

**Physikochemische Charakterisierung des Einflusses
lokaler Umgebungsveränderungen
auf myelinartige Membranmodelle**

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

Frau Jennica Träger

geb. am 05.09.1993 in Kirkland, USA

Gutachter: Herr Prof. Dariush Hinderberger

Frau Prof. Claudia Steinem

Datum der Verteidigung: 06.10.2021

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND MOTIVATION.....	1
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	3
2.1	Das basische Myelin-Protein	3
2.2	Die Lipide	7
2.2.1	Struktur und Selbstanordnung der Lipide.....	7
2.2.2	Relationen zwischen verwendeten Lipiden und MBP.....	11
2.3	Divalente Metallionen	14
2.4	Methoden zur Untersuchung von Lipidmonoschichten	16
2.4.1	Langmuir-Filmwaagen	16
2.4.1.1	Kompressions-Experimente.....	17
2.4.1.2	Erweiterte Optionen zur Auswertung von Kompressionsisothermen	19
2.4.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	20
2.5	Methoden zur Untersuchung von Lipiddoppelschichten	21
2.5.1	Dynamische Lichtstreuung	21
2.5.2	Elektrophoretische Lichtstreuung.....	24
2.5.3	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie	27
2.5.3.1	Continuous wave EPR-Spektroskopie.....	30
2.5.3.2	Puls EPR-Spektroskopie	33
2.5.4	Transmissionselektronenmikroskopie	35
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	37
3.1	Einfluss des Cholesterolgehaltes in myelinartigen Monoschichten auf die Interaktion mit MBP an der Luft/Wasser-Grenzfläche	37
3.1.1	Kompressionsisothermen	38
3.1.2	Analyse der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen	43
3.1.3	Schlussfolgerung	51
3.2	Untersuchungen an Lipiddoppelschichten	53
3.2.1	Einfluss des Cholesterolgehaltes in myelinartigen LUVs auf die Interaktion mit MBP.....	54
3.2.1.1	Visualisierung des Einflusses des Cholesterolgehaltes mittels Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie	55
3.2.1.2	Auswirkungen des Cholesterolgehaltes auf Partikelgröße und –verteilung (dynamische Lichtstreuung)	59

3.2.1.3	Einfluss des Cholesterolgehaltes auf das Zeta-Potential der Vesikel (elektrophoretische Lichtstreuung)	63
3.2.1.4	Untersuchungen des spinmarkierten Cholesterols mittels EPR	65
3.2.1.4.1	Continuous wave EPR.....	66
3.2.1.4.2	DEER-Messungen	72
3.2.1.5	Schlussfolgerung	74
3.2.2	Untersuchung des Einflusses von divalenten Metallionen auf die Interaktion von MBP mit myelinartigen LUVs.....	76
3.2.2.1	Einfluss des Metallionengehalts auf Form und Größe der myelinartigen Vesikel (dynamische Lichtstreuung).....	78
3.2.2.2	Beeinflussung des Zeta-Potentials durch divalente Metallionen (elektrophoretische Lichtstreuung)	79
3.2.2.3	Visualisierung des Einflusses von divalenten Metallionen auf die LUV-MBP- Interaktion mittels Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie.....	81
3.2.2.4	Untersuchungen des spinmarkierten PC mittels EPR-Spektroskopie	88
3.2.2.4.1	Continuous wave EPR.....	89
3.2.2.4.2	DEER-Messungen	98
3.2.2.5	Schlussfolgerung	100
4	MATERIALIEN UND METHODEN	102
4.1	Materialien	102
4.2	Filmwaagen-Messungen.....	103
4.2.1	Kompressionsexperimente	103
4.3	Fluoreszenzmessungen.....	104
4.4	Präparation der Vesikel	104
4.5	Dynamische Lichtstreuung.....	105
4.6	Elektrophoretische Lichtstreuung	107
4.7	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie.....	108
4.7.1	Continuous wave EPR.....	108
4.7.2	Puls EPR	110
4.8	Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie	111
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	113
6	AUSBLICK.....	116
7	LITERATURVERZEICHNIS	118
8	ANHANG.....	139

