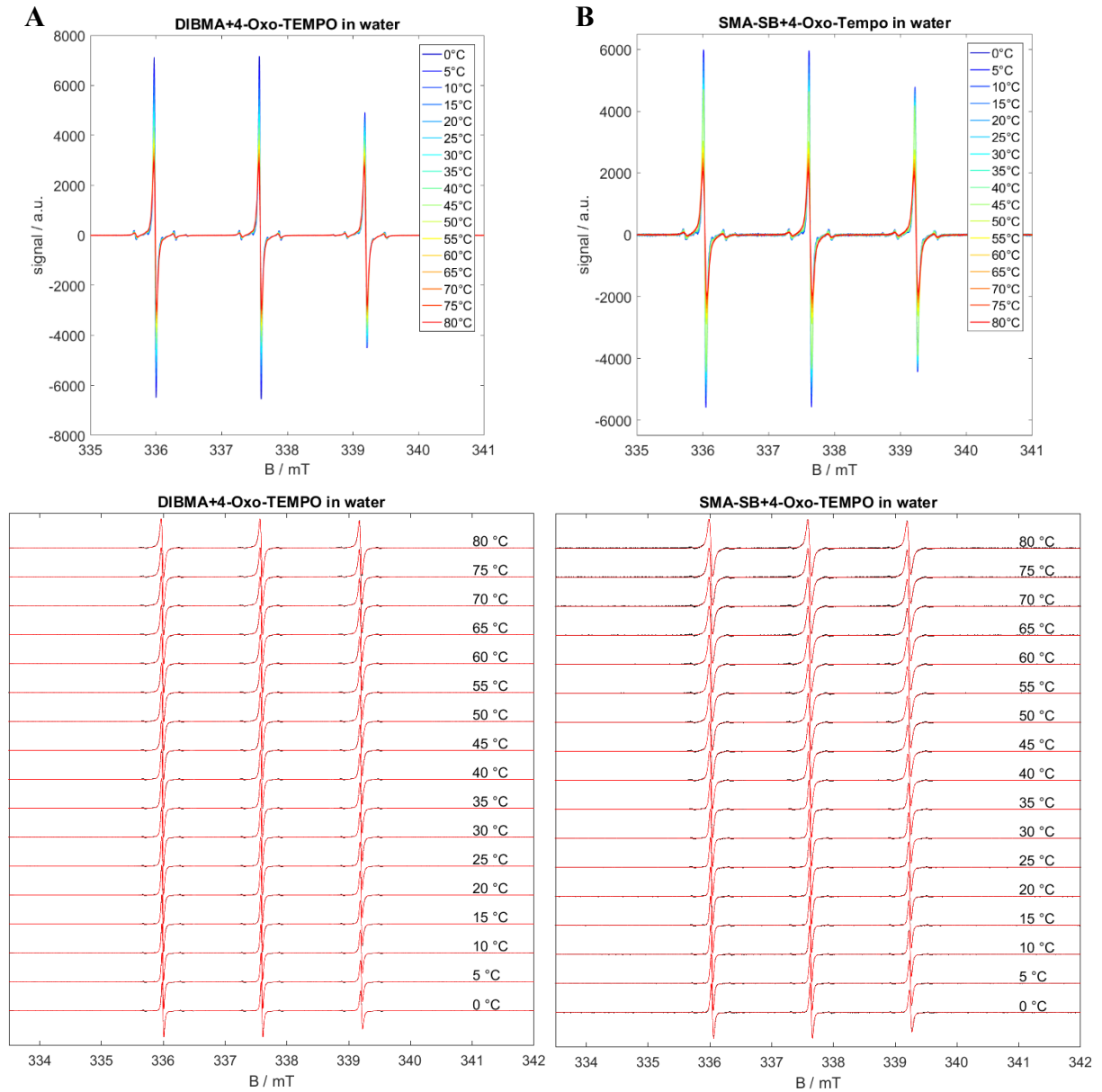


Abbildung 157 Temperaturabhängige CW-EPR-Spektren für (A) DIBMA mit 4-Oxo-TEMPO und (B) SMA-SB mit 4-Oxo-TEMPO in Wasser. Die normalisierten experimentellen (schwarz) und simulierten (rot) Spektren sind im gestapelten Diagramm überlagert.

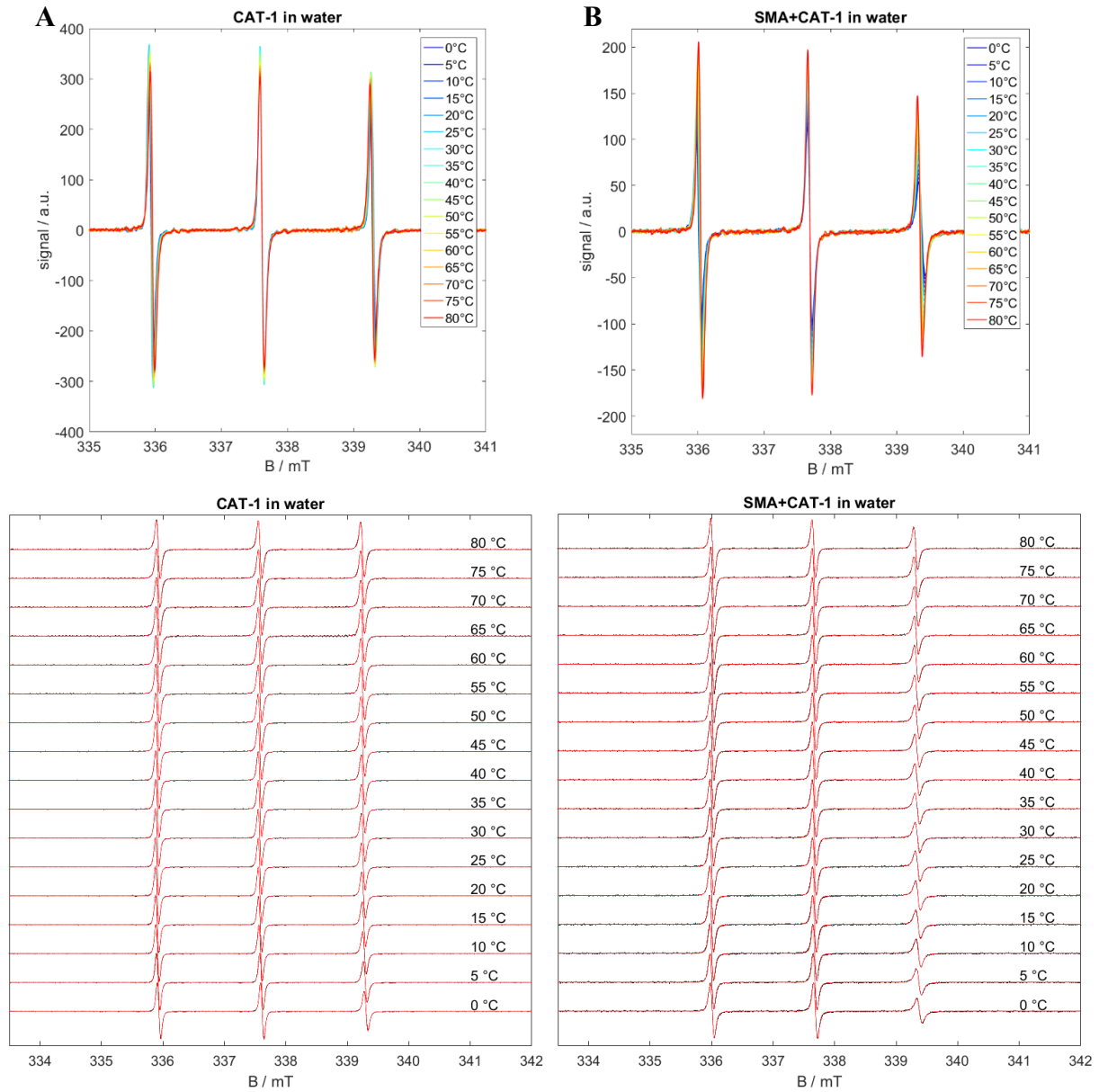


Abbildung 158 Temperaturabhängige CW-EPR-Spektren für (A) nur CAT-1 und (B) SMA mit CAT-1 in Wasser. Die normalisierten experimentellen (schwarz) und simulierten (rot) Spektren sind im gestapelten Diagramm überlagert.

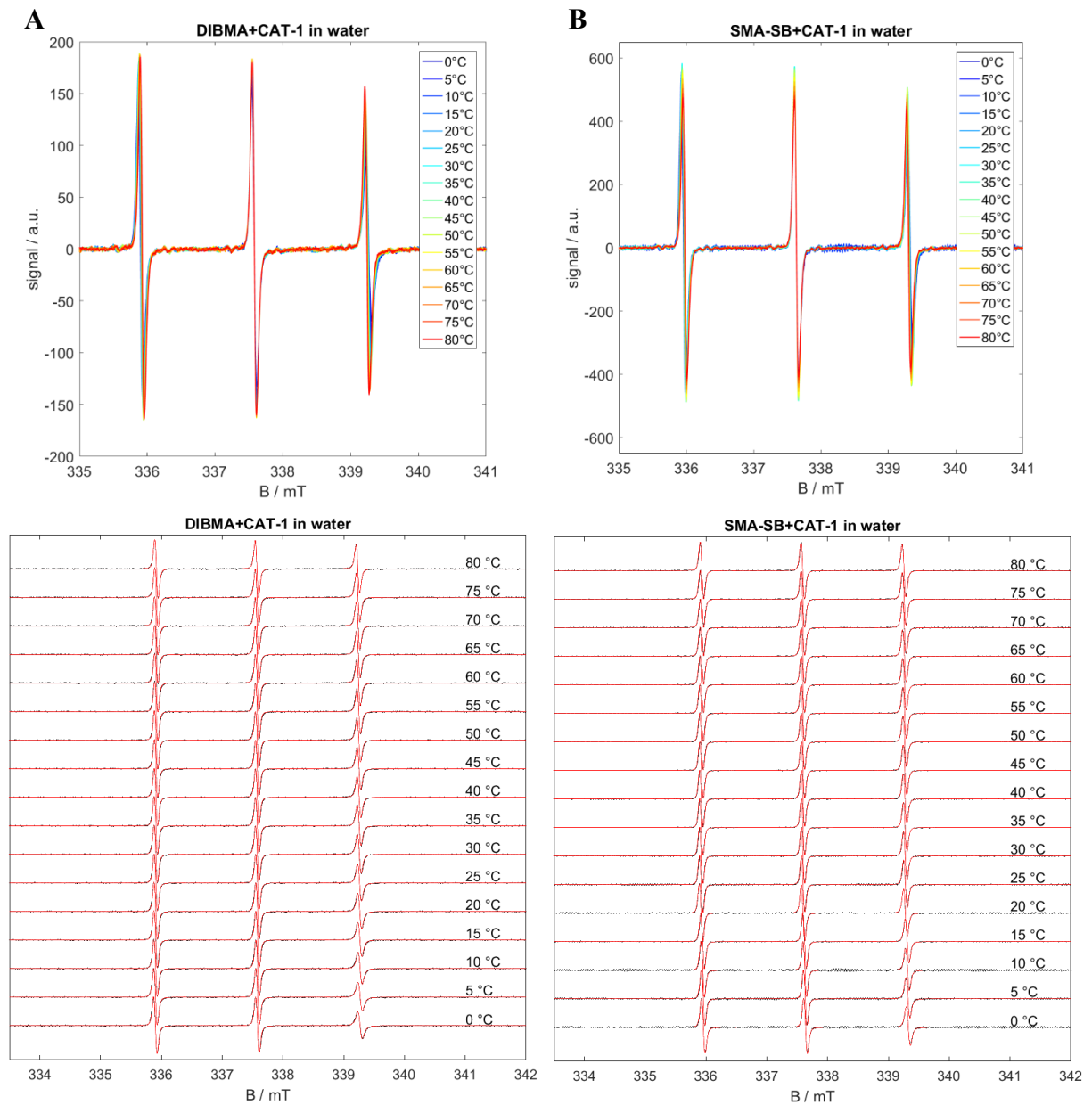


Abbildung 159 Temperaturabhängige CW-EPR-Spektren für (A) DIBMA und (B) SMA-SB mit CAT-1 in Wasser. Die normalisierten experimentellen (schwarz) und simulierten (rot) Spektren sind in der gestapelten Darstellung überlagert.

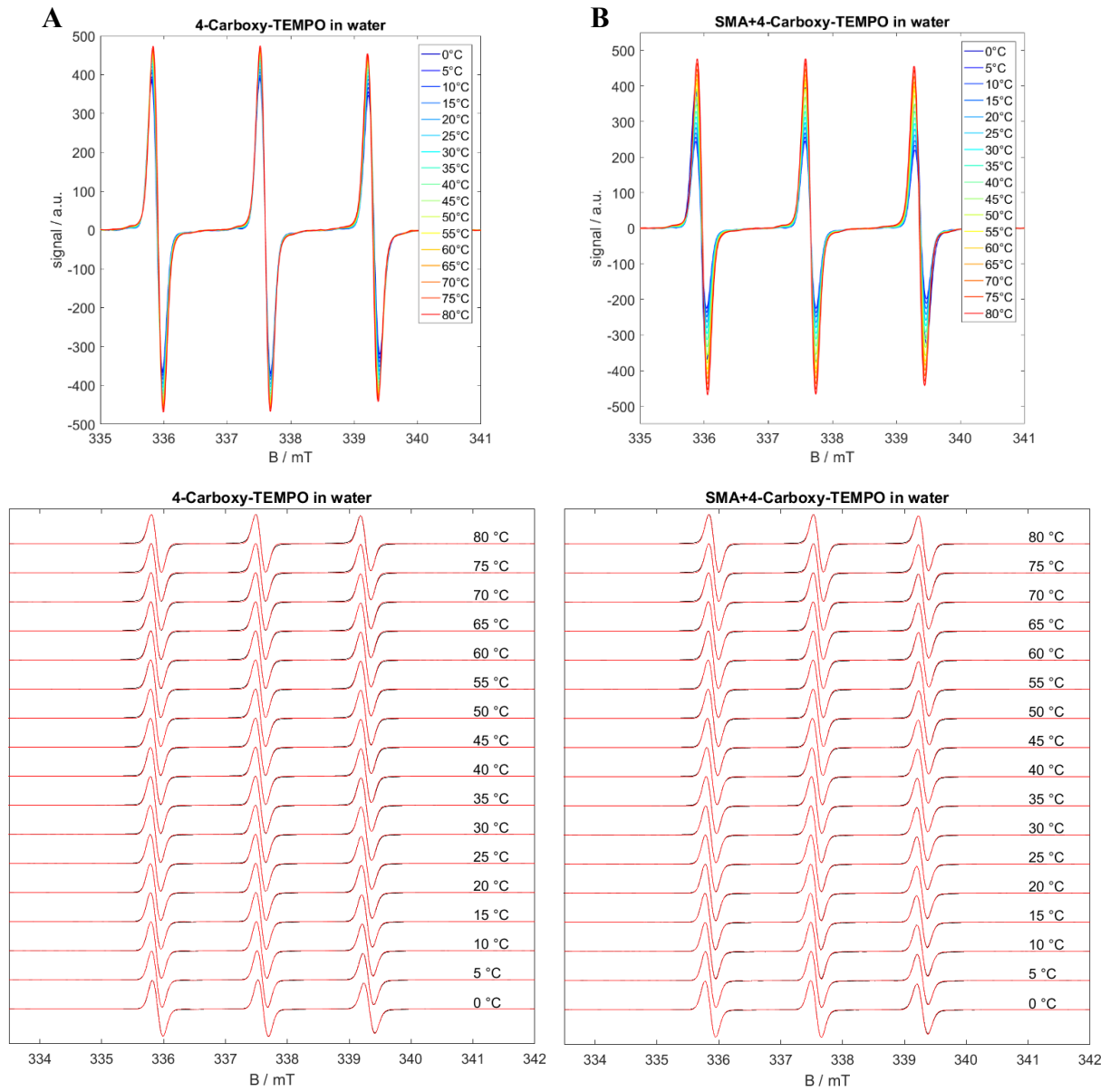


Abbildung 160 Temperaturabhängige CW-EPR-Spektren für (A) 4-Carboxy-TEMPO und (B) SMA mit 4-Carboxy-TEMPO in Wasser. Die normalisierten experimentellen (schwarz) und simulierten (rot) Spektren sind im gestapelten Diagramm überlagert.

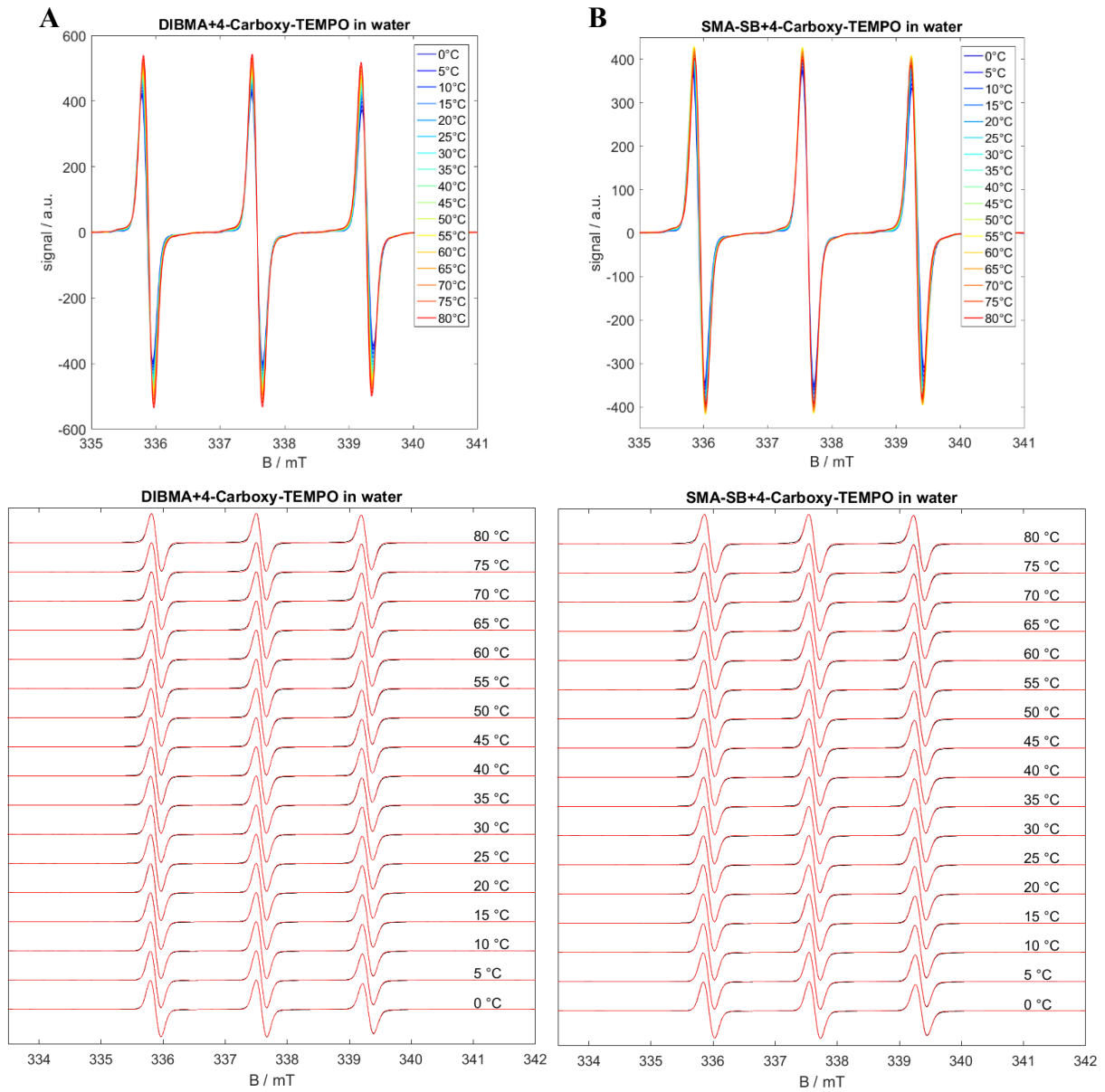


Abbildung 161 Temperaturabhängige CW-EPR-Spektren für (A) DIBMA und (B) SMA-SB mit 4-Carboxy-TEMPO in Wasser. Die normalisierten experimentellen (schwarz) und simulierten (rot) Spektren sind im gestapelten Diagramm überlagert.

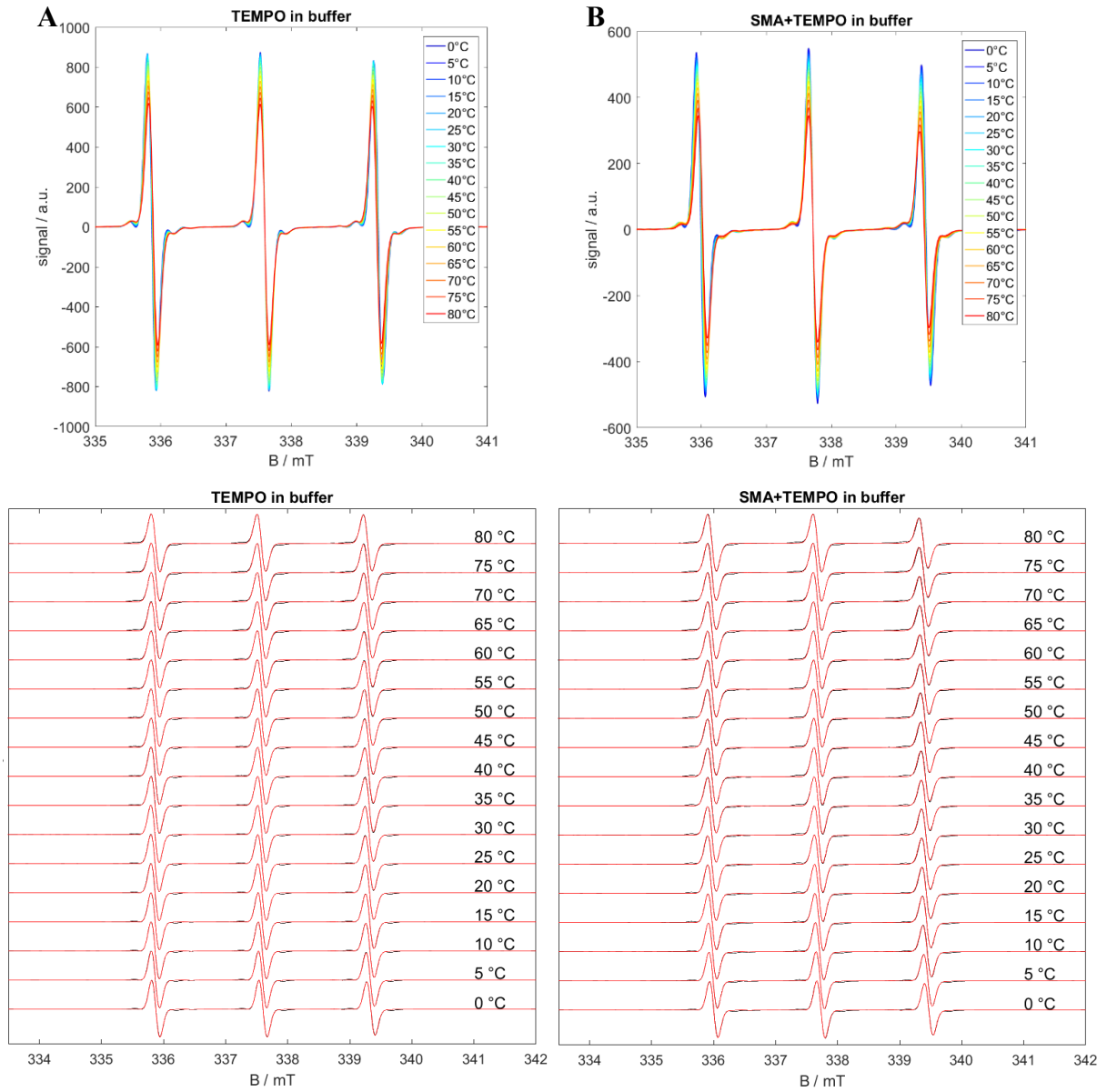


Abbildung 162 Temperaturabhängige CW-EPR-Spektren für (A) ausschließlich TEMPO und (B) SMA mit TEMPO in wässriger Pufferlösung. Die normalisierten experimentellen (schwarz) und simulierten (rot) Spektren sind im gestapelten Diagramm übereinandergelegt.