8.1	Anhang zu Kapitel 3.1	140
8.2	Anhang zu Kapitel 3.2.1	169
8.3	Anhang zu Kapitel 3.2.2	183

Abkürzungen

\bar{A}	theoretische ideale Oberfläche / \AA^2
a	Teilchenradius
A_i	Fläche / \AA^2 oder Hyperfeinkopplungstensorelement (EPR)
a_{iso}	isotrope Hyperfeinkopplungskonstante
$a_{iso,app}$	scheinbare isotrope Hyperfeinkopplungskonstante / MHz
Ala	Alanin
A_{mix}	Oberfläche der gemischten Monoschicht / \AA^2
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
ATR-FTIR	abgeschwächte Totalreflexions-Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
B	Magnetfeld (EPR) oder Steigung (DLS)
C	Basislinie
CBD	Cholesterol-Doppelschicht-Domänen
Chol	Cholesterol
cmPALS	kontinuierlich überwachte Phasenanalyse-Lichtstreuung
CSL	spinmarkiertes Cholestan (s. Abbildung A17c)
CSOSL	spinmarkiertes Cholesterol (s. Abbildung 28)
Cu^{2+*}	divalente Kupfer-Ionen (Konzentration 14 μM)
cw	<i>continuous wave</i>
D	Diffusionskoeffizient
DEER	Elektron-Elektron-Doppelresonanz (<i>double electron electron resonance</i>)
d_H	hydrodynamischer Durchmesser
D_i	Rotationsdiffusionstensorelement / ns^{-1}
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMPA	1,2-Dimyristoyl-phosphatidsäure
DSC	dynamische Differenzkalorimetrie (<i>differential scanning calorimetry</i>)
EAE	experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis
ELS	Elektrophoretische Lichtstreuung
EPR	Elektronenspinresonanz
ESE	Elektronenspin-Echo
ESEEM	<i>electron spin echo envelope modulation</i>
G	gasanaloge Phase

g	Landé-Faktor
$g_2(\tau)$	Intensitätskorrelationsfunktion
Glu	Glutaminsäure
h_0/h	Höhenverhältnis des Mittel- zu Hochfeldpeaks
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H_{II}	invertiert hexagonale Phase
His	Histidin
\hat{H}_S	Spin-Hamilton-Operator
I	Intensität (LS), Ionenstärke (ELS) oder Kernspin (EPR)
IDP	intrinsisch ungeordnetes Protein (<i>intrinsically disordered protein</i>)
IPL	<i>intraproduct line</i>
k_B	Boltzmann-Konstante
Kryo-TEM	Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie
LC	flüssig-kondensierte Phase (<i>liquid condensed</i>)
L_c	kristalline Phase
LE	flüssig-expandierte Phase (<i>liquid expanded</i>)
LUV	große unilamellare Vesikel (<i>large unilamellar vesicles</i>)
Lys	Lysin
L_α	flüssigkristalline Phase
L_β	Gel-Phase (<i>solid-ordered phase</i>)
M^{2+}	divalente Metallionen
MBP	basisches Myelin-Protein (<i>myelin basic protein</i>)
MDL	<i>major dense line</i>
m_I	magnetische Kernspinquantenzahl
MIP	maximaler Insertionsdruck / mN m^{-1}
MLV	multilamellare Vesikel
MOBP	<i>myelin-associated oligodendrocytic basic protein</i>
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Multiple Sklerose
m_S	magnetische Elektronenspinquantenzahl
n_i	Stoffmenge / mol
OSP	<i>oligodendrocyte-specific protein</i>
PC	Phosphatidylcholin
PDI	Polydispersitätsindex

PE	Phosphatidylethanolamin
Phe	Phenylalanin
PI	Phosphatidylinositol
PLP	Proteolipid-Protein
Pro	Prolin
PS	Phosphatidylserin
PTMs	posttranslationale Modifikationen
P_β	Rippel-Phase
q	Wellenvektor
Rh-DHPE	1,2-Dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylethanolamin- <i>N</i> -(lissamin-rhodamin-B-sulfonyl)
S	festanaloge Phase (<i>solid</i>)
SAXS	Kleinwinkel-Röntgenstreuung (<i>small angle x-ray scattering</i>)
SM	Sphingomyelin
T	Temperatur
t	Zeit
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl
TempoPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho(2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl)cholin (s. Abbildung 38)
Thr	Threonin
T_m	Phasengedächtniszeit
U_E	elektrophoretische Mobilität
v	Geschwindigkeit
x_i	Molenbruch
ZNS	Zentrales Nervensystem
β	Euler-Winkel
Γ	Oberflächenkonzentration (Monoschichten) oder Abklingrate (DLS)
γ	Oberflächenspannung der Subphase mit Monoschicht / mN m ⁻¹
γ₀	Oberflächenspannung der Subphase ohne Lipid-Monoschicht / mN m ⁻¹
ΔG_{excess}	überschüssige freie Mischungsenergie / kJ mol ⁻¹
ΔH₊	Peak-zu-Peak-Abstand des Tieffeldpeaks / G
Δπ	Differenz des Oberflächendrucks / mN m ⁻¹
ζ	Zeta-Potential / mV
η	Viskosität