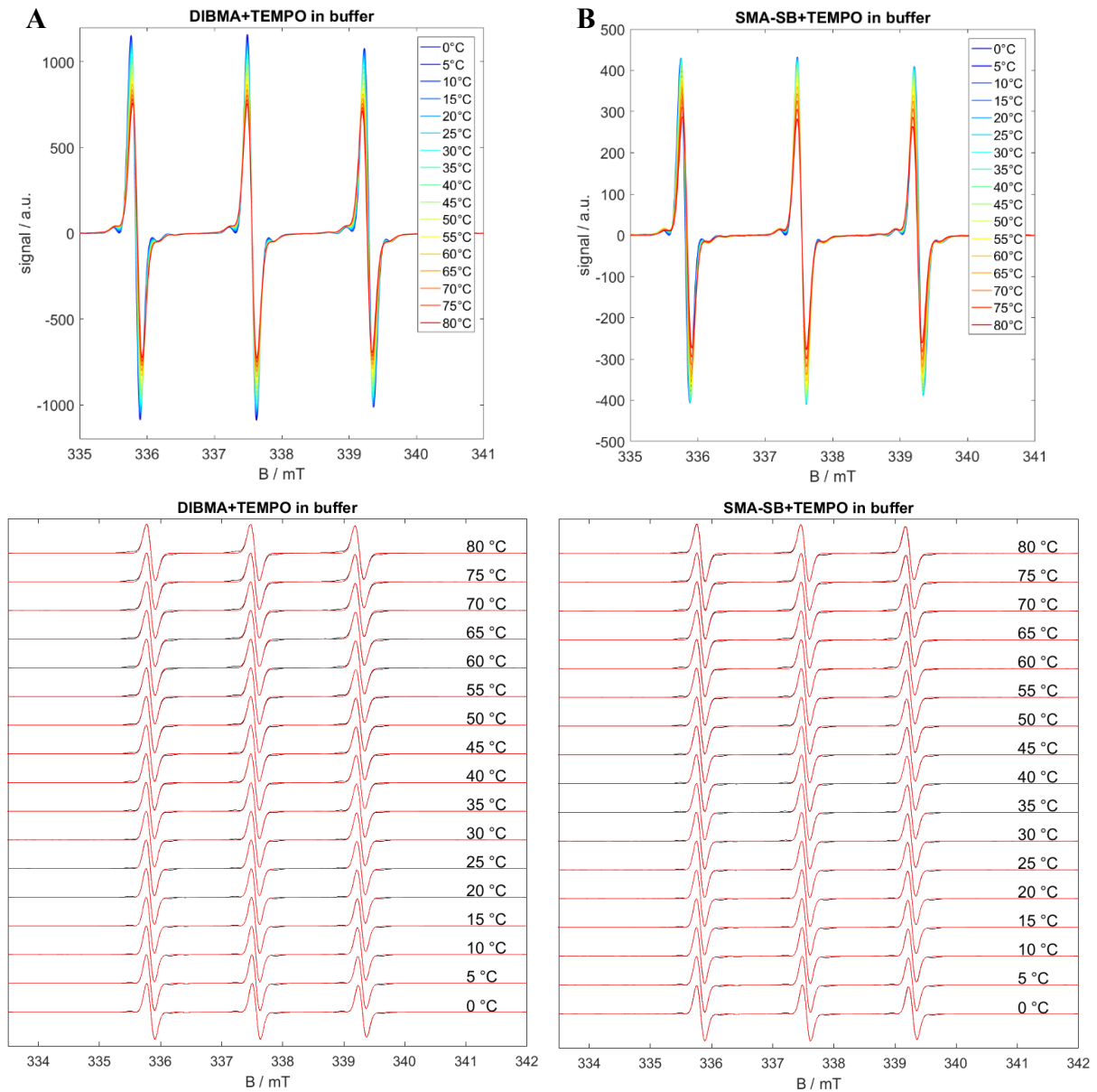


Abbildung 163 Temperaturabhängige CW-EPR-Spektren für (A) DIBMA und (B) SMA-SB mit TEMPO in wässriger Pufferlösung. Die normalisierten experimentellen (schwarz) und simulierten (rot) Spektren sind im gestapelten Diagramm übereinandergelegt.

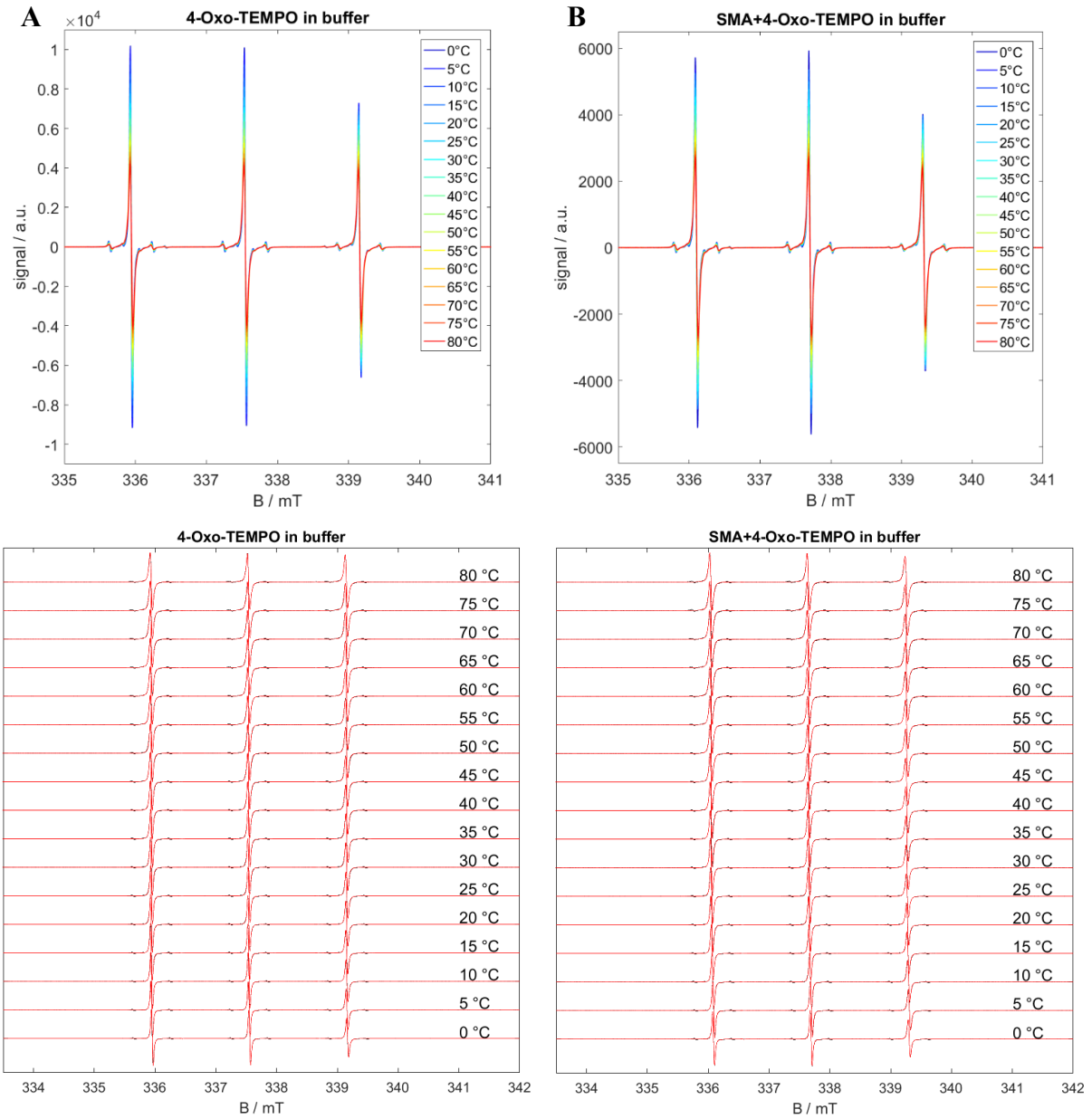


Abbildung 164 Temperaturabhängige CW-EPR-Spektren für (A) ausschließlich 4-Oxo-TEMPO und (B) SMA mit 4-Oxo-TEMPO in wässriger Pufferlösung. Die normalisierten experimentellen (schwarz) und simulierten (rot) Spektren sind im gestapelten Diagramm übereinandergelegt.

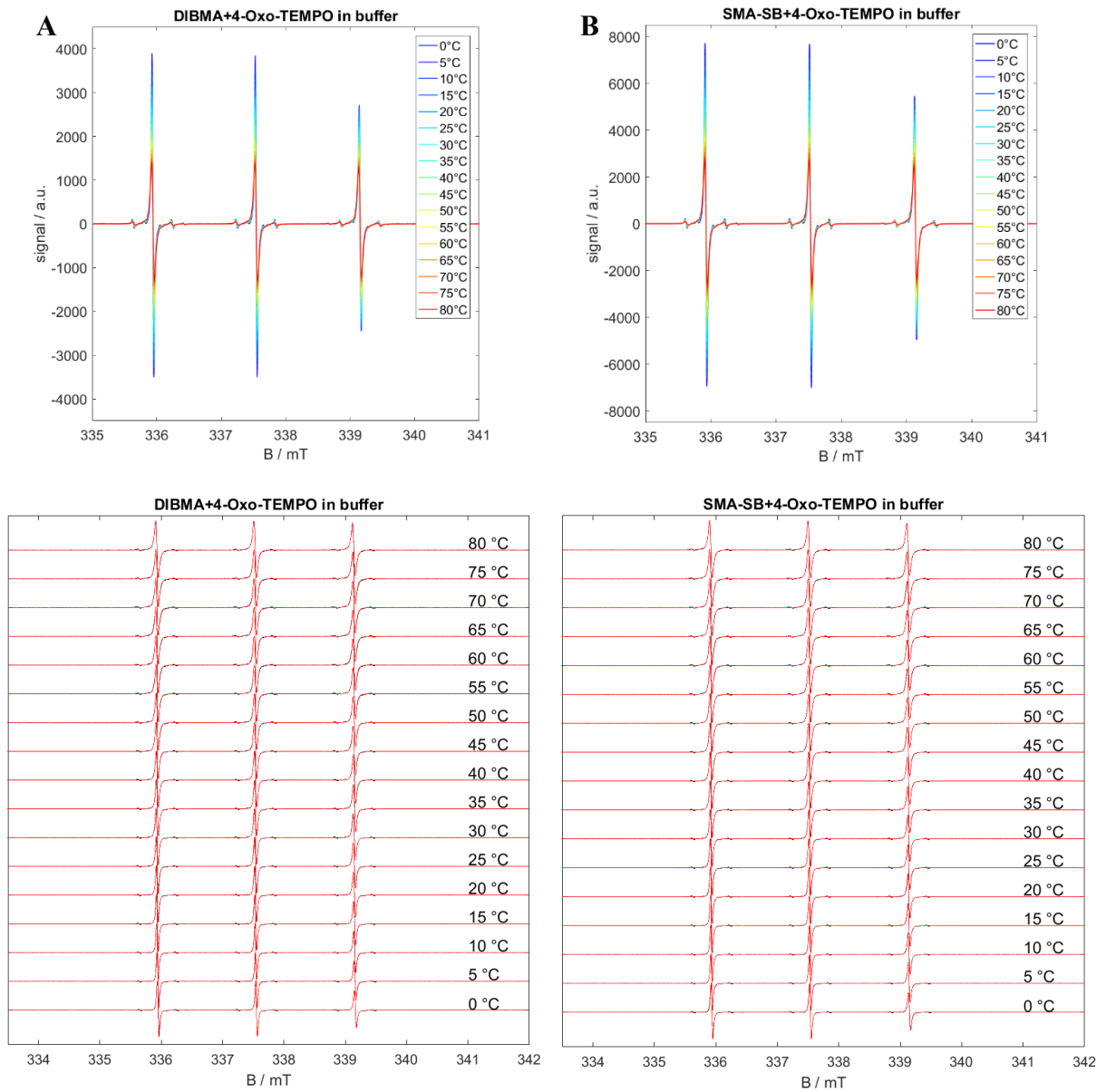


Abbildung 165 Temperaturabhängige CW-EPR-Spektren für (A) DIBMA und (B) SMA-SB mit 4-Oxo-TEMPO in wässriger Pufferlösung. Die normalisierten experimentellen (schwarz) und simulierten (rot) Spektren sind im gestapelten Diagramm überlagert.

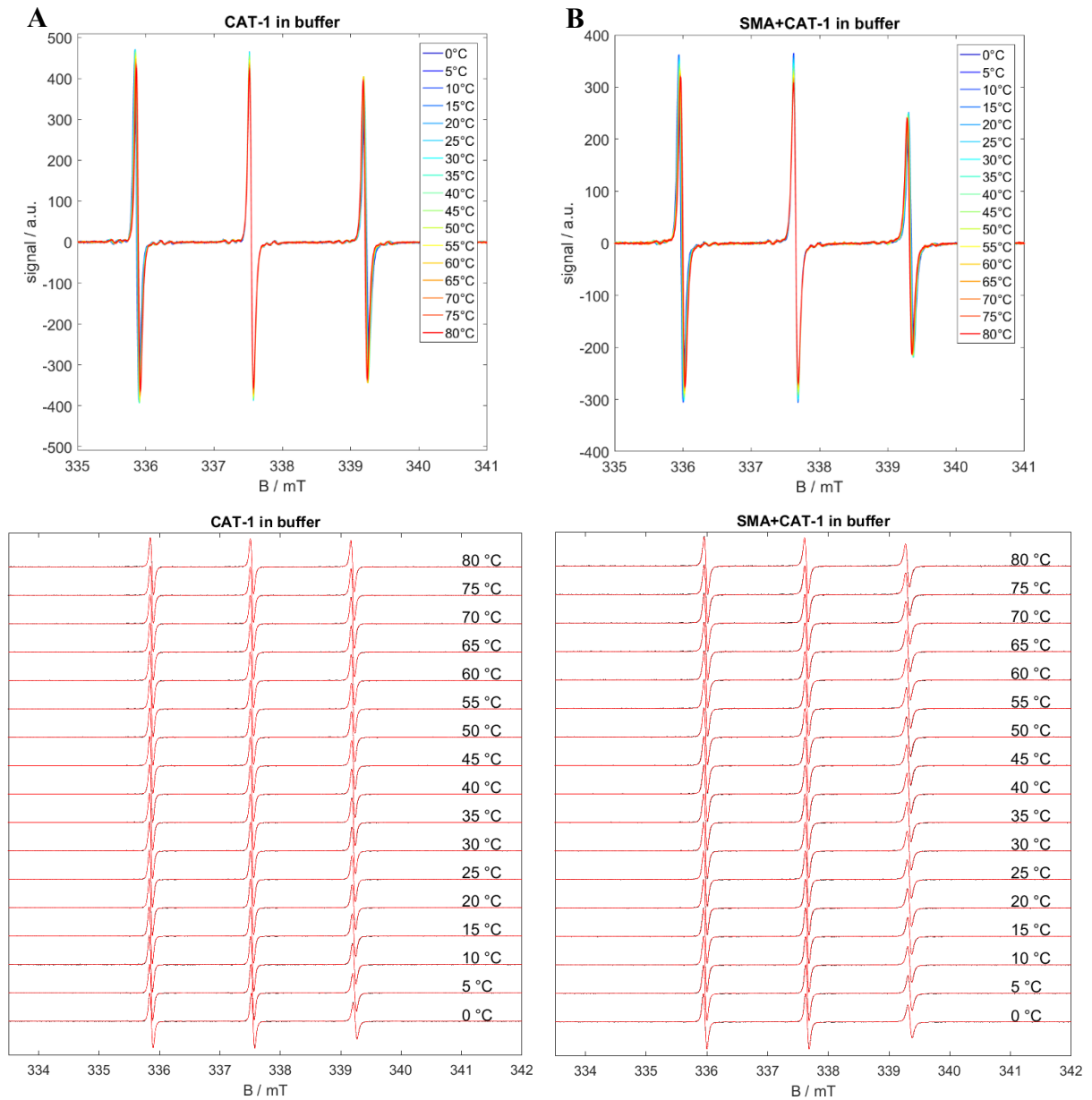


Abbildung 166 Temperaturabhängige CW-EPR-Spektren für (A) ausschließlich CAT-1 und (B) SMA mit CAT-1 in wässriger Pufferlösung. Die normalisierten experimentellen (schwarz) und simulierten (rot) Spektren sind im gestapelten Diagramm übereinandergelegt.

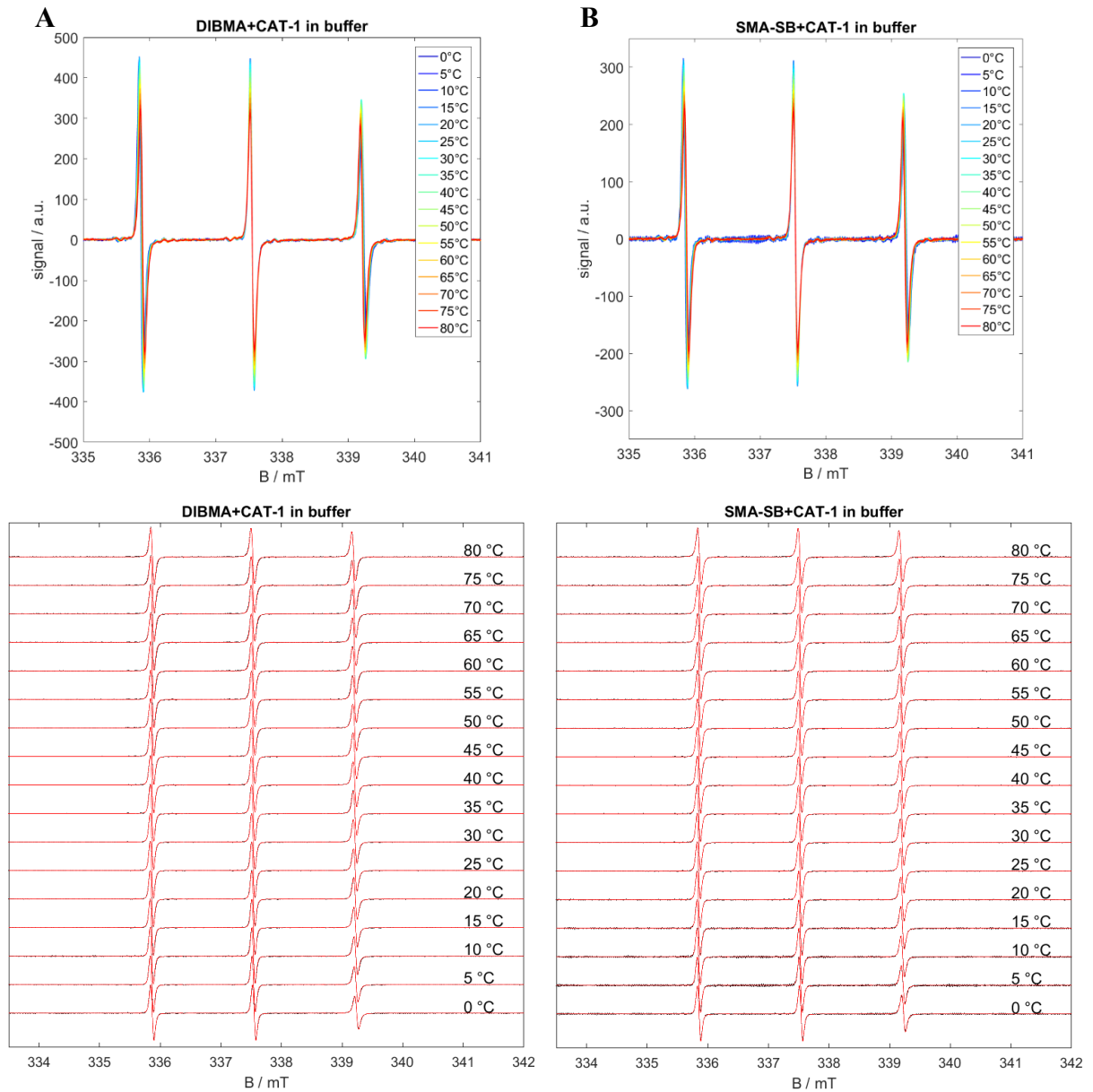


Abbildung 167 Temperature-dependent CW EPR spectra for (A) DIBMA and (B) SMA-SB with CAT-1 in aqueous buffer solution. The normalised experimental (black) and simulated (red) spectra are overlaid in the stacked plot.

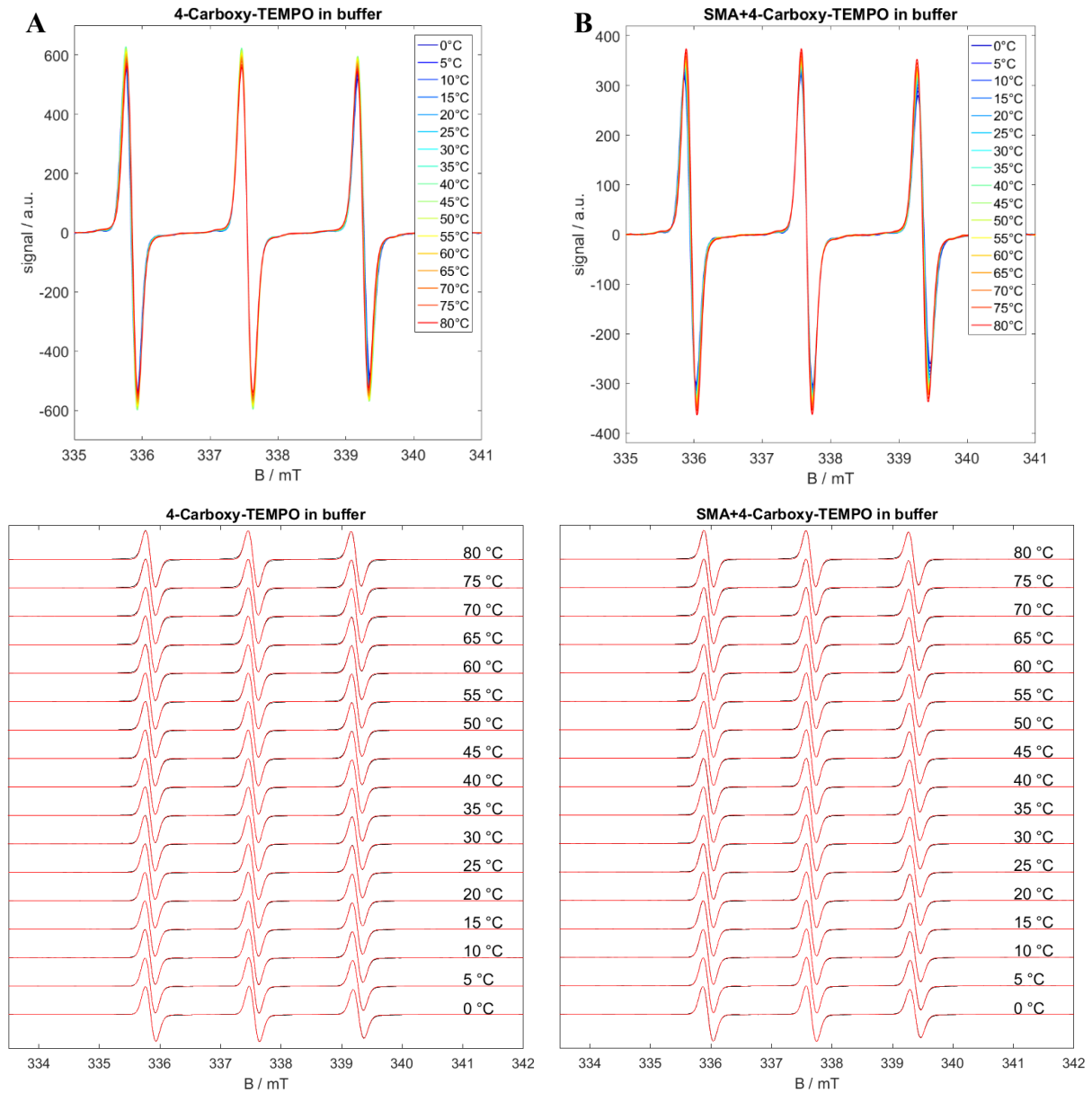


Abbildung 168 Temperaturabhängige CW-EPR-Spektren für (A) ausschließlich 4-Carboxy-TEMPO und (B) SMA mit 4-Carboxy-TEMPO in wässriger Pufferlösung. Die normalisierten experimentellen (schwarz) und simulierten (rot) Spektren sind im gestapelten Diagramm übereinandergelegt.

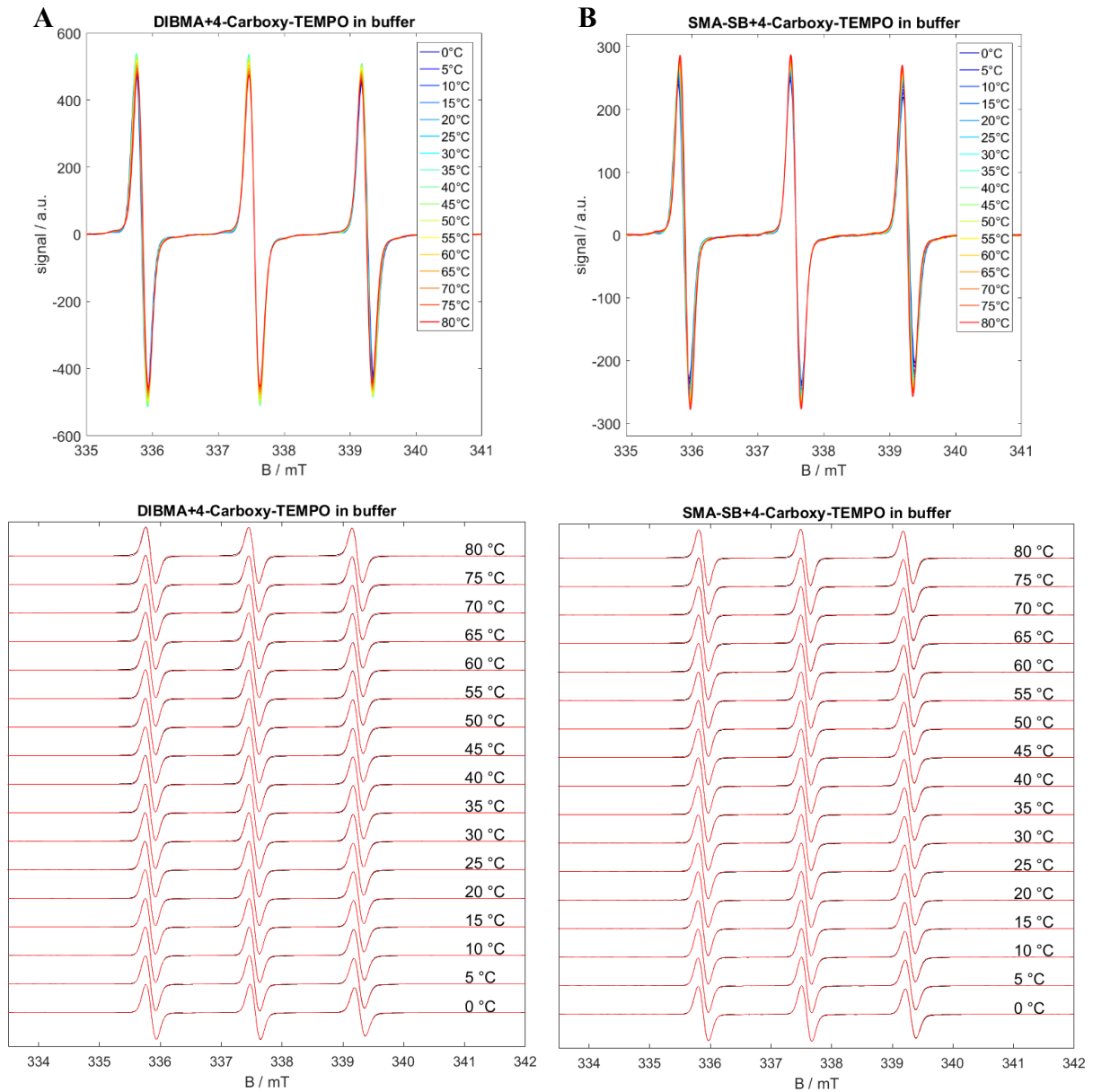


Abbildung 169 Temperaturabhängige CW-EPR-Spektren für (A) DIBMA und (B) SMA-SB mit 4-Carboxy-TEMPO in wässriger Pufferlösung. Die normalisierten experimentellen (schwarz) und simulierten (rot) Spektren sind im gestapelten Diagramm übereinandergelegt.

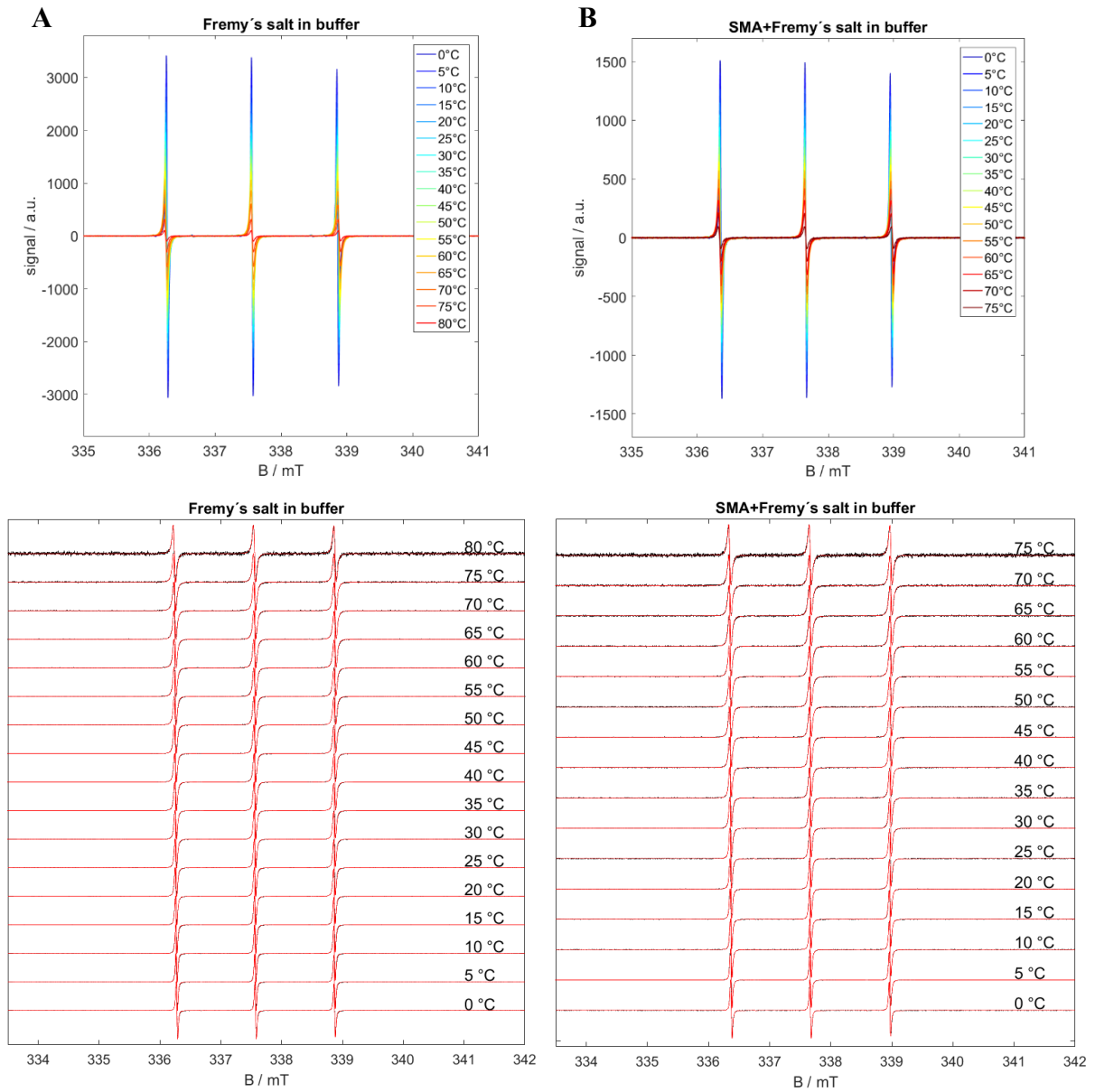


Abbildung 170 Temperaturabhängige CW-EPR-Spektren für (A) ausschließlich Fremysalz und (B) SMA mit Fremysalz in wässriger Pufferlösung. Die normalisierten experimentellen (schwarz) und simulierten (rot) Spektren sind in der gestapelten Darstellung übereinandergelegt.

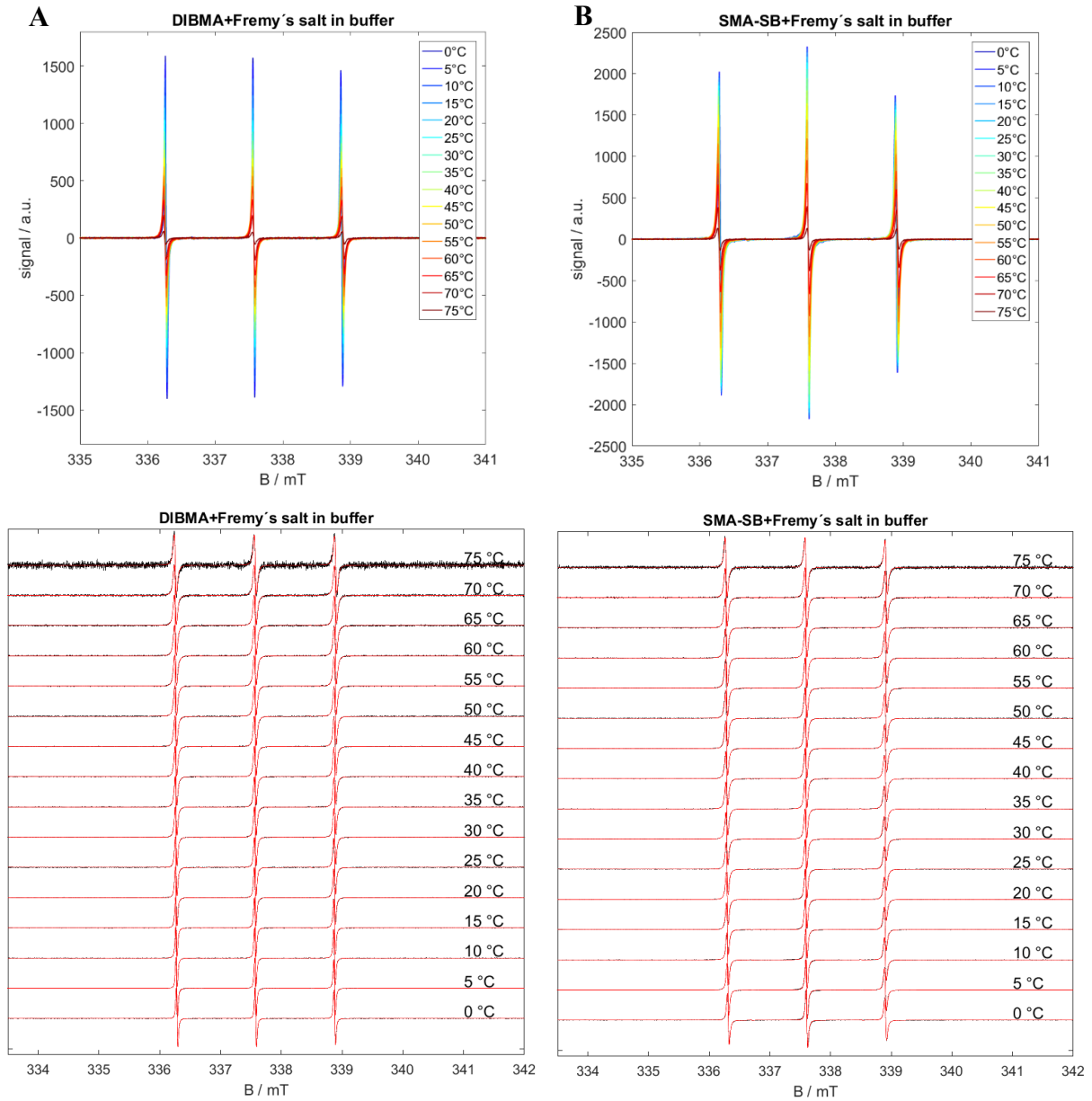


Abbildung 171 Temperaturabhängige CW-EPR-Spektren für (A) DIBMA und (B) SMA-SB mit Fremy-Salz in wässriger Pufferlösung. Die normalisierten experimentellen (schwarz) und simulierten (rot) Spektren sind im gestapelten Diagramm überlagert.

9. Verzeichnisse

9.1. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER EULER-WINKEL UND IHRE WIRKUNG BEI DER TRANSFORMATION DER KOORDINATENSYSTEM ¹⁷	6
ABBILDUNG 2 GRUNDSTRUKTUR EINES ÜBLICHEN NITROXID-SPINLABELS MIT DEM REST R (TEMPO, R=H) MIT EINGEZEICHNETEN HAUPTTENSORACHSEN UND DEREN TAUMELNDEN ROTATION ENTLANG DER ACHSEN ^{20,21}	7
ABBILDUNG 3 (A) DARSTELLUNG DER ROTATIONSFREIHEITEN DES NITROXIDES, HIER PROXYL; (B) ENERGIEAUFSPALTUNG EINES SPIN (OBEN), RESULTIERENDES ABSORPTIONSSPEKTRUM (MITTIG), DERIVAT DES ABSORPTIONSSPEKTRUMS (UNTEN); (C) VISUALISIERUNG DES A TENSORS UND DER ROTATIONSDYNAMIK EINES NITROXID-RADIKALS; GRAFIK VON BORDIGNON, BLEICKEN ²³	9
ABBILDUNG 4 STRUKTURFORMEL VON DIPALMITOYLPHOSPHATIDYLCHOLIN (DPPC) UND VISUALISIERUNG DER KEGELFORM BZW. KEGELSTUMPF FORM (HYDRODYNAMISCHE RAUMEINNAHME EINES LIPIDES).....	10
ABBILDUNG 5 DAS <i>FLUID MOSAIC MEMBRAN MODEL</i> VON 2014 VERDEUTLICH DIE KOMPLEXITÄT DER MEMBRAN UND IHRER VERNETZTHEIT IM ORGANISMUS. ¹ EIN AKTUALISIERTES FLUID-MOSAIC-MEMBRANMODELL, DAS INFORMATIONEN ÜBER MEMBRANDOMÄNENSTRUKTUREN UND MEMBRANASSOZIIERTE ZYTOSKELETT- UND EXTRAZELLULÄRE STRUKTUREN ENTHÄLT. VERSCHIEDENE INTEGRALE PROTEINE, GLYKOPROTEINE, LIPIDE UND OLIGOSACCHARIDE WERDEN DURCH UNTERSCHIEDLICHE FARBEN DARGESTELLT, UND DORT, WO DIE MEMBRAN ABGEZOGEN WURDE, UM DIE INNERE MEMBRAN ZU BETRACHTEN, IST DIE OBERFLÄCHE DES ZYTOSKELETTS ZU ERKENNEN, DASS DIE LATERALE DIFFUSION EINIGER, ABER NICHT ALLER TRANSMEMBRAN-GLYKOPROTEINE EINSCHRÄNKT.	11
ABBILDUNG 6 RECHTS: BILAYERPHASENSHEMA ADAPTIERT VON STARTEK ³⁰ ; LINKS: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER DPPC DSC-KURVE SAMT EINZEICHNUNG DER PHASEN,	12
ABBILDUNG 7 CHEMISCHE STRUKTUREN DER TYPISCHEN MENSCHLICHEN PNS-MEMBRANLIPIDE: GEHIRN L-A-PHOSPHATIDYLCHOLIN (PC), SCHWEINEHIRN L-A-PHOSPHATIDYLSERIN (PS), SCHWEINEHIRN L-A-PHOSPHATIDYLETHANOLAMIN (PE), SCHWEINEHIRN-SPHINGOMYELIN (SM), RINDERLEBER L-A-PHOSPHATIDYLINOSITOL (PI) UND SCHAFSWOLLCHOLESTERIN (CH); R STEHT FÜR EINE VARIABLE LIPIDKETTENZUSAMMENSETZUNG. ES HANDELT SICH UM NATÜRLICHE LIPIDE IN EINER MISCHUNG MIT EINER DURCHSCHNITTLICHEN FETTSÄUREVERTEILUNG.	14
ABBILDUNG 8 DARSTELLUNG DER STRUKTUR DER MONOMERE VON SMA, DIBMA UND SMA-SB, SAMT EINZEICHNUNG DER AN DER INTERAKTION MIT DER LIPIDMEMBRAN BETEILIGEN FUNKTIONELLEN GRUPPEN, ROT: POSITIV GELADEN; GELB: NEGATIV GELADEN; BLAU: LIPOPHILE GRUPPE	17
ABBILDUNG 9 REPRÄSENTATIVE ABSORPTIONSMESSUNG LINKS UND DER AUSWERTUNG UND DARSTELLUNG DES MIP RECHTS; FÜR DIE MESSUNG P2 WILDTYP AUF EINER PNS-MONOSCHICHT.....	19

ABBILDUNG 10 LINKS: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER LANGMUIR-POCKET-FILMWAAGE (OHNE BARRIEREN ZUR KOMPRESSION), RECHTS: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER KOMPRESSIIONSFILMWAAGE MIT EINEM EPIFLUORESZENZMIKROSKOPIEAUFBAU.....	20
ABBILDUNG 11 THEORETISCHE PHI-A ISOTHERME; KOMPRESSION EINES NICHT LÖSLICHEN LIPIDMONOLAYERS AUF EINER LUFT-WASSER-GRENZFLÄCHE ²²² SAMT SCHEMATISCHER DARSTELLUNG DER VERSCHIEDENEN ZUSTÄNDE DER MONOSCHICHT	21
ABBILDUNG 12 SCHEMATISCHER AUFBAU UND PRINZIP EINES EPIFLUORESZENZMIKROSKOP; 1 LICHTQUELLE, 2 ANREGUNGSLICHTFILTER, 3 DICHROITISCHEN SPIEGEL, 4 OBJEKTIV, 5 EMISSIONSFILTER, 6 EMCCD-KAMERA.....	22
ABBILDUNG 13 EMISSIONS-ABSORPTIONSSPEKTREN VON RHODAMIN B (RHOB-DHPE) UND ALEXA 488, JEWEILS BEI EMISSIONSWELLENLÄNGE 486 NM (BLAUER KANAL) UND 547 NM (GRÜNER KANAL) ²²³ ; BILDFARBEN: BLAU: EMISSIONSLICHT, ROT: DETEKTIONSBEREICHE; GRÜN EMISSIONSEFFEZIENZ, GELB: DETEKTIONSEFFIZIENZ.....	23
ABBILDUNG 14 SCHEMA DER BEZIEHUNGEN ZWISCHEN GEMESSENEN FLUKTUIERENDEN INTENSITÄTSSIGNALEN (LINKS) UND SCHEMA DER BEZIEHUNGEN ZWISCHEN GEMESSENEN FLUKTUIERENDEN INTENSITÄTSSIGNALEN (LINKS) UND INTENSITÄTSKORRELATIONSFUNKTIONEN G ₂ (T) (RECHTS) FÜR GROÙE UND KLEINE PARTIKEL MIT BASISLINIE C UND STEIGUNG B WIE IN GLEICHUNG 7 VERWENDET ⁷⁶	25
ABBILDUNG 15 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER OBERFLÄCHENPOTENTIALE EINES PARTIKELS ⁸¹	27
ABBILDUNG 16 LATERALE AUFNAHME DES ZEBRAFISCHNERVENSYSTEMS, A KONTROLLGRUPPE; B MORPHOLINO-GRUPPE (MO-GRUPPE), P2-GEN UNTERDRÜCKT; C MO-VARIANTE UND INJEKTION VON HUMANEM WTP2-GEN; D: MO-VARIANTE UND INJEKTION VON HUMANEM I43N-GEN ⁹⁵	31
ABBILDUNG 17 KRISTALLSTRUKTUR DES P2 MODELLIERT MIT PALMITAT ALS LIGAND, HELIXSTRUKTUR IN HELLGRÜN, B-STRÄNGE IN BLAUGRÜN. DARSTELLUNG DER DREI CMT1-ASSOZIIERTEN VARIANTEN; I43N AN B-STRANG B; I52T UND T51P AN B-STRANG C ⁷	32
ABBILDUNG 18 A MD-SIMULATION EINER MEMBRANBINDUNG; WILDTYP (BLAU), P38G (ORANGE) BEI DER MEMBRANBINDUNG WIRD ARG-88 ÜBER POPS-LIPIDE VERANKERT (ROT); ROT ANIONENBINDUNGSSTELLE, GRÜNER KREIS MUTATION VON P38G; LILA FETTSÄURE-LIGAND WIRD DURCH ÖFFNUNG DES A-HELIKALEN DECKELS FREIGEgeben.; B SCHEMATISCHES MODEL DER GITTERARTIGEN P2-ANRODUNG IN DER MYELINSCHIEDE; C: INTEGRALE (P0 UND PMP-22) UND PERIPHERE (P2 UND MBP) MEMBRANPROTEINE IM KOMPAKTEN PNS-MYELIN. ³⁹	34
ABBILDUNG 19 LINKS: KONFORMATIONSUNTERSCHIEDE BEI P2-VARIATION P38G MIT UND OHNE LIGAND; GRAU: P38G MIT LIGAND, HELLBLAU/BLAU OHNE LIGAND; ³⁹ RECHTS: AUSRICHTUNG DER CARBOXYLGRUPPE DER FETTSÄURE IM P2. VERDEUTLICHUNG DER WECHSELWIRKUNG DER CARBOXYLGRUPPE MIT ARG126 UND TYR 128, ALS AUCH DIE WECHSELWIRKUNG VON WASSER10 UND ARG106 ¹⁰¹	36
ABBILDUNG 20 LINKS STRUKTURFORMEL VON 5-DSA UND 16-DSA; RECHTS. X-BAND EPR SPEKTRUM VON REINEM 5-DSA (BLAU), 16-DSA (ROT).....	36
ABBILDUNG 21 CW EPR MESSUNG BEI 37°C, X-BAND FREQUENZEN P2-VARIANTEN 200µM MIT 5-DSA 20 µM .	37