θ	Streuwinkel
κ	Kompressibilität / mN/m^{-1}
κ^{-1}	Debey-Länge
λ	Wellenlänge / nm
μ_B	Bohr'sche Magneton
ν	Frequenz / MHz
π	Oberflächendruck / mN m^{-1} oder 180° (EPR-Pulslänge)
π/A -Isotherme	Oberflächendruck/Flächen-Isotherme
π_{initial}	Start-Oberflächendruck / mN m^{-1}
τ	Korrelationszeit (DLS), Rotationskorrelationszeit (EPR) oder freie Evolutionszeit (EPR)
τ_{corr}	berechnete Rotationskorrelationszeit / ns
\emptyset	Durchmesser

1 Einleitung und Motivation

Lipide und Proteine sind die Hauptkomponenten aus denen alle Zellmembranen bestehen. Dabei dienen Proteine dazu die vielfältigen Funktionen einer Zellmembran wahrzunehmen und Lipide bilden die dazu benötigte Grundstruktur der Lipiddoppelschichten. Beide Komponenten werden benötigt, um funktionsfähige biologische Zellmembranen zu bilden. Je nach Struktur und Funktion interagieren Membranproteine dabei unterschiedlich mit der Membran und oberflächengebundene Membranproteine können in intrinsische (hydrophobe Anhaftung) und periphere (elektrostatische Wechselwirkung oder Wasserstoffbrückenbindung) Proteine eingeteilt werden. [1]

Eine besondere Art der Membranproteine stellen die intrinsisch ungeordneten Proteine (*intrinsically disordered proteins*; IDPs) dar. Diese können nach Funktion, Struktur, Sequenz, Evolution, Eigenschaften und Regulierungen klassifiziert werden (siehe van der Lee *et al.* [2] für detaillierte Informationen). Mit den Jahren hat man sich auf die allgemeine Bedeutung verständigt, dass „intrinsisch ungeordnet“ definiert ist als ein entsprechendes Protein (oder eine Proteinregion), das biologisch aktiv ist, jedoch als kollabiertes oder erweitertes, dynamisch mobiles Konformationsensemble existiert, entweder auf der Ebene der Sekundär- oder Tertiärstruktur [3–5]. Das klassische Struktur-Funktions-Paradigma impliziert, dass die Proteinsequenz die Struktur definiert, die wiederum die Funktion bestimmt. IDPs widerlegen jedoch diese strikte Einteilung der Proteine, denn ungeordnete Regionen der Proteine, die wahrscheinlich keine definierte dreidimensionale Struktur bilden, können ebenfalls eine bestimmte Funktion ausführen [4–9]. Die Konformation von IDPs hängt von deren Umgebung oder von der Assoziation mit Bindungspartnern ab und spielt eine wichtige Rolle bei Funktionen wie der Signalübertragung[10], der Zellsignalisierung[10,11] oder der Chaperonaktivität[12].

Eines dieser intrinsisch ungeordneten Proteine ist das basische Myelin-Protein (MBP), das ein großer Bestandteil des Myelins im zentralen Nervensystem ist. MBP zeigt fast alle phänomenologischen Eigenschaften von IDPs: *fuzzy*-Protein-Protein-Komplexe[13], Wechselwirkung mit vielen Interaktionspartnern[14,15], multiple Funktionen (*moonlighting*) und *cross-talk* von Interaktionssegmenten[16], und Störungen von IDP-Interaktionsnetzwerken bei Erkrankungen des Menschen[17,18]. Das basische Myelin-Protein ist von Interesse bei der Erforschung der Aufklärung von demyelinisierenden Erkrankungen (wie Multiple Sklerose (MS), Neuromyelitis Optica (NMO), akute demyelinisierende Enzephalomyelitis (ADEM)) [19,20]. Bei Multipler Sklerose, könnte es insbesondere für das Fortschreiten dieser stark schwächenden, demyelinisierenden Autoimmunerkrankung relevant sein. MBP wirkt als „molekularer Klebstoff“ zwischen zwei gegenüberliegenden Seiten der Oligodendrozytenmembran und ist hauptsächlich für die Verdichtung der Myelinscheide verantwortlich (mehr Informationen sind in Kapitel 2.1

zu finden). Die genaue Reihenfolge der Ereignisse bezüglich der Konformation, Orientierung und Selbstorganisation von MBP auf einer einzelnen Membranoberfläche ist jedoch nicht bekannt.