ABBILDUNG 22 CWEPR SPEKTRUM BEI 37°C, X-BAND FREQUENZEN P2-VARIANTEN 200µM MIT 5-DSA 20 µM	38
ABBILDUNG 23 SIMULATIONEN DER CWEPR-MESSUNG (X-BAND): OBEN LINKS: GEGENÜBERSTELLUNG VON MESSUNG (BLAU) UND SIMULATION (ROT) BEI 200 µM P2 I52T UND 20 µM 5-DSA; LINKS UNTEN: DARSTELLUNG DER SPEKTRALEN KOMPONENTEN DER SIMULATION, ROT: FREIE KOMPONENTE, BLAU: INTERMEDIÄRE KOMPONENTE; GRÜN: FEST GEBUNDENE KOMPONENTE; RECHTS: GEGENÜBERSTELLUNG VON MESSUNG (BLAU) UND SIMULATION (ROT) P2 I52T KONZENTRATIONSSERIE UND 20 µM 5-DSA;....	39
ABBILDUNG 24 LINKS ABBILDUNG DER SPEKTRALEN SIMULIERTEN KOMPONENTEN IM X-BAND FREQUENZBEREICH, ROT FREIE KOMPONENTE, BLAU INTERMEDIÄR I, TÜRKIS INTERMEDIÄR II, GRÜN STARK GEBUNDENE KOMPONENTE; RECHTS: ISOTROPE HYPERFEINKOPPLUNGSKONSTANTEN, ROTATIONSKORRELATIONSZEITEN UND AUSTAUSCHFREQUENZEN DER KOMPONENTEN.	40
ABBILDUNG 25 DARSTELLUNG DER GEBUNDENEN SPEKTRALEN KOMPONENTEN DER P2 (WILDTYP UND VARIANTEN), BLAUE DREIECKE SYMBOLISIEREN DIE INTERMEDIÄRE KOMPONENTE, ROTE RAUTEN DIE STARK GEBUNDEN SPEKTRALKOMPONENTE. DIE SCHRAFFIERTEN FLÄCHEN ENTSPRECHEN DER SUMMIERTEN PROZENTWERTE AN GEBUNDENE- 5-DSA.....	42
ABBILDUNG 26 X-BAND CWEPR MESSUNG IM TEMPERATURBEREICH VON 0°C BIS 90°C, DARGESTELLT IN 10 K ABSTAND VON P38G 200µM UND 5-DSA 20µM;	44
ABBILDUNG 27 BINDUNGSKURVEN DER TEMPERATURREIHEN VON P2; DARSTELLUNG DER SPEKTRALEN KOMPONENTEN AUS DEN CWEPR-SIMULATIONEN VON 0°C BIS 90°C; P2 VARIANTE JE 200 µM, 5-DSA JE 20µM; SIGNALVERLUST DER EPR-SONDE WILDTYP: 90 °C; I43N: 60°C; I52T: 70 °C; P38G: 90 °C	46
ABBILDUNG 28 CHEMISCHE STRUKTUREN DER TYPISCHEN MENSCHLICHEN PNS-MEMBRANLIPIDE: SCHWEINEHIRN L-A-PHOSPHATIDYLCHOLIN (PC), SCHWEINEHIRN L-A-PHOSPHATIDYLSERIN (PS), SCHWEINEHIRN L-A-PHOSPHATIDYLETHANOLAMIN (PE), SCHWEINEHIRN-SPHINGOMYELIN (SM), RINDERLEBER L-A-PHOSPHATIDYLINOSITOL (PI) UND SCHAFSWOLLCHOLESTERIN (CH); R STEHT FÜR EINER LIPIDKETTE VARIABLER ZUSAMMENSETZUNG. ES HANDELT SICH UM NATÜRLICHE LIPIDE IN EINER MISCHUNG MIT EINER DURCHSCHNITTLICHEN FETTSÄUREVERTEILUNG.	52
ABBILDUNG 29 LINEARE REGRESSION DER WERTE AUS DEN OBERFLÄCHENADSPORTIONSMESSUNGEN; P38G 200 NM, BEI VERSCHIEDENEN INITIALEN OBERFLÄCHENDRÜCKEN.....	53
ABBILDUNG 30 REPRÄSENTATIVE EPIFLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN AUFNAHMEN DES KOMPRESSIVVERHALTENS DER MIT 0,05MOL% RHO-DHPE ERSETZT PNS-MYELIN-ÄHNLICHEN MONOSCHICHT AUF EINER HEPES-NACL-PUFFERSUBPHASE; A: 0 MN/M; B: 1,1 MN/M; C: 11,3 MN/M; D: 11,6 MN/M; E: 12,8 MN/M; F: 25,1 MN/M; G: 33 MN/M; H: 40,52 MN/M	57
ABBILDUNG 31 REPRÄSENTATIVE EPIFLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN AUFNAHMEN DES KOMPRESSIVVERHALTENS DER MIT 0,05MOL% RHO-DHPE VERSETZT PNS-MYELINARTIGEN MONOSCHICHT AUF EINER HEPES-NACL-PUFFERSUBPHASE UND NACH ZUGABE VON WILDTYP-P2 BEI 20 MN/M UND INKUBATION; VOR PROTEININJEKTION: A: 3,9 MN/M; B: 11,5 MN/M; C: 13,5 MN/M; D: 20 MN/M; NACH PROTEININJEKTION UND INKUBATION E: 22 MN/M; F-I: ~ 25 MN/M. PROTEININJEKTION ERFOLGT BEI 20 MN/M, KOMPRESSION WURDE ANGEHALTEN, DRUCKANSTIEG ERFOLGT DURCH DIE ADSORPTION DES PROTEIN, PFEILE ZEIGEN REGIONEN MIT VERMINDERTER RHO-B-DHPE-FLUORESZENZ („GRAUSCHLEIER“) AN, DIE AUF P2-HALTIGEN CLUSTER ZURÜCKZUFÜHREN SIND.....	59

- ABBILDUNG 32 REPRÄSENTATIVE EPIFLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN AUFNAHMEN DES KOMPRESSIVVERHALTENS DER PNS-MYELIN-ÄHNLICHEN MONOSCHICHT, GEMISCHT MIT 0,05MOL% RHO-DHPE AUF EINER HEPES-NACL-PUFFERSUBPHASE UND NACH ZUGABE DER P2 P38G-VARIANTE BEI 20 MN/M UND INKUBATION; VOR PROTEININJEKTION: A: 0,6 MN/M; B: 17,19 MN/M; NACH PROTEININJEKTION: C- I: ~ 25 MN/M; PROTEININJEKTION ERFOLGT BEI 20 MN/M, KOMPRESSION WURDE ANGEHALTEN, DRUCKANSTIEG ERFOLGT DURCH DIE ADSORPTION DES PROTEIN, PFEILE ZEIGEN REGIONEN MIT VERMINDERTER RHO-B-DHPE-FLUORESZENZ („GRAUSCHLEIER“) AN, DIE AUF P2-HALTIGEN CLUSTER ZURÜCKZUFÜHREN SIND. IN G, H, I SIND AUCH DUNKLE BEREICHE ZU SEHEN, DIE EINER PERLENKETTE ÄHNELN. DIESE BEREICHE SIND VERMUTLICH DURCH CLUSTER VON P38G..... 60
- ABBILDUNG 33 REPRÄSENTATIVE EPIFLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN AUFNAHMEN DES KOMPRESSIVVERHALTENS DER PNS-MYELIN-ÄHNLICHEN MONOSCHICHT, GEMISCHT MIT 0,05% RHO-DHPE AUF EINER HEPES-NACL-PUFFERSUBPHASE UND NACH ZUGABE DER P2 I43N-VARIANTE BEI 20 MN/M UND INKUBATION; A: 2. 78 MN/M; B: 5,45 MN/M; C: 12,43 MN/M; D: 17,42 MN/M; E - I: ~ 25 MN/M; PFEILE ZEIGEN REGIONEN MIT REDUZIERTER RHO-B-DHPE-FLUORESZENZ („GRAUER SCHLEIER“) AUFGRUND VON CLUSTERN, DIE DIE JEWEILIGEN 2-VARIANTEN ENTHALTEN 61
- ABBILDUNG 34 REPRÄSENTATIVE EPIFLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DES KOMPRESSIVVERHALTENS DER PNS-MYELIN-ÄHNLICHEN MONOSCHICHT, GEMISCHT MIT 0,05% RHO-DHPE AUF EINER HEPES-NACL-PUFFERSUBPHASE UND NACH ZUGABE DER P2 I52T-VARIANTE BEI 20 MN/M UND INKUBATION; VOR PROTEININJEKTION: A: 5,52 MN/M; B: 9,02 MN/M; NACH PROTEININJEKTION: C- I: ~ 25 MN/M. PROTEININJEKTION ERFOLGT BEI 20 MN/M, KOMPRESSION WURDE ANGEHALTEN, DRUCKANSTIEG ERFOLGT DURCH DIE ADSORPTION DES PROTEIN, PFEILE ZEIGEN REGIONEN MIT VERMINDERTER RHO-B-DHPE-FLUORESZENZ („GRAUSCHLEIER“) AN, DIE AUF P2-HALTIGEN CLUSTER ZURÜCKZUFÜHREN SIND..... 62
- ABBILDUNG 35 ZWEIFARB EXPERIMENT VON P2-VARIANTEN AN PNS-MYELINÄHNLICHE MEMBRAN ADSORBIERT. EPIFLUORESZENZ-FILMWAAGE-MIKROSKOPIE, A, B, C: P2 WT; D, E, F: P38G; G, H, I: I52T; J, K, L: I43N; A, D, G, J GRÜNER KANAL; B, E, H, K: BLAUER KANAL IN PNS- MONOSCHICHTEN BEI 25 MN/M; C, F, I, L: KOMBINATIONSBILD (FALSCHFARBENDARSTELLUNG) 64
- ABBILDUNG 36 EPIFLUORESZENZMIKROSKOPIE VON WILDTYP-P2 – DIE BILDERSERIE BZW. DAS BILDERMOZAİK VERANSCHAULICHT DER KOMPLEXEN VERNETZUNG DER JEWEILIGEN DOMÄNEN DURCH DAS PROTEIN. DIE AUFNAHMEN WURDE IM GRÜNEN KANAL MIT DEM LIPID FLUORESZENZFARBSTOFF RHO-B-DHPE 0,05MOL% AUFGENOMMEN..... 66
- ABBILDUNG 37 EPIFLUORESZENZMIKROSKOPIE VON WILDTYP-P2 – BILDERSERIE ZUR VERANSCHAULICHTUNG DER KOMPLEXEN VERNETZUNG DER JEWEILIGEN DOMÄNEN DURCH DAS PROTEIN. LINKS SIND ZWEI ABBILDUNGEN ZEIGEN AUSSCHNITTSWEISE AUFNAHMEN AUS DEM ALEXA488-FLUORESZENZMARKIERTEM P2-KONJUGANT IM BLAUEN KANAL, DIE WIEDERUM DIE KOINZIDENZ VON „GRAUEN SCHLEIERN“ IN RHO-B-DHPE-FLUORESZENZ MIT REGIONEN, DIE MARKIERTES P2 ENTHALTEN, ANZEIGEN. DAS RECHTE BILDERMOZAİK ZEIGT DIE GESAMTHEIT DER AUFNAHME AUF, P2 WILDTYP BILDET EINEN ZUSAMMENHÄNGEN, DOMÄNEN VERBINDENDEN CLUSTER 67

ABBILDUNG 38 MODELL FÜR P2 ZWISCHEN ZWEI MEMBRANEN. DER HELIKALE DECKEL UND DIE ANIONENBINDENDE STELLE INTERAGIEREN MIT DER MEMBRAN OBEN (BLAUE KUGELN), WÄHREND DER B-FASS, EINSCHLIEßLICH DER KONFORMATIONSÄNDERUNG IN DER B5-B6-SCHLEIFE, AN DIE UNTERE MEMBRAN (ORANGE) BINDET. DIE POSITIONEN DER LEU-RESTE 27, 32 UND 35 AN DER AUßENSEITE VON HELIX 2, PRO38 SOWIE DIE CMT-MUTATIONSSTELLEN 43 UND 51 SIND DURCH ZAHLEN GEKENNZEICHNET.....	68
ABBILDUNG 39 KRYOELEKTRONISCHENMIKROSKOPTISCHE DREIDIMENSIONALE REKONSTRUKTION DES RYR1-KANALS. LINKS OBEN: DRAUFSICHT, RECHTS OBEN: ANSICHT VON UNTEN, MITTIG: SEITENANSICHT DES PROTEINS IN DER MEMBRAN, DER TRANSMEMBRANÖSE AUFBAU (TA) ZEIGT IN RICHTUNG DES SARKOPLASMATISCHEN RETIKULUMS ¹⁵⁰	74
ABBILDUNG 40 LINKS XANTHINGRUNDKÖRPER MIT VARIABLEN SUBSTITUENTEN, RECHTS: 1,3,-DIMETHYLURACIL	75
ABBILDUNG 41 MECHANISMUS DER AMINIERUNG DES 8-BROMCOFFEINS (1) DURCH EINEN AMINOALKOHOL (2), MIT DEM ANIONISCHEN ZWISCHENPRODUKT (3), EINEM BROMID-ION ALS ABGANGSGRUPPE (4) UND (5) DEN PRODUKTEN (RYR-1,RYR-2)	78
ABBILDUNG 42 MECHANISMUS DER AMINIERUNG DES BROMETHANOL DURCH DAS THEOPHYLIN MIT DEM ANIONISCHEN ZWISCHENPRODUKT, EINEM BROMID-ION ALS ABGANGSGRUPPE UND DEM PRODUKT RYR-3	78
ABBILDUNG 43 REAKTIONSSCHEMA EINER KOPPLUNG NACH STEGLICH REAKTION VON RYR-1 UND CARBOXY-TEMPO ZUM EPR-AKTIVEN PRODUKT, RYR-5; ALLGEMEINGEFASSTE STEGLICH-REAKTION IST IM ANHANG ZU FINDEN.	80
ABBILDUNG 44 MECHANISMUS DER WILLIAMSON-ETHERSYNTHESE MIT DEM ANGREIFENDEN ALKOHOLAT-ION (1), DEM HALOGENALKAN (RYR-4) (2), DEM CHLORID-ION (3), ALS ABGANGSGRUPPE UND DEM ETHER (4) ALS PRODUKT, RYR-8	81
ABBILDUNG 45 EPR AKTIVE XANTHINDERIVATE: A 2-((1,3,7-TRIMETHYL-2,6-DIOXO-2,3,6,7-TETRAHYDRO-1H-PURIN-8YL)AMINO)ETHYL-2,2,6,6-TETRA-METHYLPYPERIDINE-1-OXYL-4-CARBOXYLATE; RYR-5 ; B 2-((1,3,7-TRIMETHYL-2,6-DIOXO-2,3,6,7-TETRAHYDRO-1H-PURIN-8YL)AMINO)PROPYL-2,2,6,6-TETRA-METHYLPYPERIDINE-1-OXYL-4-CARBOXYLATE; RYR-6 ; C 3-((1,3,7-TRIMETHYL-2,6-DIOXO-2,3,6,7-TETRAHYDRO-1H-PURIN-8-YL)AMINO)PROYPL-2,2,6,6-TETRAMETHYLPYPERIDINE-1-OXYL-4-CARBOXYLATE; RYR-7 ; D 1-(3-((2,2,6,6-TETRAMETHYLPYPERIDIN-1-OXYL-4-YL)OXY)PROPYL)-3,7-DIMETHYL-3,7-DIHYDRO-1H-PURINE-2,6DIONE RYR-8	82
ABBILDUNG 46 PLOTS DER τ_{c} – KORRELATIONSZEIT τ_{c} GEGEN GLYCEROL KONZENTRATION. A X BAND; CARBOXY-TEMPO UND XANTHIN-SONDEN MIT CARBOXY-TEMPO SPINLABEL; B X-BAND TEMPOL UND XANTHIN-SONDE MIT TEMPOL-SPINLABEL; C Q BAND; CARBOXY-TEMPO UND XANTHIN-SONDEN MIT CARBOXY-T	86
ABBILDUNG 47 LINKS: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ROTATIONSFREIHEITEN AN DER ESTERGRUPPE VON RYR-5; RECHTS: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES SPEKTRALEN (D-FRAME) ZUM REELLEN SYSTEM (G-FRAME) ÜBER DIE EULERHILFSWINKEL, DARGESTELLT VON XYZ (D-FRAME) IN ABC (G-FRAME) ¹⁸⁰	88

ABBILDUNG 48 STRUKTURFORMEL IN DER BEVORZUGTEN RINGKONFORMATION VON TEMPO (LINKS); TEMPONE (MITTE) UND TEMPOL (RECHTS) STRUKTUR GEMÄß DEN X-RAY DATEN VON HUNOLD ⁸	90
ABBILDUNG 49 GRAFISCHE DARSTELLUNG DES ENERGETISCHEN MINIMUMS DES RYR45, BERECHNUNG CHEM3D, TEMPOL-KÖRPER IN VERZERRTER WANNENKONFORMATION	91
ABBILDUNG 50 MOLEKULARE STRUKTUREN DER UNTERSUCHTEN NANODISC-BILDENDEN POLYMERE A) SMA-SB UND B) SMA MIT X = 2,2, M ≈ 8 SOWIE C) DIBMA MIT N ≈ 37. DIE FARBEN MARKIEREN VERSCHIEDENE MÖGLICHE WECHSELWIRKUNGSSTELLEN WIE FOLGT: ROT, IONISCHE WECHSELWIRKUNGEN; GELB, WASSERSTOFFBRÜCKENBINDUNGEN UND DIPOL/DIPOL-WECHSELWIRKUNGEN; DUNKELBLAU, π/π - WECHSELWIRKUNGEN; HELLBLAU, VAN-DER-WAALS-WECHSELWIRKUNGEN	95
ABBILDUNG 51 A) MASSEGEWICHTETE PARTIKELGRÖßENVERTEILUNG FÜR DIE REINEN POLYMER-LÖSUNGEN VON SMA UND DIBMA, GEMESSEN BEI 20 °C UND SMA-SB DARGESTELLT BEI 50 °C (OBERHALB SEINER UCST) IN WASSER (DURCHGEZOGENE LINIEN) SOWIE IN WÄSSRIGER PUFFERLÖSUNG (ALLE BEI 20 °C, GESTRICHELTE LINIEN); B) TEMPERATURABHÄNGIGE TRANSMISSION VON SMA-SB FÜR DIE TRÜBUNGSPUNKTBESTIMMUNG	98
ABBILDUNG 52 VERGLEICH AUSGEWÄHLTER SPINSONDEN HINSICHTLICH IHRER POLARITÄT UND GRÖßE, ANGEPASST AUS JESCHKE ¹⁸⁵ . DIE FARBEN MARKIEREN ÄHNLICHE WECHSELWIRKUNGSSTELLEN WIE IN ABBILDUNG 50.....	99
ABBILDUNG 53 CW-EPR-SPEKTREN BEI 20 °C VON A,B) TEMPO, C,D) CAT-1, UND E,F) FREMY'S SALZ IN WASSER (REFERENZMESSUNGEN) SOWIE MIT SMA, DIBMA, BZW. SMA-SB. A, C, E) DIE X-BAND-SPEKTREN ZEIGEN DIE VOLLSTÄNDIGEN SPEKTREN UND HEBEN DIE HOCHFELD-PEAKS HERVOR. B, D, F) BEI Q-BAND- FREQUENZEN WERDEN NUR DIE VOLLSTÄNDIGEN SPEKTREN DARGESTELLT	107
ABBILDUNG 54 CW-EPR-SPEKTREN BEI 20 °C VON A,B) TEMPO, C,D) CAT-1, UND E,F) FREMY'S SALZ IN WÄSSRIGER PUFFERLÖSUNG SOWIE MIT SMA, DIBMA, BZW. SMA-SB. A, C, E) DIE X-BAND-SPEKTREN ZEIGEN DIE VOLLSTÄNDIGEN SPEKTREN UND HEBEN DIE HOCHFELD-PEAKS HERVOR. B, D, F) BEI Q-BAND- FREQUENZEN WERDEN NUR DIE VOLLSTÄNDIGEN SPEKTREN DARGESTELLT	108
ABBILDUNG 55 ERGEBNISSE VON SPEKTRALSIMULATIONEN VON TEMPERATURABHÄNGIGEN CW-EPR- SPEKTREN, GEMESSEN BEI X-BAND-FREQUENZEN VON A) 4-CARBOXY-TEMPO UND B-D) 4-OXO-TEMPO MIT ALLEN POLYMEREN IN WASSER. TEMPERATURABHÄNGIGKEIT VON A, B) τ_C , C) GISO, UND D) DER LINIENBREITE.	109
ABBILDUNG 56 TEMPERATURABHÄNGIGE X-BAND-CW-EPR-SPEKTREN VON A) 4-OXO-TEMPO UND B) CAT-1 MIT SMA-SB. AUF DER RECHTEN SEITE IST DER HOCHFELDPEAK SEPARAT DARGESTELLT	110
ABBILDUNG 57 TEMPERATURABHÄNGIGES τ_C , GEMESSEN BEI X-BAND-FREQUENZEN VON A) TEMPO UND B) CAT-1 IN ALLEN UNTERSUCHTEN SYSTEMEN IN WASSER.	112
ABBILDUNG 58 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER WICHTIGSTEN WECHSELWIRKUNGS-MUSTER ZWISCHEN AUSGEWÄHLTEN NITROXIDRADIKALEN UND DEN DREI UNTERSUCHTEN POLYMEREN SMA, DIBMA, UND SMA-SB, WIE SIE IN DIESER STUDIE GEFUNDEN WURDEN. DIE FARBEN DER PFEILE, DIE ANZIEHENDE ODER ABSTOßENDE KRÄFTE VISUALISIEREN ENTSPRECHEN DENEN IN ABBILDUNG 50. ROT, IONISCHE WECHSELWIRKUNGEN; GELB WASSERSTOFFBRÜCKENBINDUNGEN UND DIPOL/DIPOL-	

WECHSELWIRKUNGEN; DUNKELBLAU Π / Π -WECHSELWIRKUNGEN; HELLBLAU, VAN DER WAALS	
WECHSELWIRKUNGEN.....	115
ABBILDUNG 59 DARSTELLUNG DES GEBUNDENEN ANTEILS AN 16-DSA; BEI X-BAND FREQUENZEN IM CWEPR; BEI 20 μ M 16-DSA ZU JE 200 μ M PROTEIN.....	131
ABBILDUNG 60 DARSTELLUNG DER SIMULATIONEN GEGEN MESSUNG UND RECHTS VISUALISIERUNG DER SPEKTRALKOMPONENTEN FÜR P2 WILDTYP UND P2 I43N BEI DEN MESSUNGEN VON 37°C	132
ABBILDUNG 61 DARSTELLUNG DER SIMULATIONEN GEGEN MESSUNG UND RECHTS VISUALISIERUNG DER SPEKTRALKOMPONENTEN FÜR P2 I52T UND P2 P38G BEI DEN MESSUNGEN VON 37°C	133
ABBILDUNG 62 DARSTELLUNG DER CWEPR-MESSUNG (MANGENTA) UND DIE DAZUGEHÖRIGEN SIMULIERTEN CWEPR-SPEKTREN (BLAU) FÜR 5-DSA BEI 20 μ M MIT STEIGENDER KONZENTRATION DES P2 WILDTYP VON 0 μ M BIS 200 μ M BEI 37°C.....	134
ABBILDUNG 63 DARSTELLUNG DER CWEPR-MESSUNG (MANGENTA) UND DIE DAZUGEHÖRIGEN SIMULIERTEN CWEPR-SPEKTREN (BLAU) FÜR 5-DSA BEI 20 μ M MIT STEIGENDER KONZENTRATION DES P2 I43N VON 0 μ M BIS 200 μ M BEI 37°C.....	135
ABBILDUNG 64 DARSTELLUNG DER CWEPR-MESSUNG (MANGENTA) UND DIE DAZUGEHÖRIGEN SIMULIERTEN CWEPR-SPEKTREN (BLAU) FÜR 5-DSA BEI 20 μ M MIT STEIGENDER KONZENTRATION DES P2 P38G VON 0 μ M BIS 200 μ M BEI 37°C.....	136
ABBILDUNG 65 DARSTELLUNG DER CWEPR-MESSUNG (MANGENTA) UND DIE DAZUGEHÖRIGEN SIMULIERTEN CWEPR-SPEKTREN (BLAU) FÜR 5-DSA BEI 20 μ M MIT STEIGENDER KONZENTRATION DES P2 I52T VON 0 μ M BIS 200 μ M BEI 37°C	137
ABBILDUNG 66 DARSTELLUNG DER TEMPERATURREIHE VON 200 μ M P2WT MIT 20 μ M 5-DSA, X-BAND-CWEPR- MESSUNGEN (MANGENTA), SIMULATIONEN DER CWEPR-MESSUNG (BLAU)	138
ABBILDUNG 67 DARSTELLUNG DER TEMPERATURREIHE VON 200 μ M P2 I43N MIT 20 μ M 5-DSA, X-BAND CWEPR-MESSUNGEN (MANGENTA), SIMULATIONEN DER CWEPR-MESSUNG (BLAU)	139
ABBILDUNG 68 DARSTELLUNG DER TEMPERATURREIHE VON 200 μ M P2 I52T MIT 20 μ M 5-DSA, X-BAND CWEPR-MESSUNGEN (MANGENTA), SIMULATIONEN DER CWEPR-MESSUNG (BLAU)	140
ABBILDUNG 69 DARSTELLUNG DER TEMPERATURREIHE VON 200 μ M P2 P38G MIT 20 μ M 5-DSA, X-BAND CWEPR-MESSUNGEN (MANGENTA), SIMULATIONEN DER CWEPR-MESSUNG (BLAU)	141
ABBILDUNG 70 DARSTELLUNG DER CWEPR-MESSUNG (MANGENTA) UND DIE DAZUGEHÖRIGEN SIMULIERTEN CWEPR-SPEKTREN (BLAU) FÜR 16-DSA BEI 20 μ M MIT STEIGENDER KONZENTRATION DES P2 I43 VON 0 μ M BIS 200 μ M BEI 37°C	142
ABBILDUNG 71 DARSTELLUNG DER CWEPR-MESSUNG (MANGENTA) UND DIE DAZUGEHÖRIGEN SIMULIERTEN CWEPR-SPEKTREN (BLAU) FÜR 5-DSA BEI 20 μ M MIT STEIGENDER KONZENTRATION DES P2 I52TVON 0 μ M BIS 200 μ M BEI 37°C	143
ABBILDUNG 72 DARSTELLUNG DER CWEPR-MESSUNG (MANGENTA) UND DIE DAZUGEHÖRIGEN SIMULIERTEN CWEPR-SPEKTREN (BLAU) FÜR 5-DSA BEI 20 μ M MIT STEIGENDER KONZENTRATION DES P2 WILDTYP VON 0 μ M BIS 200 μ M BEI 37°C.....	144

ABBILDUNG 73 DARSTELLUNG DER CWEPR-MESSUNG (MANGENTA) UND DIE DAZUGEHÖRIGEN SIMULIERTEN CWEPR-SPEKTREN (BLAU) FÜR 5-DSA BEI 20 μ M MIT STEIGENDER KONZENTRATION DES P2 P38G VON 0 μ M BIS 200 μ M BEI 37°C.....	145
ABBILDUNG 74 HILL FIT UND DARSTELLUNG GESAMT GEBUNDEN 5/16-DSA IN PROZENT (AUS CWEPR X-BAND SIMULATIONEN, MESSUNGEN BEI 37°C) AUFGETRAGEN GEGEN DIE STEIGENDE KONZENTRATION VON P2 WILDTP;	146
ABBILDUNG 75 HILL FIT UND DARSTELLUNG GESAMT GEBUNDEN 5/16-DSA IN PROZENT (AUS CWEPR X-BAND SIMULATIONEN, MESSUNGEN BEI 37°C) AUFGETRAGEN GEGEN DIE STEIGENDE KONZENTRATION VON P2 I43N;	147
ABBILDUNG 76 HILL FIT UND DARSTELLUNG GESAMT GEBUNDEN 5/16-DSA IN PROZENT (AUS CWEPR X-BAND SIMULATIONEN, MESSUNGEN BEI 37°C) AUFGETRAGEN GEGEN DIE STEIGENDE KONZENTRATION VON P2 I52T;	148
ABBILDUNG 77 HILL FIT UND DARSTELLUNG GESAMT GEBUNDEN 5/16-DSA IN PROZENT (AUS CWEPR X-BAND SIMULATIONEN, MESSUNGEN BEI 37°C) AUFGETRAGEN GEGEN DIE STEIGENDE KONZENTRATION VON P2 P38G;	149
ABBILDUNG 78 LINKS: OBERFLÄCHENDRUCKMESSUNGEN AN EINER LANGMUIR-FILMBALANCE MIT KONSTANTER OBERFLÄCHE NACH INJEKTION VON P2-VARIANTEN UNTER EINER PNS-MYELIN-ÄHNLICHEN LIPID-MONOLAYER MIT VARIABLEN ANFANGSOBERFLÄCHENDRÜCKEN (Π_{ini}). RECHTS: DARSTELLUNG DES ANFÄNGLICHEN OBERFLÄCHENDRUCKS GEGEN DEN OBERFLÄCHENDRUCK NACH DER ÄQUILIBRIERUNG UND LINEARE REGRESSION (ROTE LINIE); VON OBEN NACH UNTEN: P2 WILDTP; P2 I43N; P2 I52T; P2 P38G	150
ABBILDUNG 79 DRUCK-FLÄCHEN-ISOTHERME EPIFLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN AUFNAHMEN VON ABBILDUNG 30 ZUM KOMPRESSIVVERHALTENS DER PNS-MONOSCHICHT VERSETZT MIT 0,05MOL% RHO-B-DHPE AUF EINER HEPES-NACL-PUFFER-SUBPHASE	151
ABBILDUNG 80 VERGLEICH DER ISOTHERMEN DES KOMPRESSIVVERHALTENS DER PNS-MONOSCHICHT MIT UND OHNE ZUGABE VON 0,05MOL% RHO-B-DHPE AUF EINER HEPES-NACL-PUFFER-SUBPHASE	152
ABBILDUNG 81 DRUCK-FLÄCHEN-ISOTHERME EPIFLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN AUFNAHMEN VON ABBILDUNG 31 ZUM KOMPRESSIVVERHALTENS DER PNS-MONOSCHICHT VERSETZT MIT 0,05MOL% RHO-B-DHPE UND P2 WILDTP PROTEININJEKTION BEI 20 MN/M AUF EINER HEPES-NACL-PUFFER-SUBPHASE; KOMPRESSIV DES FILMES BIS 20 MN/M, DANN PROTEININJEKTION UND INKUBATION; ERNEUTER START DER KOMPRESSIV BEI 26 MN/M BIS ZUM KOLLAPS DES FILMES. DRUCKDIFFERENZ ZWISCHEN 20 MN/M BIS 26 MN/M DURCH PROTEINADSORPTION AN MONOSCHICHT.	153
ABBILDUNG 82 DRUCK-FLÄCHEN-ISOTHERME EPIFLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN AUFNAHMEN VON ABBILDUNG 34 ZUM KOMPRESSIVVERHALTENS DER PNS-MONOSCHICHT VERSETZT MIT 0,05MOL% RHO-B-DHPE UND P2 I52T PROTEININJEKTION BEI 20 MN/M AUF EINER HEPES-NACL-PUFFER-SUBPHASE; KOMPRESSIV DES FILMES BIS 20 MN/M, DANN PROTEININJEKTION UND INKUBATION; ERNEUTER START DER KOMPRESSIV BEI 29 MN/M BIS ZUM KOLLAPS DES FILMES. DRUCKDIFFERENZ ZWISCHEN 20 MN/M BIS 29 MN/M DURCH PROTEINADSORPTION AN MONOSCHICHT.	154

- ABBILDUNG 83 DRUCK-FLÄCHEN-ISOTHERME EPIFLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN AUFNAHMEN VON
 ABBILDUNG 33 ZUM KOMPRESSIONSVERHALTENS DER PNS-MONOSCHICHT VERSETZT MIT 0,05MOL%
 RHO-B-DHPE UND P2 I43N PROTEININJEKTION BEI 20 MN/M AUF EINER HEPES-NACL-PUFFER-SUBPHASE;
 KOMPRESSION DES FILMES BIS 20 MN/M, DANN PROTEININJEKTION UND INKUBATION; ERNEUTER START
 DER KOMPRESSION BEI 27 MN/M BIS ZUM KOLLAPS DES FILMES. DRUCKDIFFERENZ ZWISCHEN 20 MN/M
 BIS 27 MN/M DURCH PROTEINADSORPTION AN MONOSCHICHT. 155
- ABBILDUNG 84 DRUCK-FLÄCHEN-ISOTHERME EPIFLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN AUFNAHMEN VON
 ABBILDUNG 32 ZUM KOMPRESSIONSVERHALTENS DER PNS-MONOSCHICHT VERSETZT MIT 0,05MOL%
 RHO-B-DHPE UND P2 P38G PROTEININJEKTION BEI 20 MN/M AUF EINER HEPES-NACL-PUFFER-SUBPHASE;
 KOMPRESSION DES FILMES BIS 20 MN/M, DANN PROTEININJEKTION UND INKUBATION; ERNEUTER START
 DER KOMPRESSION BEI 30 MN/M BIS ZUM KOLLAPS DES FILMES. DRUCKDIFFERENZ ZWISCHEN 20 MN/M
 BIS 30 MN/M DURCH PROTEINADSORPTION AN MONOSCHICHT. 156
- ABBILDUNG 85 DRUCK-FLÄCHEN-ISOTHERME EPIFLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN AUFNAHMEN VON
 ABBILDUNG 35 ZUM KOMPRESSIONSVERHALTENS DER PNS-MONOSCHICHT VERSETZT MIT 0,05MOL%
 RHO-B-DHPE UND P2 WILDTP + P2 WILDTP ALEXA 488 KONJUGAT PROTEININJEKTION BEI 20 MN/M
 AUF EINER HEPES-NACL-PUFFER-SUBPHASE; KOMPRESSION DES FILMES BIS 20 MN/M, DANN
 PROTEININJEKTION UND INKUBATION; ERNEUTER START DER KOMPRESSION BEI 26 MN/M BIS ZUM
 KOLLAPS DES FILMES. DRUCKDIFFERENZ ZWISCHEN 20 MN/M BIS 26 MN/M DURCH
 PROTEINADSORPTION AN MONOSCHICHT. 157
- ABBILDUNG 86 DRUCK-FLÄCHEN-ISOTHERME EPIFLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN AUFNAHMEN VON
 ABBILDUNG 35 ZUM KOMPRESSIONSVERHALTENS DER PNS-MONOSCHICHT VERSETZT MIT 0,05MOL%
 RHO-B-DHPE UND P2 I43N + P2 I43N ALEXA 488 KONJUGAT PROTEININJEKTION BEI 20 MN/M AUF EINER
 HEPES-NACL-PUFFER-SUBPHASE; KOMPRESSION DES FILMES BIS 20 MN/M, DANN PROTEININJEKTION
 UND INKUBATION; ERNEUTER START DER KOMPRESSION BEI 26 MN/M BIS ZUM KOLLAPS DES FILMES.
 DRUCKDIFFERENZ ZWISCHEN 20 MN/M BIS 26 MN/M DURCH PROTEINADSORPTION AN MONOSCHICHT.
 158
- ABBILDUNG 87 DRUCK-FLÄCHEN-ISOTHERME EPIFLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN AUFNAHMEN VON
 ABBILDUNG 35 ZUM KOMPRESSIONSVERHALTENS DER PNS-MONOSCHICHT VERSETZT MIT 0,05MOL%
 RHO-B-DHPE UND P2 I52T + P2 I52T ALEXA 488 KONJUGAT PROTEININJEKTION BEI 20 MN/M AUF EINER
 HEPES-NACL-PUFFER-SUBPHASE; KOMPRESSION DES FILMES BIS 20 MN/M, DANN PROTEININJEKTION
 UND INKUBATION; ERNEUTER START DER KOMPRESSION BEI 26 MN/M BIS ZUM KOLLAPS DES FILMES.
 DRUCKDIFFERENZ ZWISCHEN 20 MN/M BIS 26 MN/M DURCH PROTEINADSORPTION AN MONOSCHICHT.
 159
- ABBILDUNG 88 DRUCK-FLÄCHEN-ISOTHERME EPIFLUORESZENZMIKROSKOPISCHEN AUFNAHMEN VON
 ABBILDUNG 35 ZUM KOMPRESSIONSVERHALTENS DER PNS-MONOSCHICHT VERSETZT MIT 0,05MOL%
 RHO-B-DHPE UND P2 P38G + P2 P38G ALEXA 488 KONJUGAT PROTEININJEKTION BEI 20 MN/M AUF
 EINER HEPES-NACL-PUFFER-SUBPHASE; KOMPRESSION DES FILMES BIS 20 MN/M, DANN
 PROTEININJEKTION UND INKUBATION; ERNEUTER START DER KOMPRESSION BEI 28 MN/M BIS ZUM

KOLLAPS DES FILMES. DRUCKDIFFERENZ ZWISCHEN 20 MN/M BIS 28 MN/M DURCH	
PROTEINADSORPTION AN MONOSCHICHT.	160
ABBILDUNG 89 ¹ H-NMR-SPEKTRUM (500 MHZ, CD ₃ OD) VON RYR-1.	170
ABBILDUNG 90 IR-SPEKTRUM VON RYR-1.	170
ABBILDUNG 91 MASSENSPEKTROGRAMM MIT POSITIVER IONISIERUNG FÜR RYR-1.	171
ABBILDUNG 92 MASSENSPEKTROGRAMM MIT NEGATIVER IONISIERUNG FÜR RYR-1.	171
ABBILDUNG 93 ¹ H-NMR-SPEKTRUM (400 MHZ, CD ₃ OD) VON RYR-2.	172
ABBILDUNG 94 IR-SPEKTRUM VON RYR-2.	172
ABBILDUNG 95 MASSENSPEKTROGRAMM MIT POSITIVER IONISIERUNG FÜR RYR-2.	173
ABBILDUNG 96 MASSENSPEKTROGRAMM MIT NEGATIVER IONISIERUNG FÜR RYR-2.	173
ABBILDUNG 97 ¹ H-NMR-SPEKTRUM (400 MHZ, CDCl ₃) VON RYR-3.	174
ABBILDUNG 98 IR-SPEKTRUM VON RYR-3.	174
ABBILDUNG 99 MASSENSPEKTROGRAMM MIT POSITIVER IONISIERUNG FÜR RYR-3.	175
ABBILDUNG 100 MASSENSPEKTROGRAMM MIT NEGATIVER IONISIERUNG FÜR RYR-3.	175
ABBILDUNG 101 ¹ H-NMR-SPEKTRUM (400 MHZ, CDCl ₃) VON RYR-4.	176
ABBILDUNG 102 IR-SPEKTRUM VON RYR-4.	176
ABBILDUNG 103 MASSENSPEKTROGRAMM MIT POSITIVER IONISIERUNG FÜR RYR-4.	177
ABBILDUNG 104 MASSENSPEKTROGRAMM MIT NEGATIVER IONISIERUNG FÜR RYR-4.	177
ABBILDUNG 105 ¹ H-NMR-SPEKTRUM (400 MHZ, CDCl ₃) VON RYR-5.	178
ABBILDUNG 106 IR-SPEKTRUM VON RYR-5.	178
ABBILDUNG 107 MASSENSPEKTROGRAMM MIT POSITIVER IONISIERUNG FÜR RYR-5.	179
ABBILDUNG 108 MASSENSPEKTROGRAMM MIT NEGATIVER IONISIERUNG FÜR RYR-5.	179
ABBILDUNG 109 ¹ H-NMR-SPEKTRUM (400 MHZ, CDCl ₃) VON RYR-6.	180
ABBILDUNG 110 IR-SPEKTRUM VON RYR-6.	180
ABBILDUNG 111 MASSENSPEKTROGRAMM MIT POSITIVER IONISIERUNG FÜR RYR-6.	181
ABBILDUNG 112 MASSENSPEKTROGRAMM MIT NEGATIVER IONISIERUNG FÜR RYR-6.	181
ABBILDUNG 113 ¹ H-NMR-SPEKTRUM (400 MHZ, CDCl ₃) VON RYR-7.	182
ABBILDUNG 114 IR-SPEKTRUM VON RYR-7.	182
ABBILDUNG 115 MASSENSPEKTROGRAMM MIT POSITIVER IONISIERUNG FÜR RYR-7.	183
ABBILDUNG 116 MASSENSPEKTROGRAMM MIT NEGATIVER IONISIERUNG FÜR RYR-7.	183
ABBILDUNG 117 ¹ H-NMR-SPEKTRUM (400 MHZ, CDCl ₃) VON RYR-8.	184
ABBILDUNG 118 IR-SPEKTRUM VON RYR-8.	184
ABBILDUNG 119 MASSENSPEKTROGRAMM MIT POSITIVER IONISIERUNG FÜR RYR-8.	185
ABBILDUNG 120 MASSENSPEKTROGRAMM MIT NEGATIVER IONISIERUNG FÜR RYR-8.	185
ABBILDUNG 121 CWEPR X-BAND MESSUNG VON CARBOXY-TEMPO, RYR-5, RYR-6, RYR-7 BEI 20 μM	
LABELKONZENTRATION IN MILIQ BEI VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION.	186
ABBILDUNG 122 CWEPR X-BAND MESSUNG VON TEMPOL, RYR-8 BEI 20 μM LABELKONZENTRATION IN MILIQ	
BEI VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION.	187

ABBILDUNG 123 CWEPR X-BAND MESSUNG VON CARBOXY-TEMPO, RYR-5, RYR-6, RYR-7 BEI 50 μM LABELKONZENTRATION IN MILIQ BEI VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION.....	188
ABBILDUNG 124 CWEPR X-BAND MESSUNG VON TEMPOL, RYR-8, BEI 50 μM LABELKONZENTRATION IN MILIQ BEI VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION	189
ABBILDUNG 125 CWEPR X-BAND MESSUNG VON CARBOXY-TEMPO, RYR-5, RYR-6, RYR-7 BEI 100 μM LABELKONZENTRATION IN MILIQ BEI VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION.....	190
ABBILDUNG 126 CWEPR X-BAND MESSUNG VON TEMPOL, RYR-8 BEI 100 μM LABELKONZENTRATION IN MILIQ BEI VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION	191
ABBILDUNG 127 EXPERIMENTELLE (SCHWARZ) UND SIMULIERTE (ROT) CWEPR-SPEKTREN X-BAND FÜR RYR-5 BEI 100 μM UND VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION.....	192
ABBILDUNG 128 EXPERIMENTELLE (SCHWARZ) UND SIMULIERTE (ROT) CWEPR-SPEKTREN X-BAND FÜR RYR-6 BEI 100 μM UND VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION.....	193
ABBILDUNG 129 EXPERIMENTELLE (SCHWARZ) UND SIMULIERTE (ROT) CWEPR-SPEKTREN X-BAND FÜR RYR-7 BEI 100 μM UND VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION.....	194
ABBILDUNG 130 EXPERIMENTELLE (SCHWARZ) UND SIMULIERTE (ROT) CWEPR-SPEKTREN X-BAND FÜR RYR-8 BEI 100 μM UND VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION.....	195
ABBILDUNG 131 CWEPR Q-BAND MESSUNG VON CARBOXY-TEMPO, RYR-5, RYR-6, RYR-7 BEI 100 μM LABELKONZENTRATION IN MILIQ BEI VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION.....	196
ABBILDUNG 132 CWEPR Q-BAND MESSUNG VON TEMPOL, RYR-8 BEI 100 μM LABELKONZENTRATION IN MILIQ BEI VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION	197
ABBILDUNG 133 EXPERIMENTELLE (SCHWARZ) UND SIMULIERTE (ROT) CWEPR-SPEKTREN Q-BAND FÜR CARBOXY-TEMPO BEI 100 μM UND VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION	198
ABBILDUNG 134 EXPERIMENTELLE (SCHWARZ) UND SIMULIERTE (ROT) CWEPR-SPEKTREN Q-BAND FÜR TEMPOL BEI 100 μM UND VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION	199
ABBILDUNG 135 EXPERIMENTELLE (SCHWARZ) UND SIMULIERTE (ROT) CWEPR-SPEKTREN Q-BAND FÜR RYR-5 BEI 100 μM UND VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION.....	200
ABBILDUNG 136 EXPERIMENTELLE (SCHWARZ) UND SIMULIERTE (ROT) CWEPR-SPEKTREN Q-BAND FÜR RYR-6 BEI 100 μM UND VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION.....	201
ABBILDUNG 137 EXPERIMENTELLE (SCHWARZ) UND SIMULIERTE (ROT) CWEPR-SPEKTREN Q-BAND FÜR RYR-7 BEI 100 μM UND VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION.....	202
ABBILDUNG 138 EXPERIMENTELLE (SCHWARZ) UND SIMULIERTE (ROT) CWEPR-SPEKTREN Q-BAND FÜR RYR-8 BEI 100 μM UND VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION.....	203
ABBILDUNG 139 GRAFISCHE DARSTELLUNG DES VERHÄLTNIS VON MIDDELFIELD PEAK GEGEN HIGH FIELD PEAK - X BAND MESSUNGEN CARBOXY-TEMPO GEGEN RYR5, RYR6, RYR7 UND TEMPOL GEGEN RYR-8.....	212
ABBILDUNG 140 DYNAMISCHE LICHTSTREUUNGSERGEBNISSE ALLER POLYMERE IN (A) WASSER UND (B) SALZHALTIGEM TRIS-PUFFER (50 MM PUFFERSALZ UND 300 MM NaCl). DARGESTELLT SIND DIE INTENSITÄTS-ZEIT-KORRELATIONSFUNKTIONEN MIT DEN JEWEILIGEN MASSENGEWICHTETEN GRÖßENVERTEILUNGSFUNKTIONEN. ALLE MESSUNGEN WURDEN BEI 20 °C DURCHFÜHRT, MIT	

AUSNAHME VON SMA-SB IN WASSER, DAS OBERHALB SEINER UCST BEI 50 °C GEMESSEN WURDE, UM NUR VOLLSTÄNDIG GELÖSTES POLYMER ZU BEOBACHTEN.....	217
ABBILDUNG 141 INTENSITÄTS-ZEIT-KORRELATIONSFUNKTION VON SMA-SB UNTERHALB (SCHWARZ) UND OBERHALB (ROT) SEINER UCST.....	217
ABBILDUNG 142 EXPERIMENTELLE (SCHWARZ) UND SIMULIERTE (ROT) CWEPR-SPEKTREN BEI (A) X-BAND- UND (B) Q-BAND-FREQUENZEN FÜR SPIN-SONDE-TEMPO IN WASSER.	218
ABBILDUNG 143 EXPERIMENTELLE (SCHWARZ) UND SIMULIERTE (ROT) CWEPR-SPEKTREN BEI (A) X-BAND- UND (B) Q-BAND-FREQUENZEN FÜR DIE SPINPROBE 4-OXO-TEMPO IN WASSER.	219
ABBILDUNG 144 EXPERIMENTELLE (SCHWARZ) UND SIMULIERTE (ROT) CW-EPR-SPEKTREN BEI (A) X-BAND- UND (B) Q-BAND-FREQUENZEN FÜR SPIN-SONDE CAT-1 IN WASSER.....	221
ABBILDUNG 145 EXPERIMENTELLE (SCHWARZ) UND SIMULIERTE (ROT) CW-EPR-SPEKTREN BEI (A) X-BAND- UND (B) Q-BAND-FREQUENZEN FÜR DIE SPINPROBE 4-CARBOXY-TEMPO IN WASSER.	222
ABBILDUNG 146 EXPERIMENTAL (BLACK) AND SIMULATED (RED) CW EPR SPECTRA AT (A) X-BAND AND (B) Q-BAND FREQUENCIES FOR SPIN PROBE FREMY'S SALZ IN WATER.....	223
ABBILDUNG 147 A X-BAND-CW-EPR-SPEKTREN WIEDERHOLTER MESSUNGEN VON SMA-SB MIT FREMYSALZ IN WASSER. WIE IN DEN UNNORMALISIERTEN SPEKTREN ZU SEHEN IST, IST DIE SIGNALINTENSITÄT EHER SCHWACH UND DAS SIGNAL SELBST VERSCHWINDET BEI TEMPERATUREN ÜBER 34 °C.	224
ABBILDUNG 148 DARSTELLUNG DER BERECHNETEN FLÄCHENWERTE FÜR DIE CW-EPR-MESSUNGEN VON REINEM FREMYSALZ (FS) UND SMA-SB MIT FS IN WASSER (SCHWARZE SYMBOLE) UND IN SALZHALTIGER TRIS-PUFFERLÖSUNG (ROTE SYMBOLE).	224
ABBILDUNG 149 EXPERIMENTELLE (SCHWARZ) UND SIMULIERTE (ROT) CWEPR-SPEKTREN BEI (A) X-BAND- UND (B) Q-BAND-FREQUENZEN FÜR SPIN-SONDE-TEMPO IN SALZHALTIGER TRIS-PUFFERLÖSUNG.	225
ABBILDUNG 150 EXPERIMENTAL (BLACK) AND SIMULATED (RED) CWEPR SPECTRA AT (A) X-BAND AND (B) Q-BAND FREQUENCIES FOR SPIN PROBE 4-OXO-TEMPO IN SALINE TRIS BUFFER SOLUTION.	226
ABBILDUNG 151 EXPERIMENTELLE (SCHWARZ) UND SIMULIERTE (ROT) CW-EPR-SPEKTREN BEI (A) X-BAND- UND (B) Q-BAND-FREQUENZEN FÜR SPIN-SONDE CAT-1 IN SALZHALTIGER TRIS-PUFFERLÖSUNG.....	227
ABBILDUNG 152 EXPERIMENTELLE (SCHWARZ) UND SIMULIERTE (ROT) CW-EPR-SPEKTREN BEI (A) X-BAND- UND (B) Q-BAND-FREQUENZEN FÜR DIE SPINSONDE 4-CARBOXY-TEMPO IN KOCHSALZ-TRIS-PUFFERLÖSUNG.	228
ABBILDUNG 153 EXPERIMENTELLE (SCHWARZ) UND SIMULIERTE (ROT) CW-EPR-SPEKTREN BEI (A) X-BAND- UND (B) Q-BAND-FREQUENZEN FÜR DIE SPINSONDE FREMY'S SALZ IN SALZHALTIGER TRIS-PUFFERLÖSUNG.	229
ABBILDUNG 154 TEMPERATURABHÄNGIGE CW-EPR-SPEKTREN FÜR (A) NUR TEMPO UND (B) SMA MIT TEMPO IN WASSER. DIE NORMALISIERTEN EXPERIMENTELLEN (SCHWARZ) UND SIMULIERTEN (ROT) SPEKTREN SIND IM GESTAPELTEN DIAGRAMM ÜBERLAGERT.....	230
ABBILDUNG 155 TEMPERATURABHÄNGIGE CW-EPR-SPEKTREN FÜR (A) DIBMA UND (B) SMA-SB MIT TEMPO IN WASSER. DIE NORMALISIERTEN EXPERIMENTELLEN (SCHWARZ) UND SIMULIERTEN (ROT) SPEKTREN SIND IM GESTAPELTEN DIAGRAMM ÜBERLAGERT.	231