Wie bereits in mehreren Studien beschrieben, ist die Membran in der Myelinscheide anfällig für Änderungen im umgebenden System [21,22]. Änderungen der biophysikalischen Eigenschaften der Myelinmembran werden als Schlüsselfaktoren für die Entwicklung demyelinisierender Erkrankungen wie Multiple Sklerose (MS) vermutet. Die Nähe der Membran zur strukturellen Phasenübergangsgrenze der Lipide macht sie anfällig für geringfügige lokale Umgebungsveränderungen. Es ist von großem Interesse derartige Bedingungen zu bestimmen, welche die Struktur verändern, da die Anfälligkeit der Membrane eine mögliche Ursache für die Erkrankung von MS Patienten ist.

Man hofft durch das Verständnis der MBP-Lipid-Wechselwirkung Multiple Sklerose besser zu verstehen. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Einfluss von sowohl Cholesterol als auch von divalenten Metallionen (Zink, Kupfer) auf Lipidmembranmodelle in Abwesenheit und Präsenz von MBP untersucht. Dazu wurden unter anderem Lipidmonoschichten als Membranmodell verwendet und deren Kompressionsverhalten an der Luft/Wasser-Grenzfläche in Kombination mit Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Weiterhin wurden große unilamellare Vesikel als Lipiddoppelschichtmodell hergestellt und mittels Kryotransmissionselektronenmikroskopie, dynamischer Lichtstreuung, elektrophoretischer Lichtstreuung und Elektronenspinresonanz-Spektroskopie beleuchtet. Diese Methoden lieferten Einblicke auf verschiedene Eigenschaften der Vesikel und deren Interaktion mit MBP. Alle Messtechniken und Basiswissen über MBP und die Lipide werden zunächst in den Grundlagenkapiteln erläutert. Anschließend werden die Ergebnisse und dazugehörigen Diskussionen dargestellt.

2 Theoretische Grundlagen

Im Folgenden werden die Eigenschaften von basischem Myelin-Protein und die allgemeinen Grundlagen von Lipiden beschrieben. Anschließend werden die Beziehungen zwischen MBP, Lipiden und divalenten Metallionen dargestellt und eine Einführung in die verwendeten Methoden gegeben.

2.1 Das basische Myelin-Protein

Myelin ist ein lipidreiches, multilamellares Konstrukt von Membranprozessen, die sich von Oligodendrozyten bis Schwann-Zellen erstrecken und bildet eine isolierende Hülle um Nervenaxone im zentralen und peripheren Nervensystem. [23] Die Myelin-Hülle kommuniziert sowohl mit dem darunterliegenden Axon, als auch mit der externen Umgebung und ermöglicht durch Salzleitungen die schnelle Übertragung von Nervenimpulsen. Im zentralen Nervensystem (ZNS), das sich im Gehirn und Rückenmark befindet, ist hauptsächlich das basische Myelin-Protein (MBP) dafür verantwortlich, dass die zytoplasmatischen Oberflächen des multilamellaren, kompakten Myelins verbunden werden (siehe Abbildung 1 für Aminosäuresequenz). Neben dem Proteolipid-Protein (PLP) ist MBP das am häufigsten auftretende Protein im ZNS. [23–25]

```
      10          20          30          40          50
AAQKRPSQRS KYLASASTMD HARHGFLPRH RDTGILDSLGRFFGSDRGAP
      60          70          80          90          100
KRGSGKDGHH AARTTHYGSL PQKAQGHPRQ DENPVVHFFK NIVTPRTPPP
      110         120         130         140         150
SQGKGRGLSL SRFSWGAEQG KPGFGYGGRA SDYKSAHKGL KGHDAQGTLS
-----
      160
KIFKLGGRDS RSGSPMARR
```

Abbildung 1: Aminosäuresequenz von bovinem MBP mit α -helikalen Bereichen (rot, gestrichelt). Histidin: grün, positive Aminosäuren (Lys, Arg): orange, negative Aminosäuren (Asp, Glu): blau.