ABBILDUNG 156 TEMPERATURABHÄNGIGE CW-EPR-SPEKTREN FÜR (A) AUSSCHLIEßLICH 4-OXO-TEMPO UND (B) SMA MIT 4-OXO-TEMPO IN WASSER. DIE NORMALISIERTEN EXPERIMENTELLEN (SCHWARZ) UND SIMULIERTEN (ROT) SPEKTREN SIND IM GESTAPELTEN DIAGRAMM ÜBERLAGERT.	232
ABBILDUNG 157 TEMPERATURABHÄNGIGE CW-EPR-SPEKTREN FÜR (A) DIBMA MIT 4-OXO-TEMPO UND (B) SMA-SB MIT 4-OXO-TEMPO IN WASSER. DIE NORMALISIERTEN EXPERIMENTELLEN (SCHWARZ) UND SIMULIERTEN (ROT) SPEKTREN SIND IM GESTAPELTEN DIAGRAMM ÜBERLAGERT.	233
ABBILDUNG 158 TEMPERATURABHÄNGIGE CW-EPR-SPEKTREN FÜR (A) NUR CAT-1 UND (B) SMA MIT CAT-1 IN WASSER. DIE NORMALISIERTEN EXPERIMENTELLEN (SCHWARZ) UND SIMULIERTEN (ROT) SPEKTREN SIND IM GESTAPELTEN DIAGRAMM ÜBERLAGERT.	234
ABBILDUNG 159 TEMPERATURABHÄNGIGE CW-EPR-SPEKTREN FÜR (A) DIBMA UND (B) SMA-SB MIT CAT-1 IN WASSER. DIE NORMALISIERTEN EXPERIMENTELLEN (SCHWARZ) UND SIMULIERTEN (ROT) SPEKTREN SIND IN DER GESTAPELTEN DARSTELLUNG ÜBERLAGERT.	235
ABBILDUNG 160 TEMPERATURABHÄNGIGE CW-EPR-SPEKTREN FÜR (A) 4-CARBOXY-TEMPO UND (B) SMA MIT 4-CARBOXY-TEMPO IN WASSER. DIE NORMALISIERTEN EXPERIMENTELLEN (SCHWARZ) UND SIMULIERTEN (ROT) SPEKTREN SIND IM GESTAPELTEN DIAGRAMM ÜBERLAGERT.	236
ABBILDUNG 161 TEMPERATURABHÄNGIGE CW-EPR-SPEKTREN FÜR (A) DIBMA UND (B) SMA-SB MIT 4-CARBOXY-TEMPO IN WASSER. DIE NORMALISIERTEN EXPERIMENTELLEN (SCHWARZ) UND SIMULIERTEN (ROT) SPEKTREN SIND IM GESTAPELTEN DIAGRAMM ÜBERLAGERT.	237
ABBILDUNG 162 TEMPERATURABHÄNGIGE CW-EPR-SPEKTREN FÜR (A) AUSSCHLIEßLICH TEMPO UND (B) SMA MIT TEMPO IN WÄSSRIGER PUFFERLÖSUNG. DIE NORMALISIERTEN EXPERIMENTELLEN (SCHWARZ) UND SIMULIERTEN (ROT) SPEKTREN SIND IM GESTAPELTEN DIAGRAMM ÜBEREINANDERGELEGT.	238
ABBILDUNG 163 TEMPERATURABHÄNGIGE CW-EPR-SPEKTREN FÜR (A) DIBMA UND (B) SMA-SB MIT TEMPO IN WÄSSRIGER PUFFERLÖSUNG. DIE NORMALISIERTEN EXPERIMENTELLEN (SCHWARZ) UND SIMULIERTEN (ROT) SPEKTREN SIND IM GESTAPELTEN DIAGRAMM ÜBEREINANDERGELEGT.	239
ABBILDUNG 164 TEMPERATURABHÄNGIGE CW-EPR-SPEKTREN FÜR (A) AUSSCHLIEßLICH 4-OXO-TEMPO UND (B) SMA MIT 4-OXO-TEMPO IN WÄSSRIGER PUFFERLÖSUNG. DIE NORMALISIERTEN EXPERIMENTELLEN (SCHWARZ) UND SIMULIERTEN (ROT) SPEKTREN SIND IM GESTAPELTEN DIAGRAMM ÜBEREINANDERGELEGT.	240
ABBILDUNG 165 TEMPERATURABHÄNGIGE CW-EPR-SPEKTREN FÜR (A) DIBMA UND (B) SMA-SB MIT 4-OXO-TEMPO IN WÄSSRIGER PUFFERLÖSUNG. DIE NORMALISIERTEN EXPERIMENTELLEN (SCHWARZ) UND SIMULIERTEN (ROT) SPEKTREN SIND IM GESTAPELTEN DIAGRAMM ÜBERLAGERT.	241
ABBILDUNG 166 TEMPERATURABHÄNGIGE CW-EPR-SPEKTREN FÜR (A) AUSSCHLIEßLICH CAT-1 UND (B) SMA MIT CAT-1 IN WÄSSRIGER PUFFERLÖSUNG. DIE NORMALISIERTEN EXPERIMENTELLEN (SCHWARZ) UND SIMULIERTEN (ROT) SPEKTREN SIND IM GESTAPELTEN DIAGRAMM ÜBEREINANDERGELEGT.	242
ABBILDUNG 167 TEMPERATURE-DEPENDENT CW EPR SPECTRA FOR (A) DIBMA AND (B) SMA-SB WITH CAT-1 IN AQUEOUS BUFFER SOLUTION. THE NORMALISED EXPERIMENTAL (BLACK) AND SIMULATED (RED) SPECTRA ARE OVERLAID IN THE STACKED PLOT.	243
ABBILDUNG 168 TEMPERATURABHÄNGIGE CW-EPR-SPEKTREN FÜR (A) AUSSCHLIEßLICH 4-CARBOXY-TEMPO UND (B) SMA MIT 4-CARBOXY-TEMPO IN WÄSSRIGER PUFFERLÖSUNG. DIE NORMALISIERTEN	

EXPERIMENTELLEN (SCHWARZ) UND SIMULIERTEN (ROT) SPEKTREN SIND IM GESTAPELTEN DIAGRAMM ÜBEREINANDERGELEGT.....	244
ABBILDUNG 169 TEMPERATURABHÄNGIGE CW-EPR-SPEKTREN FÜR (A) DIBMA UND (B) SMA-SB MIT 4-CARBOXY-TEMPO IN WÄSSRIGER PUFFERLÖSUNG. DIE NORMALISIERTEN EXPERIMENTELLEN (SCHWARZ) UND SIMULIERTEN (ROT) SPEKTREN SIND IM GESTAPELTEN DIAGRAMM ÜBEREINANDERGELEGT.	245
ABBILDUNG 170 TEMPERATURABHÄNGIGE CW-EPR-SPEKTREN FÜR (A) AUSSCHLIEßLICH FREMYSALZ UND (B) SMA MIT FREMYSALZ IN WÄSSRIGER PUFFERLÖSUNG. DIE NORMALISIERTEN EXPERIMENTELLEN (SCHWARZ) UND SIMULIERTEN (ROT) SPEKTREN SIND IN DER GESTAPELTEN DARSTELLUNG ÜBEREINANDERGELEGT.....	246
ABBILDUNG 171 TEMPERATURABHÄNGIGE CW-EPR-SPEKTREN FÜR (A) DIBMA UND (B) SMA-SB MIT FREMYSALZ IN WÄSSRIGER PUFFERLÖSUNG. DIE NORMALISIERTEN EXPERIMENTELLEN (SCHWARZ) UND SIMULIERTEN (ROT) SPEKTREN SIND IM GESTAPELTEN DIAGRAMM ÜBERLAGERT.	247

9.2. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 DARSTELLUNG DER BINDUNGSENERGIEN DES P2 UND VARIANTEN; *KEINE STARK GEBUNDENE KOMPONENTE, HIER WECHSEL VON INTERMEDIÄR I ZU INTERMEDIÄR II; $K_{D,T}$ (FIT) WERTE AUS HILL-FITS SIEHE ANHANG; ΔG_{F-T} FREIE GIBBS-ENERGIE VON FREI ZU TOTALGEBUNDEN, ΔG_{F-S} FREIE GIBBS-ENERGIE VON FREI ZU STARKGEBUNDEN, ΔG_{F-I} FREIE GIBBS-ENERGIE VON FREI ZU INTERMEDIÄR GEBUNDEN, ΔG_{I-S} FREIE GIBBS-ENERGIE VON INTERMEDIÄR ZU STARKGEBUNDEN, F = FREIE KOMPONENTE, I = INTERMEDIÄR, S = STARK GEBUNDEN, T = TOTAL GEBUNDEN (T = S + I); 20/50/100 μM KONZENTRATION DES LIGANDEN; ¹²⁵	43
TABELLE 2 WERTE DER MIP (LIPIDHALTIGE OBERFLÄCHE) UND SYNERGIE WERTE DES P2 UND SEINER MUTANTEN. IN KLAMMERN SIND DIE KONFIDENZINTERVALLE (CI) ANGEGEBEN	54
TABELLE 3 KLINISCHE SYMPTOME DES MALIGNEN HYPERTONIE UND DEREN URSACHE IM MUSKEL.....	73
TABELLE 4 AUFBAU VERSCHIEDENER NATÜRLICH VORKOMMENDER UND SYNTHETISCHER XANTHINDERIVATE	76
TABELLE 5 ABKÜRZUNG, IUPAC BEZEICHNUNG DER SYNTHESIERTEN EPR AKTIVEN RYR-LIGANDEN	82
TABELLE 6 SPEKTRALER ANTEIL RYR-7 IN X UND Q BAND.....	86
TABELLE 7 D TENSOREN VON CARBOXY-TEMPO UND DEN CARBOXY-TEMPO DERIVATEN RYR-5, 32,42. JEWEILS IN REALEN VERHÄLTNIS UND IM RELATIVEN VERHÄLTNIS	88
TABELLE 8 D-TENSOREN VON TEMPOL UND DEM TEMPOL-DERIVAT RYR-8. IM REALEN VERHÄLTNIS UND IM RELATIVEN VERHÄLTNIS	92
TABELLE 9 EIGENSCHAFTEN DER UNTERSUCHTEN NANODISCFORMENDEN POLYMERE	96
TABELLE 10 ERGEBNISSE DER CMPALS; Z POTENTIAL VON SMA, DIBMA UND SMA-SB IN WASSER UND WÄSSRIGEM TRIS PUFFER	98
TABELLE 11 VERGLEICH DES ANTEILS DER VOLLSTÄNDIG HYDRATISIERTEN, "HYDROPHILEN" TEMPO-SPEZIES (F) FÜR JEDES POLYMER MIT REINEM TEMPO (ALS REFERENZWERT) IN WASSER BEI 20 °C	100
TABELLE 12 GRUNDLEGENDE CWEPR-SIMULATIONSPARAMETER DER SPEKTRALKOMPONENTEN FÜR X-BAND FREQUENZEN; G-TENSOREN UND A-TENSOREN BEI 20 μM 5-DSA KONZENTRATION UND 200 μM PROTEINKONZENTRATION.....	129

TABELLE 13 GRUNDLEGENDE CWEPR-SIMULATIONSPARAMETER DER SPEKTRALKOMPONENTEN FÜR X-BAND FREQUENZEN; D-TENSOREN, -B-EULERWINKEL UND HEISENBERG-AUSTAUSCHFREQUENZEN BEI 20 μM 5- DSA KONZENTRATION UND 200 μM PROTEINKONZENTRATION	129
TABELLE 14 GRUNDLEGENDE CWEPR-SIMULATIONSPARAMETER DER SPEKTRALKOMPONENTEN FÜR X-BAND FREQUENZEN; G-TENSOREN UND A-TENSOREN BEI 20 μM 16-DSA KONZENTRATION UND 200 μM PROTEINKONZENTRATION.....	130
TABELLE 15 GRUNDLEGENDE CWEPR-SIMULATIONSPARAMETER DER SPEKTRALKOMPONENTEN FÜR X-BAND FREQUENZEN; D-TENSOREN, -B-EULERWINKEL UND HEISENBERG-AUSTAUSCHFREQUENZEN BEI 20 μM 16-DSA KONZENTRATION UND 200 μM PROTEINKONZENTRATION	130
TABELLE 16 CWEPR SIMULATIONSPARAMETER FÜR X-BAND UND Q-BAND, G-TENSOREN UND A-TENSOREN BEI 100 μM LABELKONZENTRATION UND 0% GLYCEROLKONZENTRATION	204
TABELLE 17 CWEPR SIMULATIONSPARAMETER FÜR X-BAND UND Q-BAND, G-TENSOREN UND A-TENSOREN BEI 100 μM LABELKONZENTRATION UND 0% GLYCEROLKONZENTRATION	204
TABELLE 18 CWEPR SIMULATIONSPARAMETER FÜR X-BAND UND Q-BAND, D-TENSOREN UND D-TENSOREN IN RELATIVEM VERHÄLTNIS ZU EINANDER BEI 100 μM LABELKONZENTRATION UND 0% GLYCEROLKONZENTRATION	205
TABELLE 19 CWEPR SIMULATIONSPARAMETER FÜR X-BAND UND Q-BAND, D-TENSOREN UND D-TENSOREN IN RELATIVEM VERHÄLTNIS ZU EINANDER BEI 100 μM LABELKONZENTRATION UND 0% GLYCEROLKONZENTRATION	205
TABELLE 20 CWEPR SIMULATIONSPARAMETER FÜR X-BAND FÜR G_{ISO} , A_{ISO} , LINIENBREITE UND τ_{C} 100 μM LABELKONZENTRATION UND VARIABLELER GLYCEROLKONZENTRATION	206
TABELLE 21 CWEPR SIMULATIONSPARAMETER FÜR X-BAND FÜR G_{ISO} , A_{ISO} , LINIENBREITE UND τ_{C} 100 μM LABELKONZENTRATION UND VARIABLELER GLYCEROLKONZENTRATION	206
TABELLE 22 CWEPR SIMULATIONSPARAMETER FÜR X-BAND FÜR G_{ISO} , A_{ISO} , LINIENBREITE UND τ_{C} 100 μM LABELKONZENTRATION UND VARIABLELER GLYCEROLKONZENTRATION	207
TABELLE 23 CWEPR SIMULATIONSPARAMETER FÜR X-BAND FÜR G_{ISO} , A_{ISO} , LINIENBREITE UND τ_{C} 100 μM LABELKONZENTRATION UND VARIABLELER GLYCEROLKONZENTRATION	207
TABELLE 24 CWEPR SIMULATIONSPARAMETER FÜR X-BAND FÜR G_{ISO} , A_{ISO} , LINIENBREITE UND τ_{C} 100 μM LABELKONZENTRATION UND VARIABLELER GLYCEROLKONZENTRATION	208
TABELLE 25 CWEPR SIMULATIONSPARAMETER FÜR X-BAND FÜR G_{ISO} , A_{ISO} , LINIENBREITE UND τ_{C} 100 μM LABELKONZENTRATION UND VARIABLELER GLYCEROLKONZENTRATION	208
TABELLE 26 CWEPR SIMULATIONSPARAMETER FÜR Q-BAND FÜR G_{ISO} , A_{ISO} , LINIENBREITE UND τ_{C} 100 μM LABELKONZENTRATION UND VARIABLELER GLYCEROLKONZENTRATION	209
TABELLE 27 CWEPR SIMULATIONSPARAMETER FÜR Q-BAND FÜR G_{ISO} , A_{ISO} , LINIENBREITE UND τ_{C} 100 μM LABELKONZENTRATION UND VARIABLELER GLYCEROLKONZENTRATION	209
TABELLE 28 CWEPR SIMULATIONSPARAMETER FÜR Q-BAND FÜR G_{ISO} , A_{ISO} , LINIENBREITE UND τ_{C} 100 μM LABELKONZENTRATION UND VARIABLELER GLYCEROLKONZENTRATION	209
TABELLE 29 CWEPR SIMULATIONSPARAMETER FÜR Q-BAND FÜR G_{ISO} , A_{ISO} , LINIENBREITE UND τ_{C} 100 μM LABELKONZENTRATION UND VARIABLELER GLYCEROLKONZENTRATION	210

TABELLE 30 CWEPR SIMULATIONSPARAMETER FÜR Q-BAND FÜR GISO, AISO, LW UND TAUC 100µM LABELKONZENTRATION UND VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION	210
TABELLE 31 CWEPR SIMULATIONSPARAMETER FÜR Q-BAND FÜR GISO, AISO, LW UND TAUC 100µM LABELKONZENTRATION UND VARIABLER GLYCEROLKONZENTRATION	210
TABELLE 32 VERHÄLTNIS VON MIDDELFIELD PEAK GEGEN HIGH FIELD PEAK - X BAND MESSUNGEN CARBOXY- TEMPO GEGEN RYR5, RYR6, RYR7 UND TEMPOL GEGEN RYR-8.....	211
TABELLE 33 GEMESSENE PARAMETER ZUR BESTIMMUNG DES Z-POTENZIALS.....	214
TABELLE 34 ZUSAMMENFASSUNG DER SIMULATIONSERGEBNISSE FÜR SPIN-PROBE-TEMPO IN KOMBINATION MIT DEN JEWEILIGEN FREIEN POLYMEREN SMA, DIBMA UND SMA-SB IN WASSER.	218
TABELLE 35 ZUSAMMENFASSUNG DER SIMULATIONSERGEBNISSE FÜR DIE SPINPROBE 4-OXO-TEMPO IN KOMBINATION MIT DEN JEWEILIGEN FREIEN POLYMEREN SMA, DIBMA UND SMA-SB IN WASSER.	220
TABELLE 36 ZUSAMMENFASSUNG DER SIMULATIONSERGEBNISSE FÜR SPIN-PROBE-CAT-1 IN KOMBINATION MIT DEN JEWEILIGEN FREIEN POLYMEREN SMA, DIBMA UND SMA-SB IN WASSER.	221
TABELLE 37 ZUSAMMENFASSUNG DER SIMULATIONSERGEBNISSE FÜR DIE SPINPROBE 4-CARBOXY-TEMPO IN KOMBINATION MIT DEN FREIEN JEWEILIGEN POLYMEREN SMA, DIBMA UND SMA-SB IN WASSER	222
TABELLE 38 ZUSAMMENFASSUNG DER SIMULATIONSERGEBNISSE FÜR SPIN-PROBE-FREMY-SALZ IN KOMBINATION MIT DEN FREIEN JEWEILIGEN POLYMEREN SMA UND DIBMA IN WASSER.	223
TABELLE 39 ZUSAMMENFASSUNG DER SIMULATIONSERGEBNISSE FÜR SPIN-PROBE-TEMPO IN KOMBINATION MIT DEN JEWEILIGEN FREIEN POLYMEREN SMA, DIBMA UND SMA-SB IN SALZHALTIGER TRIS- PUFFERLÖSUNG	225
TABELLE 40 ZUSAMMENFASSUNG DER SIMULATIONSERGEBNISSE FÜR DIE SPIN-SONDE 4-OXO-TEMPO IN KOMBINATION MIT DEN JEWEILIGEN FREIEN POLYMEREN SMA, DIBMA UND SMA-SB IN SALZHALTIGER TRIS-PUFFERLÖSUNG.....	226
TABELLE 41 ZUSAMMENFASSUNG DER SIMULATIONSERGEBNISSE FÜR SPIN-PROBE-CAT-1 IN KOMBINATION MIT DEN FREIEN JEWEILIGEN POLYMEREN SMA, DIBMA UND SMA-SB IN SALZHALTIGER TRIS- PUFFERLÖSUNG	227
TABELLE 42 ZUSAMMENFASSUNG DER SIMULATIONSERGEBNISSE FÜR DIE SPINSONDE 4-CARBOXY-TEMPO IN KOMBINATION MIT DEN JEWEILIGEN FREIEN POLYMEREN SMA, DIBMA UND SMA-SB IN KOCHSALZLÖSUNG UND TRIS-PUFFER	228
TABELLE 43 ZUSAMMENFASSUNG DER SIMULATIONSERGEBNISSE FÜR DIE SPINSONDE FREMY'S SALZ IN KOMBINATION MIT DEN JEWEILIGEN FREIEN POLYMEREN SMA, DIBMA UND SMA-SB IN SALZHALTIGER TRIS-PUFFERLÖSUNG.....	229

9.3. Literaturverzeichnis

1. Nicolson GL. The Fluid - Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2014;1838(6):1451-1466. doi:10.1016/j.bbamem.2013.10.019
2. Singer SJ, Nicolson GL. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science (80-)*. 1972;175(4023):720-731. doi:10.1126/science.175.4023.720
3. Raasakka A, Ruskamo S, Kowal J, et al. Membrane Association Landscape of Myelin Basic Protein Portrays Formation of the Myelin Major Dense Line. *Sci Rep.* 2017;7(1):4974. doi:10.1038/s41598-017-05364-3
4. Han H, Myllykoski M, Ruskamo S, Wang C, Kursula P. Myelin-specific proteins: A structurally diverse group of membrane-interacting molecules. *BioFactors.* 2013;39(3):233-241. doi:10.1002/biof.1076
5. Majava V, Polverini E, Mazzini A, et al. Structural and Functional Characterization of Human Peripheral Nervous System Myelin Protein P2. Kobe B, ed. *PLoS One.* 2010;5(4):e10300. doi:10.1371/journal.pone.0010300
6. González JM, Fisher SZ. Structural analysis of ibuprofen binding to human adipocyte fatty-acid binding protein (FABP4). *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Commun.* 2015;71(2):163-170. doi:10.1107/S2053230X14027897
7. Motley WW, Palaima P, Yum SW, et al. De novo PMP2 mutations in families with type 1 Charcot–Marie–Tooth disease. *Brain.* 2016;139(6):1649-1656. doi:10.1093/brain/aww055
8. Hunold J, Eisermann J, Brehm M, Hinderberger D. Characterization of Aqueous Lower-Polarity Solvation Shells around Amphiphilic 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-1-oxyl Radicals in Water. *J Phys Chem B.* 2020;124(39):8601-8609. doi:10.1021/acs.jpcc.0c04863
9. Bordignon E. *EPR Spectroscopy: Application in Chemistry and Biology.* (Drescher M, Jeschke G, eds.). Springer Berlin Heidelberg; 2012.
10. Chechik V, Carter E, Murphy D. *Electron Paramagnetic Resonance.* Oxford University

- Press: New York; 2016.
11. Jeschke G. *Kurze Einführung in Die Elektronenparamagnetische Resonanzspektroskopie - Vorlesungsskript Konstanz.*; 2008.
 12. Atherton NM. *Principles of Electron Spin Resonance*. Ellis Horwood: New York; 1993.
 13. Jeschke G. Einführung in die ESR-Spektroskopie: Ein Vorlesungs-Skript. 1998. https://ethz.ch/content/dam/ethz/special-interest/chab/physical-chemistry/epr-dam/documents/basicEducation/skripts/epr_skript_mainz_1998.pdf.
 14. Abragam A, Pryce MHL. Theory of the nuclear hyperfine structure of paramagnetic resonance spectra in crystals. *Proc R Soc London Ser A Math Phys Sci*. 1951;205(1080):135-153. doi:10.1098/rspa.1951.0022
 15. Euler L. Formulae generales pro translatione quacunque corporum rigidorum. *Novi Comment Acad Sci Petropolitanae*. 1775;20:189-207.
 16. Goldstein H, Poole C, Safko J. *Klassische Mechanik*. Wiley-VCH, Berlin; 2006.
 17. Stoll S. Rotations and Euler angles. Documentation, easyspin 6.0.1. <https://easyspin.org/documentation/eulerangles.html>. Published 2024.
 18. Molin YN, Salikhov KM, K.I. Z. *Spin Exchange - Principles and Applications in Chemistry and Biology*. Springer Berlin, Heidelberg; 1980.
 19. Kirmse R, Stach J. *ESR-Spektroskopie: Anwendung in Der Chemie*. Akademie-Verlag Berlin; 1985.
 20. Hunold J, Eisermann J, Brehm M, Hinderberger D. Characterization of Aqueous Lower-Polarity Solvation Shells around Amphiphilic 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-1-oxyl Radicals in Water. *J Phys Chem B*. 2020;124(39):8601-8609. doi:10.1021/acs.jpcc.0c04863
 21. Cerajewski U, Träger J, Henkel S, Roos AH, Brehm M, Hinderberger D. Nanoscopic structures and molecular interactions leading to a dystectic and two eutectic points in [EMIm][Cl]/urea mixtures. *Phys Chem Chem Phys*. 2018;20(47):29591-29600. doi:10.1039/c8cp04912b
 22. J.N.Junk M. *Assessing the Functional Structure of Molecular Transporters by EPR Spectroscopy*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. doi:10.1007/978-3-

- 642-25135-1
23. Bordignon E, Bleicken S. New limits of sensitivity of site-directed spin labeling electron paramagnetic resonance for membrane proteins. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2018;1860(4):841-853. doi:10.1016/j.bbamem.2017.12.009
 24. Tannford C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological membranes.* John Wiley Sons, New York. 1980.
 25. Buehler L. *Cell Membranes.* Garland Science; 2015. doi:10.1201/9780429258671
 26. Winter R, Noll F, Czeslik C. *Methoden Der Biophysikalischen Chemie.* Vieweg und Teubner Verlag: Wiesbaden; 2011.
 27. Heimburg T. *Thermal Biophysics of Membranes.* Wiley; 2007. doi:10.1002/9783527611591
 28. Yèagle PL. Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEB J.* 1989;3(7):1833-1842. doi:10.1096/fasebj.3.7.2469614
 29. Vereb G, Szöllősi J, Matkó J, et al. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer–Nicolson model. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(14):8053-8058. doi:10.1073/pnas.1332550100
 30. Startek JB, Boonen B, Talavera K, Meseguer V. TRP Channels as Sensors of Chemically-Induced Changes in Cell Membrane Mechanical Properties. *Int J Mol Sci.* 2019;20(2). doi:10.3390/ijms20020371
 31. Janiak MJ, Small DM, Shipley GG. Temperature and compositional dependence of the structure of hydrated dimyristoyl lecithin. *J Biol Chem.* 1979;254(13):6068-6078. doi:10.1016/S0021-9258(18)50520-2
 32. Radhakrishnan A, Anderson TG, McConnell HM. Condensed complexes, rafts, and the chemical activity of cholesterol in membranes. *Proc Natl Acad Sci.* 2000;97(23):12422-12427. doi:10.1073/pnas.220418097
 33. Silvius JR. Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2003;1610(2):174-183. doi:10.1016/S0005-2736(03)00016-6
 34. Maibaum L, Dinner AR, Chandler D. Micelle Formation and the Hydrophobic Effect. *J*

- Phys Chem B*. 2004;108(21):6778-6781. doi:10.1021/jp037487t
35. Blume A. A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1979;557(1):32-44. doi:10.1016/0005-2736(79)90087-7
 36. Seddon JM. Structure of the inverted hexagonal (HII) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids. *Biochim Biophys Acta - Rev Biomembr.* 1990;1031(1):1-69. doi:10.1016/0304-4157(90)90002-T
 37. Israelachvili JN. *Intermolecular and Surface Forces*. Elsevier; 2011. doi:10.1016/C2009-0-21560-1
 38. Widder K, Träger J, Kerth A, Harauz G, Hinderberger D. Interaction of Myelin Basic Protein with Myelin-like Lipid Monolayers at Air–Water Interface. *Langmuir*. 2018;34(21):6095-6108. doi:10.1021/acs.langmuir.8b00321
 39. Ruskamo S, Krokengen OC, Kowal J, et al. Cryo-EM, X-ray diffraction, and atomistic simulations reveal determinants for the formation of a supramolecular myelin-like proteolipid lattice. *J Biol Chem*. 2020;295(26):8692-8705. doi:10.1074/jbc.RA120.013087
 40. Franks NP. Structural analysis of hydrated egg lecithin and cholesterol bilayers I. X-ray diffraction. *J Mol Biol*. 1976;100(3):345-358. doi:10.1016/S0022-2836(76)80067-8
 41. Yeagle PL, Hutton WC, Huang C-H, Martin RB. Phospholipid head-group conformations; intermolecular interactions and cholesterol effects. *Biochemistry*. 1977;16(20):4344-4349. doi:10.1021/bi00639a003
 42. Widder K, Harauz G, Hinderberger D. Myelin basic protein (MBP) charge variants show different sphingomyelin-mediated interactions with myelin-like lipid monolayers. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2020;1862(2):183077. doi:10.1016/j.bbamem.2019.183077
 43. Träger J. Physikochemische Charakterisierung des Einflusses lokaler Umgebungsveränderungen auf myelinartige Membranmodelle Dissertation. 2021. doi:dx.doi.org/10.25673/39498
 44. Bayburt TH, Grinkova Y V., Sligar SG. Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins. *Nano Lett*. 2002;2(8):853-856.

- doi:10.1021/nl025623k
45. Hernandez-Rocamora V, Garcia-Montanes C, Rivas G. Phospholipid Bilayer Nanodiscs: A Powerful Tool to Study the Structural Organization and Biochemical Reactivity of Proteins in Membrane-like Environments. *Curr Top Med Chem*. 2015;14(23):2637-2646. doi:10.2174/1568026614666141215142951
 46. Denisov IG, Sligar SG. Nanodiscs in Membrane Biochemistry and Biophysics. *Chem Rev*. 2017;117(6):4669-4713. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00690
 47. Dörr JM, Scheidelaar S, Koorengel MC, et al. The styrene–maleic acid copolymer: a versatile tool in membrane research. *Eur Biophys J*. 2016;45(1):3-21. doi:10.1007/s00249-015-1093-y
 48. Lee SC, Pollock NL. Membrane proteins from amino acids to zinc membrane proteins: Is the future disc shaped? *Biochem Soc Trans*. 2016;44(4):1011-1018. doi:10.1042/BST20160015
 49. Oluwole AO, Danielczak B, Meister A, Babalola JO, Vargas C, Keller S. Solubilization of Membrane Proteins into Functional Lipid-Bilayer Nanodiscs Using a Diisobutylene/Maleic Acid Copolymer. *Angew Chemie - Int Ed*. 2017;56(7):1919-1924. doi:10.1002/anie.201610778
 50. Esmaili M, Brown CJ, Shaykhutdinov R, et al. Homogeneous nanodiscs of native membranes formed by stilbene–maleic-acid copolymers. *Nanoscale*. 2020;12(32):16705-16709. doi:10.1039/D0NR03435E
 51. Ravula T, Hardin NZ, Ramadugu SK, Cox SJ, Ramamoorthy A. Formation of pH-Resistant Monodispersed Polymer–Lipid Nanodiscs. *Angew Chemie Int Ed*. 2018;57(5):1342-1345. doi:10.1002/anie.201712017
 52. Ravula T, Ramadugu SK, Di Mauro G, Ramamoorthy A. Bioinspired, Size-Tunable Self-Assembly of Polymer–Lipid Bilayer Nanodiscs. *Angew Chemie Int Ed*. 2017;56(38):11466-11470. doi:10.1002/anie.201705569
 53. Gulamhussein AA, Uddin R, Tighe BJ, Poyner DR, Rothnie AJ. A comparison of SMA (styrene maleic acid) and DIBMA (di-isobutylene maleic acid) for membrane protein purification. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2020;1862(7):183281. doi:10.1016/j.bbamem.2020.183281

-
54. Scheidelaar S, Koorengevel MC, van Walree CA, Dominguez JJ, Dörr JM, Killian JA. Effect of Polymer Composition and pH on Membrane Solubilization by Styrene-Maleic Acid Copolymers. *Biophys J*. 2016;111(9):1974-1986. doi:10.1016/j.bpj.2016.09.025
 55. Hall SCL, Tognoloni C, Price GJ, et al. Influence of Poly(styrene- co -maleic acid) Copolymer Structure on the Properties and Self-Assembly of SMALP Nanodiscs. *Biomacromolecules*. 2018;19(3):761-772. doi:10.1021/acs.biomac.7b01539
 56. Cunningham RD, Kopf AH, Elenbaas BOW, et al. Iterative RAFT-Mediated Copolymerization of Styrene and Maleic Anhydride toward Sequence- and Length-Controlled Copolymers and Their Applications for Solubilizing Lipid Membranes. *Biomacromolecules*. 2020;21(8):3287-3300. doi:10.1021/acs.biomac.0c00736
 57. Scheidelaar S, Koorengevel MC, Pardo JD, Meeldijk JD, Breukink E, Killian JA. Molecular Model for the solubilization of membranes into nanodisks by styrene maleic acid copolymers. *Biophys J*. 2015;108(2):279-290. doi:10.1016/j.bpj.2014.11.3464
 58. Grethen A, Oluwole AO, Danielczak B, Vargas C, Keller S. Thermodynamics of nanodisc formation mediated by styrene/maleic acid (2:1) copolymer. *Sci Rep*. 2017;7(1):11517. doi:10.1038/s41598-017-11616-z
 59. Orwick MC, Judge PJ, Procek J, et al. Detergent-Free Formation and Physicochemical Characterization of Nanosized Lipid–Polymer Complexes: Lipodisq. *Angew Chemie Int Ed*. 2012;51(19):4653-4657. doi:10.1002/anie.201201355
 60. BROCKMAN H. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Curr Opin Struct Biol*. 1999;9(4):438-443. doi:10.1016/S0959-440X(99)80061-X
 61. Maget-Dana R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 1999;1462(1-2):109-140. doi:10.1016/S0005-2736(99)00203-5
 62. Dörfler H-D. *GRrenzflächen Und Kolloid-Disperse Systme: Physik Und Chemie*. Springer; 2002.
 63. Butt H-J, Karlheinz G, Kappl M. *Physics and Chemistry of Interfaces*. Vol 3. WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA; 2013. doi:10.1080/10426914.2013.840916

-
64. Caseli L, Nobre TM, Ramos AP, Monteiro DS, Zaniquelli MED. The Role of Langmuir Monolayers To Understand Biological Events. In: ; 2015:65-88. doi:10.1021/bk-2015-1215.ch004
 65. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(2):112-124. doi:10.1038/nrm2330
 66. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* Boston, MA: Springer US; 1999. doi:10.1007/978-1-4757-3061-6
 67. Masters BR. Imaging: A Laboratory Manual, by Rafael Yuste, Editor. *J Biomed Opt.* 2011;16(3):039901. doi:10.1117/1.3562205
 68. Lösche M, Sackmann E, Möhwald H. A Fluorescence Microscopic Study Concerning the Phase Diagram of Phospholipids. *Berichte der Bunsengesellschaft für Phys Chemie.* 1983;87(10):848-852. doi:10.1002/bbpc.19830871004
 69. Dyck M, Kerth A, Blume A, Lösche M. Interaction of the Neurotransmitter, Neuropeptide Y, with Phospholipid Membranes: Infrared Spectroscopic Characterization at the Air/Water Interface. *J Phys Chem B.* 2006;110(44):22152-22159. doi:10.1021/jp062537q
 70. McConnell HM, Radhakrishnan A. Condensed complexes of cholesterol and phospholipids. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2003;1610(2):159-173. doi:10.1016/S0005-2736(03)00015-4
 71. McConnell HM. Structures and Transitions in Lipid Monolayers at the Air-Water Interface. *Annu Rev Phys Chem.* 1991;42(1):171-195. doi:10.1146/annurev.pc.42.100191.001131
 72. Fisher Thermo S. Alexa Fluor 488 Dye - Fluorencia SpetraViewer. <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/alex-fluor-488.html>. Published 2025.
 73. Fisher Thermo S. Rho-B-DHPE Produktspezifikationen. doi:<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/de/L1392>
 74. Bellmann, C; Caspari, A.; Moitzi, C.; Babick F. *Dynamische Und Elektrophoretische Lichtstreuung - Leitfaden Zur Partikelgrößenanalyse Und Zetapotentialbestimmung.*

-
75. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev.* 2016;8(4):409-427. doi:10.1007/s12551-016-0218-6
 76. 3P-Instruments. DLS Methode. <https://www.3p-instruments.com/de/measurement-methods/dynamic-light-scattering/>. Published 2025.
 77. Pecora R. Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. *J Nanoparticle Res.* 2000;2(2):123-131. doi:10.1023/A:1010067107182
 78. Einstein A. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Ann Phys.* 1905;322(8):549-560. doi:10.1002/andp.19053220806
 79. von Smoluchowski M. Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen. *Ann Phys.* 1906;326(14):756-780. doi:10.1002/andp.19063261405
 80. Koppel DE. Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants. *J Chem Phys.* 1972;57(11):4814-4820. doi:10.1063/1.1678153
 81. Larrysgod. Schematische Darstellung des Zeta-Potentials und des Oberflächenpotentials eines Partikels. Creative Commons, https://en.wikipedia.org/wiki/File:Zeta_Potential_for_a_particle_in_dispersion_medium.png. Published 2025.
 82. Holoubek J. Some applications of light scattering in materials science. *J Quant Spectrosc Radiat Transf.* 2007;106(1-3):104-121. doi:10.1016/j.jqsrt.2007.01.013
 83. Tscharnuter WW. Mobility measurements by phase analysis. *Appl Opt.* 2001;40(24):3995. doi:10.1364/AO.40.003995
 84. Noack H, Moitzi C. Modulator monitoring during measuring electromobility. 2012.
 85. Bellmann, C; Caspari, A.; Moitzi, C.; Babick F. Dynamic and electrophoretic light scattering. 2019.
 86. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Trop J Pharm Res.* 2013;12(2). doi:10.4314/tjpr.v12i2.19

87. Kaszuba M, Corbett J, Watson FM, Jones A. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci.* 2010;368(1927):4439-4451. doi:10.1098/rsta.2010.0175
88. Chen Z, Wei Z, Chen Y, Dames C. Anisotropic Debye model for the thermal boundary conductance. *Phys Rev B.* 2013;87(12):125426. doi:10.1103/PhysRevB.87.125426
89. Fritsch RJ, Krause I. ELECTROPHORESIS. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition.* Elsevier; 2003:2055-2062. doi:10.1016/B0-12-227055-X/01409-7
90. Delgado AV, González-Caballero F, Hunter RJ, Koopal LK, Lyklema J. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *J Colloid Interface Sci.* 2007;309(2):194-224. doi:10.1016/j.jcis.2006.12.075
91. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J Control Release.* 2016;235:337-351. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017
92. Miller JF, Schätzel K, Vincent B. The determination of very small electrophoretic mobilities in polar and nonpolar colloidal dispersions using phase analysis light scattering. *J Colloid Interface Sci.* 1991;143(2):532-554. doi:10.1016/0021-9797(91)90286-H
93. Freire JM, Domingues MM, Matos J, et al. Using zeta-potential measurements to quantify peptide partition to lipid membranes. *Eur Biophys J.* 2011;40(4):481-487. doi:10.1007/s00249-010-0661-4
94. Moitzi C. More Sensitive Zeta-Potential Measurements with cmPALS and the Litesizer 500. 2018.
95. Gonzaga-Jauregui C, Harel T, Gambin T, et al. Exome Sequence Analysis Suggests that Genetic Burden Contributes to Phenotypic Variability and Complex Neuropathy. *Cell Rep.* 2015;12(7):1169-1183. doi:10.1016/j.celrep.2015.07.023
96. Böhni UW, Lauper M, Locher HA, eds. Neuroanatomische Grundlagen. In: *Manuelle Medizin 1.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2015. doi:10.1055/b-0034-97480
97. Hong Y Bin, Joo J, Hyun YS, et al. A Mutation in PMP2 Causes Dominant Demyelinating Charcot-Marie-Tooth Neuropathy. Lupski JR, ed. *PLOS Genet.* 2016;12(2):e1005829. doi:10.1371/journal.pgen.1005829

98. Punetha J, Mackay-Loder L, Harel T, et al. Identification of a pathogenic PMP2 variant in a multi-generational family with CMT type 1: Clinical gene panels versus genome-wide approaches to molecular diagnosis. *Mol Genet Metab.* 2018;125(3):302-304. doi:10.1016/j.ymgme.2018.08.005
99. Médecine I nationale de la santé et de la recherche. PMP2-related Charcot-Marie-Tooth disease type 1. ORPHA:476394. <https://www.orpha.net/en/disease/detail/476394>.
100. Online Mendelian Inheritance in Man. CHARCOT-MARIE-TOOTH DISEASE, DEMYELINATING, TYPE 1G; CMT1G. # 618279. <https://omim.org/entry/618279>.
101. Ruskamo S, Yadav RP, Sharma S, et al. Atomic resolution view into the structure–function relationships of the human myelin peripheral membrane protein P2. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr.* 2014;70(1):165-176. doi:10.1107/S1399004713027910
102. Abe M, Makino A, Murate M, et al. PMP2/FABP8 induces PI(4,5)P2-dependent transbilayer reorganization of sphingomyelin in the plasma membrane. *Cell Rep.* 2021;37(6):109935. doi:10.1016/j.celrep.2021.109935
103. Sedzik J, Blaurock AE, Hoechli M. Reconstituted P2/Myelin-Lipid Multilayers. *J Neurochem.* 1985;45(3):844-852. doi:10.1111/j.1471-4159.1985.tb04071.x
104. Zenker J, Stettner M, Ruskamo S, et al. A role of peripheral myelin protein 2 in lipid homeostasis of myelinating Schwann cells. *Glia.* 2014;62(9):1502-1512. doi:10.1002/glia.22696
105. Kursula P. Structural properties of proteins specific to the myelin sheath. *Amino Acids.* 2008;34(2):175-185. doi:10.1007/s00726-006-0479-7
106. Smathers RL, Petersen DR. The human fatty acid-binding protein family: Evolutionary divergences and functions. *Hum Genomics.* 2011;5(3):170. doi:10.1186/1479-7364-5-3-170
107. Zimmerman AW, van Moerkerk HT., Veerkamp JH. Ligand specificity and conformational stability of human fatty acid-binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33(9):865-876. doi:10.1016/S1357-2725(01)00070-X
108. Esteves A, Ehrlich R. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol.* 2006;142(3-4):262-274.

- doi:10.1016/j.cbpc.2005.11.006
109. Hidalgo MA, Carretta MD, Burgos RA. Long Chain Fatty Acids as Modulators of Immune Cells Function: Contribution of FFA1 and FFA4 Receptors. *Front Physiol.* 2021;12. doi:10.3389/fphys.2021.668330
110. Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(6):489-503. doi:10.1038/nrd2589
111. Thompson J, Winter N, Terwey D, Bratt J, Banaszak L. The Crystal Structure of the Liver Fatty Acid-binding Protein. *J Biol Chem.* 1997;272(11):7140-7150. doi:10.1074/jbc.272.11.7140
112. Richieri G V, Ogata RT, Kleinfeld AM. Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid-binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe ADIFAB. *J Biol Chem.* 1994;269(39):23918-23930. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929039>.
113. Storch J, Thumser AE. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2000;1486(1):28-44. doi:10.1016/S1388-1981(00)00046-9
114. Sharma A, Yogavel M, Sharma A. Utility of anion and cation combinations for phasing of protein structures. *J Struct Funct Genomics.* 2012;13(3):135-143. doi:10.1007/s10969-012-9137-3
115. Trapp BD, Dubois-Dalcq M, Quarles RH. Ultrastructural Localization of P 2 Protein in Actively Myelinating Rat Schwann Cells. *J Neurochem.* 1984;43(4):944-948. doi:10.1111/j.1471-4159.1984.tb12828.x
116. Storch J, McDermott L. Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins. *J Lipid Res.* 2009;50:S126-S131. doi:10.1194/jlr.R800084-JLR200
117. Suresh S, Wang C, Nanekar R, Kursula P, Edwardson JM. Myelin Basic Protein and Myelin Protein 2 Act Synergistically to Cause Stacking of Lipid Bilayers. *Biochemistry.* 2010;49(16):3456-3463. doi:10.1021/bi100128h
118. Knoll W, Natali F, Peters J, Nanekar R, Wang C, Kursula P. Dynamic properties of a reconstituted myelin sheath. *Spectroscopy.* 2010;24(6):585-592. doi:10.3233/SPE-

2010-0479

119. Winter J. Shiverer peripheral myelin contains P2. *Nature*. 1982;298(5873):471-472. doi:10.1038/298471a0
120. Amiri M, Yousefnia S, Seyed Forootan F, Peymani M, Ghaedi K, Nasr Esfahani MH. Diverse roles of fatty acid binding proteins (FABPs) in development and pathogenesis of cancers. *Gene*. 2018;676:171-183. doi:10.1016/j.gene.2018.07.035
121. Bhattacharya AA, Grüne T, Curry S. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin 1 Edited by R. Huber. *J Mol Biol*. 2000;303(5):721-732. doi:10.1006/jmbi.2000.4158
122. Reichenwallner J, Hinderberger D. Using bound fatty acids to disclose the functional structure of serum albumin. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2013;1830(12):5382-5393. doi:10.1016/j.bbagen.2013.04.031
123. Junk MJN, Spiess HW, Hinderberger D. The Distribution of Fatty Acids Reveals the Functional Structure of Human Serum Albumin. *Angew Chemie Int Ed*. 2010;49(46):8755-8759. doi:10.1002/anie.201003495
124. Fournier NC, Zuker M, Williams RE, Smith ICP. Self-association of the cardiac fatty acid binding protein. Influence on membrane-bound, fatty acid dependent enzymes. *Biochemistry*. 1983;22(8):1863-1872. doi:10.1021/bi00277a019
125. Michler S, Schöffmann FA, Robaa D, Volmer J, Hinderberger D. Fatty acid binding to the human transport proteins FABP3, FABP4, and FABP5 from a Ligand's perspective. *J Biol Chem*. 2024;300(6):107396. doi:10.1016/j.jbc.2024.107396
126. Ruskamo S, Yadav RP, Sharma S, et al. Atomic resolution view into the structure–function relationships of the human myelin peripheral membrane protein P2. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2014;70(1):165-176. doi:10.1107/S1399004713027910
127. Ruskamo S, Nieminen T, Kristiansen CK, et al. Molecular mechanisms of Charcot-Marie-Tooth neuropathy linked to mutations in human myelin protein P2. *Sci Rep*. 2017;7(1):6510. doi:10.1038/s41598-017-06781-0
128. Inouye H, Kirschner DA. Membrane interactions in nerve myelin: II. Determination of surface charge from biochemical data. *Biophys J*. 1988;53(2):247-260.