MBP ist ein intrinsisch ungeordnetes Protein (IDP)[14,25,26] und entsteht aus dem Gen in der Oligodendrozyten-Linie in differenzierten Oligodendrozyten [24]. IDPs sind Proteine, die intrinsisch mit der Membran wechselwirken, das heißt im Gegensatz zu peripheren Proteinen, die mehr oder weniger eng mit der Oberfläche der Membran assoziieren (Ionen- oder Wasserstoffbrückenbindung) und dort über lipophile Ketten verankert sind, reichen diese in die Membran hinein oder sogar hindurch [27,28]. Des Weiteren besitzen IDPs im Allgemeinen eine höhere Nettoladung und einen niedrigeren Anteil hydrophober Aminosäuren im Vergleich zu klassisch gefalteten Proteinen [29]. Sie interagieren mit

einer Vielzahl von Bindungspartnern, sind hochflexibel und ausgedehnt in ihrer räumlichen Struktur, können aber auch kompaktere Zustände annehmen, z. B. durch elektrostatische Wechselwirkungen [3,30–32].

Die verschiedenen Isoformen von MBP reichen im Molmassenbereich von 14-21,5 kDa. Die 18,5 kDa Spleiß-Isoform ist das häufigste MBP im erwachsenen menschlichen Gehirn. Es weist bei neutralem pH 19 positive Ladungen und Dimensionen von 55x47x40 Å³ auf, wenn an eine Membran gebunden [33]. Im Fall von MBP treten viele Protein-Lipid- oder Protein-Protein-Wechselwirkungen (mit Fyn Kinase, zytoskeletalen Elementen, Calmodulin) auf [34]. In wässriger Lösung nimmt MBP eine ausgedehnte Konformation an, in der Gegenwart von Lipiden bildet MBP jedoch Sekundärstrukturen aus. Beim Übergang von einer wässrigen zu einer membranassoziierten Umgebung unterzieht sich die 18,5 kDa Isoform einem ungeordnet-zu- α -helikalen-Übergang (Abbildung 2). Dabei werden drei amphipathische, α -helikale Segmente gebildet, die in den N- und C-Termini anzutreffen sind (Abbildung 1), welche mit der Lipiddoppelschicht in Wechselwirkung treten. [14,21,35,36]

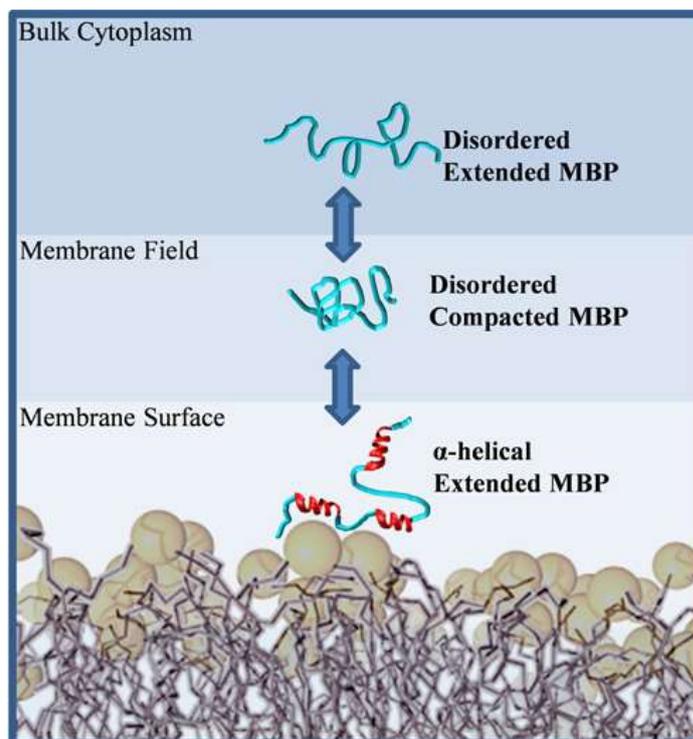


Abbildung 2: Vorgeschlagener Mechanismus des ungeordnet-zu- α -helikalen-Übergangs von 18,5-kDa-MBP nach Vassall *et al.* [21].

Die Interaktion zwischen MBP und Lipiden beruht auf Wechselwirkungen zwischen basischen, positiv geladenen MBP-Resten und den aziden, negativ geladenen Kopfgruppen der Lipide [37]. Allerdings ist auch die Lipidzusammensetzung der Membran, die Anwesenheit von Metallionen (z. B. Ca²⁺, Zn²⁺), die daraus resultierende Ionenstärke und die MBP-Variante von Bedeutung. Die Wechselwirkung von MBP mit der

phospholipidreichen, zytoplasmatischen Seite der Myelin-Membran führt zu Ladungsneutralisation, Protein-Faltung und partieller Insertion in die Membran [21]. Raasakka *et al.* [22] haben erst kürzlich einen plausiblen Stapel-Mechanismus beschrieben (Abbildung 3), in dem freies MBP (rot, Abschnitt 1 Abb. 3) durch die negativen Ladungen der Lipide angezogen wird, die Ladungen neutralisiert, sich teilweise faltet und an diese bindet (Abschnitt 2 Abb. 3). Diese intermediate Form, die nun als Oberfläche einen verlängerten MBP-Abschnitt aufweist, reichert sich mit einseitig integriertem MBP an und bildet eine stark positiv geladene, bürstenähnliche Anordnung (Abschnitt 3 Abb. 3). Wenn eine kritische Proteinkonzentration (gebunden an die Membran) erreicht ist, interagieren die bürstenähnlichen „Proteintentakeln“ mit einer gegenüberliegenden Membran (Abschnitt 4 Abb. 3). Die kompakt gestapelten Membranen entstehen durch eine Phasenumwandlung von MBP (abhängig von zwei doppel-Phe-Mustern), in der MBP die finale C-Form annimmt und die Membranen wie ein Kleber zusammenhält. Der Abstand zwischen den durch MBP verknüpften Membranen bildet die *major dense line* und liegt im Bereich von 3 nm.