- doi:10.1016/S0006-3495(88)83086-8
129. Butt H, Graf F, Kappl M. *Physics and Chemistry of Interfaces, 3rd Ed.* Weinheim: John Wiley & Sons; 2013.
 130. Widder K, Träger J, Kerth A, Harauz G, Hinderberger D. Interaction of Myelin Basic Protein with Myelin-like Lipid Monolayers at Air-Water Interface. *Langmuir*. 2018;34(21):6095-6108. doi:10.1021/acs.langmuir.8b00321
 131. Laulumaa S, Nieminen T, Lehtimäki M, et al. Dynamics of the Peripheral Membrane Protein P2 from Human Myelin Measured by Neutron Scattering—A Comparison between Wild-Type Protein and a Hinge Mutant. Roccatano D, ed. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128954. doi:10.1371/journal.pone.0128954
 132. Laulumaa S, Nieminen T, Raasakka A, et al. Structure and dynamics of a human myelin protein P2 portal region mutant indicate opening of the β barrel in fatty acid binding proteins. *BMC Struct Biol*. 2018;18(1):8. doi:10.1186/s12900-018-0087-2
 133. Calvez P, Demers É, Boisselier É, Salesse C. Analysis of the Contribution of Saturated and Polyunsaturated Phospholipid Monolayers to the Binding of Proteins. *Langmuir*. 2011;27(4):1373-1379. doi:10.1021/la104097n
 134. McConnell HM, Tamm LK, Weis RM. Periodic structures in lipid monolayer phase transitions. *Proc Natl Acad Sci*. 1984;81(10):3249-3253. doi:10.1073/pnas.81.10.3249
 135. Leathes JB. Croonian Lectures ON THE RÔLE OF FATS IN VITAL PHENOMENA. *Lancet*. 1925;205(5306):957-962. doi:10.1016/S0140-6736(01)22402-7
 136. Rosetti CM, Maggio B, Oliveira RG. The self-organization of lipids and proteins of myelin at the membrane interface. Molecular factors underlying the microheterogeneity of domain segregation. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2008;1778(7-8):1665-1675. doi:10.1016/j.bbamem.2008.02.007
 137. Demel RA, Bruckdorfer KR, van Deenen LLM. Structural requirements of sterols for the interaction with lecithin at the air-water interface. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 1972;255(1):311-320. doi:10.1016/0005-2736(72)90030-2
 138. Träger J, Widder K, Kerth A, Harauz G, Hinderberger D. Effect of Cholesterol and Myelin Basic Protein (MBP) Content on Lipid Monolayers Mimicking the Cytoplasmic Membrane of Myelin. *Cells*. 2020;9(3):529. doi:10.3390/cells9030529

139. Escribá P V., González-Ros JM, Goñi FM, et al. Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *J Cell Mol Med.* 2008;12(3):829-875. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00281.x
140. Widder K. Characterisation of the effects of intrinsically disordered protein (IDP) solvent and IDP lipid interactions in aqueous solution and lipid monolayers. 2019.
141. Narayanan V, Ripepi B, Jabs EW, Hawkins A, Griffin C, Tennekoon G. Partial structure and mapping of the human myelin P2 protein gene. *J Neurochem.* 1994;63(6):2010-2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7525873>.
142. Uusitalo M, Klenow MB, Laulumaa S, et al. Human myelin protein P2: from crystallography to time-lapse membrane imaging and neuropathy-associated variants. *FEBS J.* 2021;288(23):6716-6735. doi:10.1111/febs.16079
143. Krokengen OC, Raasakka A, Klenow MB, et al. On the synergy between myelin proteins P0, MBP, and P2 in peripheral nerve major dense line formation. July 2024. doi:10.1101/2024.07.15.603506
144. Palaima P, Chamova T, Jander S, et al. Peripheral myelin protein 2 – a novel cluster of mutations causing Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Orphanet J Rare Dis.* 2019;14(1):197. doi:10.1186/s13023-019-1162-x
145. Hoffmann M, Eisermann J, Schöffmann FA, et al. Influence of different polymer belts on lipid properties in nanodiscs characterized by CW EPR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2021;1863(10):183681. doi:10.1016/j.bbamem.2021.183681
146. Glahn KPE, Ellis FR, Halsall PJ, et al. Recognizing and managing a malignant hyperthermia crisis: guidelines from the European Malignant Hyperthermia Group. *Br J Anaesth.* 2010;105(4):417-420. doi:10.1093/bja/aeq243
147. Norgine gmbh. Fachinformation Dantrolen i.V. 20 mg; Pulver zur Herstellung einer Infusion. *Fachinformation.* 2022:1-7.
148. Heck M, Fresenius M, Busch C, Heck-Fresenius. *Klinikmanual Anästhesie.* Heidelberg: Springer Medizin; 2008.
149. Hopkins PM, Rüffert H, Snoeck MM, et al. European Malignant Hyperthermia Group guidelines for investigation of malignant hyperthermia susceptibility. *Br J Anaesth.*

- 2015;115(4):531-539. doi:10.1093/bja/aev225
150. Wehrens XHT, Marks AR. *Ryanodine Receptors: Structure, Function and Dysfunction in Clinical Disease*. Vol 254. Boston, MA: Springer Science + Business Media Inc; 2005. doi:10.1007/b100805
151. Fredholm BB. *Methylxanthines*. Vol 200. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011. doi:10.1007/978-3-642-13443-2
152. Kramer IJM. Intracellular Calcium. In: *Signal Transduction*. Elsevier; 2016:381-439. doi:10.1016/B978-0-12-394803-8.00006-1
153. Liu W, Meissner G. Structure-activity relationship of xanthines and skeletal muscle ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel. *Pharmacology*. 1997;54(3):135-143. doi:10.1159/000139480
154. Hawke TJ, Allen DG, Lindinger MI. Paraxanthine, a caffeine metabolite, dose dependently increases Ca²⁺(i) in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2000;89(6):2312-2317. doi:10.1152/jappl.2000.89.6.2312
155. Wyskovsky W. Caffeine-induced calcium oscillations in heavy-sarcoplasmic-reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*. 1994;221(1):317-325. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb18743.x
156. Rousseau E, Ladine J, Liu Q-Y, Meissner G. Activation of the Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds: Archives of Biochemistry and Biophysics, 267(1), 75-86. *Arch Biochem Biophys*. 1988;267(1):75-86. doi:10.1016/0003-9861(88)90010-0
157. KLOSA DIPL-CHEM DR JOSEF. Verfahren zur Herstellung von in 8-Stellung basisch substituierten Coffeinderivaten.
158. Krugmann T, Krugmann M. Improvements in or relating to caffeine-(8)-alkanolamines and their derivatives. 1961.
159. Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006: Theophyllin. <https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=DE&language=de&productNumber=T1633&brand=SIGMA&PageToGoToURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Ft1633%3Flang%3Dde>.

-
160. Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006: Theobromin.
<https://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=DE&language=de&productNumber=T4500&brand=SIGMA&PageToGoToURL=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Ft4500%3Flang%3Dde>.
161. Latscha HP, Kazmaier U, Klein HA. *Organische Chemie: Chemie-Basiswissen II*. 7. Auflage. Berlin and Heidelberg: Springer Spektrum; 2016. doi:10.1007/978-3-662-46180-8
162. Gibson CM, Fowler PW. Aromaticity of caffeine, xanthine and the dimethyl xanthines. *Tetrahedron Lett*. 2014;55(13):2078-2081. doi:10.1016/j.tetlet.2014.02.027
163. Marques HM. Ligand substitution reactions of aquocobalamin. Reactions with primary amines. *J Chem Soc Dalton Trans*. 1991;(6):1437. doi:10.1039/dt9910001437
164. Nič M, Jirát J, Košata B, Jenkins A, McNaught A. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. Research Triangle Park, NC: IUPAC; 2009. doi:10.1351/goldbook
165. Beckert R, Fanghänel E, Habicher WD, Knölker H-J, Metz P, Schwetlick K. *Organikum: Organisch-Chemisches Grundpraktikum*. 24., volls. Weinheim: Wiley-VCH Verlag; 2015. http://www.amazon.de/dp/352733968X#reader_352733968X.
166. Neises B, Steglich W. Einfaches Verfahren zur Veresterung von Carbonsäuren. *Angew Chem*. 1978;90(7):556-557. doi:10.1002/ange.19780900718
167. Fischer E. Neue Bildungsweise der Oxazole. *Berichte der Dtsch Chem Gesellschaft*. 1896;29(1):205-214. doi:10.1002/cber.18960290143
168. Holleman AF, Wiberg E, Wiberg N. *Lehrbuch Der Anorganischen Chemie*. 102., star. Berlin: De Gruyter; 2007. doi:10.1515/9783110177701
169. Otera J. *Esterification: Methods, Reactions, and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH; 2003. <http://www.loc.gov/catdir/description/wiley041/2003279353.html>.
170. Hauenschild T, Reichenwallner J, Enkelmann V, Hinderberger D. Characterizing Active Pharmaceutical Ingredient Binding to Human Serum Albumin by Spin-Labeling and EPR Spectroscopy. *Chemistry*. 2016;22(36):12825-12838. doi:10.1002/chem.201601810
171. Williamson A. Ueber die Theorie der Aetherbildung. *Justus Liebigs Ann Chem*.

- 1851;77(1):37-49. doi:10.1002/jlac.18510770104
172. Laue T, Plagens A. Williamson-Ethersynthese. In: Elschenbroich C, Hensel F, Hopf H, Laue T, Plagens A, eds. *Namen- Und Schlagwort-Reaktionen Der Organischen Chemie*. Teubner Studienbücher Chemie. Wiesbaden: Vieweg+Teubner Verlag; 1994:316-319. doi:10.1007/978-3-322-94015-5{\textunderscore }107
173. Yang Q, Sheng M, Henkelis JJ, et al. Explosion Hazards of Sodium Hydride in Dimethyl Sulfoxide, N , N -Dimethylformamide, and N , N -Dimethylacetamide. *Org Process Res & Dev*. 2019;23(10):2210-2217. doi:10.1021/acs.oprd.9b00276
174. Miyazawa T, Endo T, Shiihashi S, Okawara M. Selective oxidation of alcohols by oxoaminium salts ($R_2N:O^+ X^-$). *J Org Chem*. 1985;50(8):1332-1334. doi:10.1021/jo00208a047
175. Root LJ, Stillinger FH. Short-range order in glycerol. A molecular dynamics study. *J Chem Phys*. 1989;90(2):1200-1208. doi:10.1063/1.456176
176. Haeri HH, Blaffert J, Schöffmann FA, et al. Concentration Effects in the Interaction of Monoclonal Antibodies (mAbs) with their Immediate Environment Characterized by EPR Spectroscopy. *Molecules*. 2019;24(14):2528. doi:10.3390/molecules24142528
177. Wu K, Feng S, Hedoux A, Shalaev E. Water structure in glycerol: Spectroscopic and computer simulation investigation of hydrogen bonding and water clustering. *J Mol Liq*. 2022;355:118916. doi:10.1016/j.molliq.2022.118916
178. Towey JJ, Dougan L. Structural Examination of the Impact of Glycerol on Water Structure. *J Phys Chem B*. 2012;116(5):1633-1641. doi:10.1021/jp2093862
179. Reichenwallner J. EPR spectroscopic characterization of solution dynamics of albumins and albumin-inspired, self-organizing compounds. 2018;(November):429. doi:http://dx.doi.org/10.25673/13859
180. Stoll S. Documentation of EasySpin, Eulerangles. <https://easyspin.org/easyspin/documentation/eulerangles.html>. Published 2024.
181. Lajzerowicz-Bonneteau J. Molecular Structure of Nitroxides. In: *Spin Labeling: Theory and Application, Vol1*. Berliner, L.; 1976:239-249.
182. Jeong D, Han S, Lim Y, Kim SH. Investigation of the Hydration State of Self-Assembled

- Peptide Nanostructures with Advanced Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *ACS Omega*. 2019;4(1):114-120. doi:10.1021/acsomega.8b02450
183. Overduin M, Esmaili M. Structures and Interactions of Transmembrane Targets in Native Nanodiscs. *SLAS Discov*. 2019;24(10):943-952. doi:10.1177/2472555219857691
184. Österlund N, Luo J, Wärmländer SKTS, Gräslund A. Membrane-mimetic systems for biophysical studies of the amyloid- β peptide. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2019;1867(5):492-501. doi:10.1016/j.bbapap.2018.11.005
185. Jeschke G. Determination of the nanostructure of polymer materials by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Macromol Rapid Commun*. 2002;23(4):227-246. doi:10.1002/1521-3927(20020301)23:4<227::AID-MARC227>3.0.CO;2-D
186. Schlick S. *Advanced ESR Methods in Polymer Research*. (Schlick S, ed.). Wiley; 2006. doi:10.1002/047005350X
187. Hinderberger D. EPR spectroscopy in polymer science. In: Drescher M, Jeschke G, eds. *Topics in Current Chemistry*. Vol 321. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012:67-90. doi:10.1007/128_2011_236
188. Oluwole AO, Klingler J, Danielczak B, et al. Formation of Lipid-Bilayer Nanodiscs by Diisobutylene/Maleic Acid (DIBMA) Copolymer. *Langmuir*. 2017;33(50):14378-14388. doi:10.1021/acs.langmuir.7b03742
189. Kurzbach D, Junk MJN, Hinderberger D. Nanoscale inhomogeneities in thermoresponsive polymers. *Macromol Rapid Commun*. 2013;34(2):119-134. doi:10.1002/marc.201200617
190. Haeri HH, Blaffert J, Schöffmann FA, et al. Concentration effects in the interaction of monoclonal antibodies (MABs) with their immediate environment characterized by EPR spectroscopy. *Molecules*. 2019;24(14):2528. doi:10.3390/molecules24142528
191. Hunold J, Wolf T, Wurm FR, Hinderberger D. Nanoscopic hydrophilic/hydrophilic phase-separation well below the LCST of polyphosphoesters. *Chem Commun*. 2019;55(23):3414-3417. doi:10.1039/c8cc09788g
192. Seuring J, Agarwal S. Polymers with upper critical solution temperature in aqueous solution: Unexpected properties from known building blocks. *ACS Macro Lett*. 2013;2(7):597-600. doi:10.1021/mz400227y

-
193. Niskanen J, Tenhu H. How to manipulate the upper critical solution temperature (UCST)? *Polym Chem.* 2017;8(1):220-232. doi:10.1039/c6py01612j
194. Steinhoff HJ. Multi-frequency EPR spectroscopy studies of the structure and conformational changes of site-directed spin labelled membrane proteins. In: *Supramolecular Structure and Function 8*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2005:157-177. doi:10.1007/0-306-48662-8_10
195. Hauenschild T, Hinderberger D. A Platform of Phenol-Based Nitroxide Radicals as an "EPR Toolbox" in Supramolecular and Click Chemistry. *Chempluschem.* 2019;84(1):43-51. doi:10.1002/cplu.201800429
196. Rozantsev EG. *Free Nitroxyl Radicals*. (Ulrich H, ed.). Boston, MA: Springer US; 1970. doi:10.1007/978-1-4757-0710-6
197. Chen L, Honma Y, Mizutani T, Liaw DJ, Gong JP, Osada Y. Effects of polyelectrolyte complexation on the UCST of zwitterionic polymer. *Polymer (Guildf)*. 2000;41(1):141-147. doi:10.1016/S0032-3861(99)00161-5
198. Kotsuchibashi Y. Recent advances in multi-temperature-responsive polymeric materials. *Polym J.* 2020;52(7):681-689. doi:10.1038/s41428-020-0330-0
199. Hinderberger D, Jeschke G. Site-specific Characterization of Structure and Dynamics of Complex Materials by EPR Spin Probes. In: *Modern Magnetic Resonance*. Dordrecht: Springer Netherlands; :1529-1537. doi:10.1007/1-4020-3910-7_170
200. Beth AH, Perkins RC, Venkataramu SD, et al. Advantages of deuterium modification of nitroxide spin labels for biological epr studies. *Chem Phys Lett.* 1980;69(1):24-28. doi:10.1016/0009-2614(80)80005-4
201. Park JH, Trommer WE. Advantages of ¹⁵N and Deuterium Spin Probes for Biomedical Electron Paramagnetic Resonance Investigations. In: ; 1989:547-595. doi:10.1007/978-1-4613-0743-3_11
202. Morante A, Forteza R, Cerdá V. Potassium nitrosodisulphonate (fremy's salt) as a new redox thermometric titrant. *Thermochim Acta.* 1987;118(C):215-222. doi:10.1016/0040-6031(87)80084-9
203. Hinderberger D, Spiess HW, Jeschke G. Radial counterion distributions in polyelectrolyte solutions determined by EPR spectroscopy. *Europhys Lett.*

- 2005;70(1):102-108. doi:10.1209/epl/i2004-10459-y
204. Manning GS. Counterion condensation theory of attraction between like charges in the absence of multivalent counterions. *Eur Phys J E*. 2011;34(12):132. doi:10.1140/epje/i2011-11132-6
205. Heller J, Elgabarty H, Zhuang B, Sebastiani D, Hinderberger D. Solvation of small disulfonate anions in water/methanol mixtures characterized by high-field pulse electron nuclear double resonance and molecular dynamics simulations. *J Phys Chem B*. 2010;114(22):7429-7438. doi:10.1021/jp910335t
206. Hinderberger D, Spiess HW, Jeschke G. Probing how counterion structure and dynamics determine polyelectrolyte solutions using EPR spectroscopy. *Appl Magn Reson*. 2010;37(1):657-683. doi:10.1007/s00723-009-0082-7
207. Kirschenbaum LJ, Riesz P. Sonochemical degradation of cyclic nitroxides in aqueous solution. *Ultrason Sonochem*. 2012;19(5):1114-1119. doi:10.1016/j.ultsonch.2012.01.014
208. Schneider DJ, Freed JH. Calculating Slow Motional Magnetic Resonance Spectra BT - Spin Labeling: Theory and Applications. In: Berliner LJ, Reuben J, eds. Boston, MA: Springer US; 1989:1-76. doi:10.1007/978-1-4613-0743-3_1
209. Stoll S, Schweiger A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J Magn Reson*. 2006;178(1):42-55. doi:10.1016/j.jmr.2005.08.013
210. Bechmann W, Bald I. *Einstieg in Die Physikalische Chemie Für Nebenfächler*. 5. Auflage. Berlin and Heidelberg: Springer Spektrum; 2016.
211. Bienz S, Bigler L, Fox T, Meier H. *Spektroskopische Methoden in Der Organischen Chemie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2016. doi:10.1055/b-004-129729
212. Latscha HP, Linti GW, Klein HA. *Analytische Chemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2004. doi:10.1007/978-3-642-18493-2
213. Ritgen U. *Analytische Chemie II*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2020. doi:10.1007/978-3-662-60508-0
214. Provencher SW. A constrained regularization method for inverting data represented by

- linear algebraic or integral equations. *Comput Phys Commun.* 1982;27(3):213-227. doi:10.1016/0010-4655(82)90173-4
215. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release.* 2016;235:337-351. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017
216. Moitzi BPC. Faster, More Sensitive Zeta-Potential Measurements with cmPALS and the Litesizer 500. *Ant Paar Appl Rep.* 2016.
217. Swan JW, Furst EM. A simpler expression for Henry's function describing the electrophoretic mobility of spherical colloids. *J Colloid Interface Sci.* 2012;388(1):92-94. doi:10.1016/j.jcis.2012.08.026
218. Stoll S, Schweiger A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *J Magn Reson.* 2006;178(1):42-55. doi:10.1016/j.jmr.2005.08.013
219. Freed DJSJH. Calculating Slow Motional Magnetic Resonance Spectra. In: Reuben LBJ, ed. *Spin Labeling: Theory and Applications.* Boston, MA: Springer US; 1989:1-76. doi:10.1007/978-1-4613-0743-3_1
220. Timofeev VP, Misharin AY, Tkachev Y V. Simulation of EPR spectra of the radical TEMPO in water-lipid systems in different microwave ranges. *Biophysics (Oxf).* 2011;56(3):407-417. doi:10.1134/S0006350911030274
221. Eisermann J, Hinderberger D. Tuning the shape anisotropy of loosely bound colloid-like ionic clusters in solution. *Phys Chem Chem Phys.* 2019;21(3):1152-1159. doi:10.1039/c8cp06558f
222. Eeman M, Deleu M. From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnol Agron Société Environ.* 2010;14(4):719.
223. Zeiss. No Title. <https://www.micro-shop.zeiss.com/en/de/shop/filterAssistant/filtersets/>. Published 2025.

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dariush Hinderberger für die Bereitstellung der Themen sowie die große Freiheit, die er mir bei der Erforschung desselben eingeräumt hat. Diese Arbeit kann nun als Grundlage für weiterführende Forschung dienen. Ich danke ihm außerdem dafür, dass er mich trotz der langen Bearbeitungszeit nie aufgegeben und mir die Möglichkeit gegeben hat, die Promotion zu vollenden.

Dr. Andreas Kerth, Dr. Christian Schwieger und Dr. Jennica Träger danke ich für die Einführung in die Welt der Langmuir-Monoschichten. Durch eure kontinuierliche technische und moralische Unterstützung konnte das P2-Protein Einzug in die Monoschicht-Experimentlandschaft finden. Dr. Träger danke ich insbesondere für die Einführung in die spezielle Art der Epifluoreszenzmessung mit Myelinproteinen an der Langmuir-Monoschicht.

Insbesondere danke Jun.-Prof. Jana Eisermann ich für die Einführung in die EPR. Ich werde die vielen Stunden nicht vergessen, die wir gemeinsam vor MATLAB-Skripten und finalen Simulationen verbracht haben, um auch die letzten Informationen aus den dargestellten Spektren herauszuarbeiten.

Flo L, Sebastian, Heike und Steffi – euch danke ich namentlich, ebenso wie dem gesamten Team der AG Hinderberger, für die tolle Zeit und die vielfältige Unterstützung: von den wöchentlichen PhD-Sitzungen bis hin zur Suche- und den Aufbau-Sessions im Syn-Lab oder am MS5000. Danke!

Zuletzt gilt mein tiefster Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich in dieser herausfordernden Zeit bedingungslos unterstützt haben. Besonders danke ich meiner Frau Maura sowie unseren Söhnen Theodor und Frederik. Ihr habt mir immer wieder neue Perspektiven eröffnet und mir so den Mut und die Energie gegeben, diese Arbeit zu vollenden.

11. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich diese vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), 26.06.2025

Florian Arndt Schöffmann

12. Lebenslauf

seit April 2025	Stellvertretender Leiter der Krankenhausapotheke Abteilungsleitung Klinische Versorgung Apotheke, Universitätsklinikum Ruppin-Brandenburg
Jan. 2025 – März 2025	IT-Projektleiter Geschäftsbereich Informations- und Medizintechnik Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R.
Aug. 2022 – Dez. 2024	Angestellter Apotheker Abteilung: KHZG / Stationsapotheker Zentralapotheke, Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R.;
Jan. 2019 - Juni 2022	Angestellter Apotheker (in Teilzeit) Burg Apotheke Halle (Saale)
Jan. 2018 - Juli 2022	Doktorand & wissenschaftlicher Mitarbeiter AG Prof. Dr. Dariush Hinderberger Physikalische Chemie, Komplexe selbstorganisierende Systeme Institut für Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Herbst 2017	3. Staatsexamen (1,0) Approbation als Apotheker
April 2017 – Okt. 2017	Pharmazeut im Praktikum apo-rot Horus Apotheke, Potsdam
Okt. 2016 - März 2017	Pharmazeut im Praktikum & Diplomand AG PD habil. Dr. Simon Drescher Biophysikalische Pharmazie Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2012	Allgemeine Hochschulreife Fläming Gymnasium, Bad Belzig

13. Publikationsliste

1. Haeri HH, Blaffert J, Schöffmann FA, et al. Concentration effects in the interaction of monoclonal antibodies (MABs) with their immediate environment characterized by EPR spectroscopy. *Molecules*. 2019;24(14):2528. doi:10.3390/molecules24142528
2. Eisermann J, Hoffmann M, Schöffmann FA, et al. Molecular-Level Interactions of Nanodisc-Forming Copolymers Dissected by EPR Spectroscopy. *Macromol Chem Phys*. 2021;222(11). doi:10.1002/macp.202100051
3. Hoffmann M, Eisermann J, Schöffmann FA, et al. Influence of different polymer belts on lipid properties in nanodiscs characterized by CW EPR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2021;1863(10):183681. doi:10.1016/j.bbamem.2021.183681
4. Michler S, Schöffmann FA, Robaa D, Volmer J, Hinderberger D. Fatty acid binding to the human transport proteins FABP3, FABP4, and FABP5 from a Ligand's perspective. *J Biol Chem*. 2024;300(6):107396. doi:10.1016/j.jbc.2024.107396
5. Schöffmann FA, Imran MAS, Schwieger C, Hetland Ø, Jaschabek V, Raasakka A, Kursula P, Hinderberger D Human Peripheral Myelin Protein 2 and its Charcot-Marie-Tooth Disease Variants Show Different Binding to Myelin-Like Lipid Monolayers. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. – In process