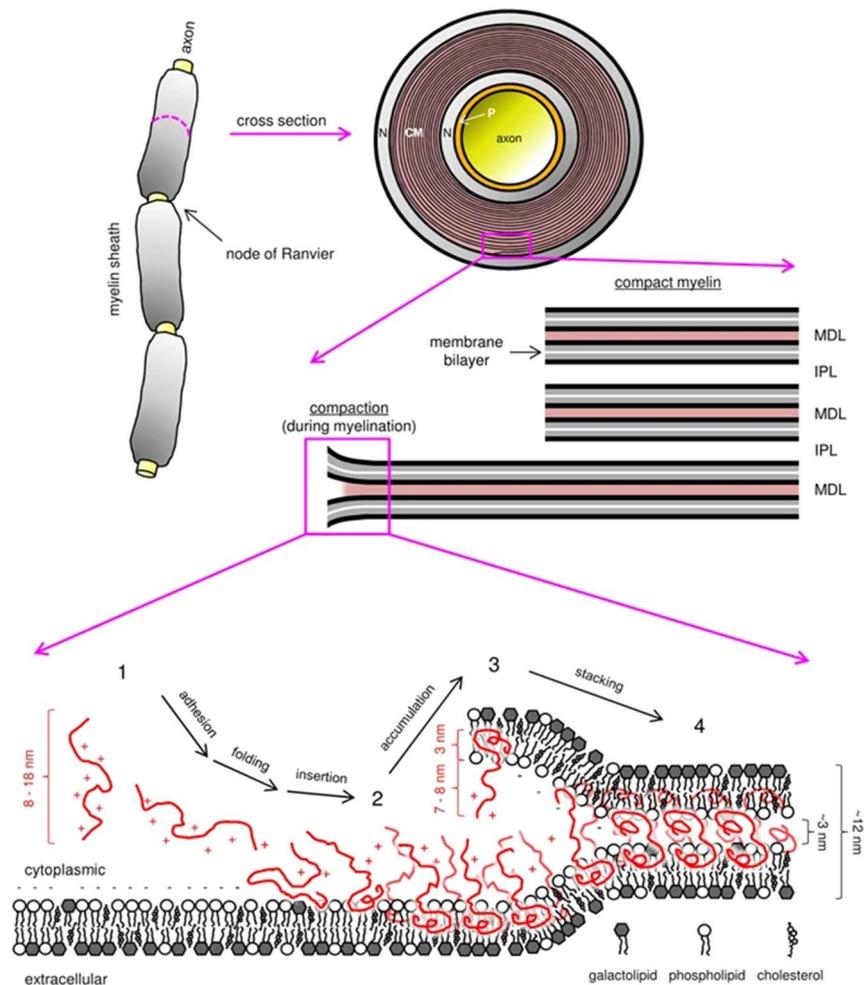


Abbildung 3: Schema der Assoziation von MBP mit Myelin-Membran. Es wird eine Möglichkeit dargestellt, wie das kompakte Myelin, bestehend aus major dense line (MDL), *intraperiod line* (IPL) und den Lipidmembranen, durch die Wechselwirkung mit MBP (rot) gebildet werden kann. Grafik aus Raasakka *et al.* [22]. Weitere Beschreibung der Abbildung siehe vorherigen Textabschnitt.

Es gibt verschiedene Ladungsvarianten von MBP, die normalerweise mit einer abnehmenden positiven Nettoladung von C1 bis C8 bezeichnet werden, die durch posttranslationale Modifikationen (PTMs) wie Deiminierung, Phosphorylierung, Desamidierung, Methylierung oder N-terminale Acylierung gebildet werden [38,39]. Die C1 Komponente repräsentiert dabei die am wenigsten modifizierte Variante mit einer Nettoladung von +19 (pH 7). C2 bis C8 unterscheiden sich im sukzessiven Verlust einer weiteren positiven Ladung. Vermehrte, irreversible Deiminierung von MBP ist verknüpft sowohl mit der natürlichen Entwicklung des Myelins, als auch mit Merkmalen der Multiplen Sklerose [38,40].

Multiple Sklerose (MS) ist eine neurodegenerative Erkrankung in Form einer entzündlichen Erkrankung des Zentralnervensystems, die durch einen Autoimmunangriff verursacht wird. Charakteristisch sind das Auftreten von Läsionen, Verlust der Membran-Adhäsion, das Anschwellen der Wasserlücken, Vakuolisierung, Vesikulation und Zerfall der Myelinstruktur. [41] Ein Zeichen ist der allmähliche Abbau der Myelinscheide durch Demyelinisierung. Der Verlust der elektrischen Isolation des Axons führt zu einer fehlerhaften Signalübertragung, die zum Verlust der motorischen und sensorischen Fähigkeiten führt. Viele Myelinproteine bilden Antigene, die mit MS verbunden sind. In schweren Fällen von MS und in Tiermodellen wie EAE (experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis) sind die modifizierten, ladungsreduzierten Varianten, insbesondere bis C8 (Nettoladung von +13 bei pH 7) viel häufiger anzutreffen [42,43]. Die Demyelinisierung ist unter anderem abhängig von der MBP-Konzentration [22], der Menge der Varianten, der Lipidzusammensetzung und dem Ionengehalt [44,45]. Alles in Allem gibt es sehr viele Parameter in Bezug auf MBP zu beachten, die MS auslösen könnten. Es wurde bisher kein pathologischer Mechanismus bestätigt, allerdings ist man sich einig, dass es vermutlich nicht einen Auslöser (wie genetische Prädisposition) gibt, sondern mehrere Faktoren (wie unterschiedliche Umweltfaktoren) den Ausbruch begünstigen. Beispielhafte Mechanismen haben Raasakka *et al.* [34] beschrieben (Abbildung 4). Ausgehend von freiem, maximal positiv geladenem MBP würde normalerweise dieses mit Membranen assoziieren, einen Vorstapelzustand bilden und sich weiter ansammeln, bis sich stabile Membranstapel bilden (wie bereits oben in Abbildung 3 beschrieben). Durch ladungsreduzierende Modifikationen entstehen die Varianten C2-C8, die sich anders falten und an Membranen binden. Dadurch kommt es zu einem suboptimalen Vorstapelzustand, der auch durch eine Veränderung in der Lipid- oder Ionenkomposition herbeigeführt werden könnte. Der suboptimale Zustand könnte dann, genauso wie die ladungsreduzierten Varianten, einer Proteolyse unterzogen werden. Ein in eine Membran eingebautes, gefaltetes MBP-Molekül ist ein schlechteres Substrat für Proteasen oder andere modifizierende Enzyme im Vergleich zu dem einseitig, membran-interagierenden MBP (wie im Vorstapelzustand). Das abgebaute Protein könnte dann durch molekulare *mimicry* eine Autoimmunreaktion herbei oder zu einer geringeren Myelinisierung führen, welche in Demyelinisierung bzw. MS resultieren. [22,34]

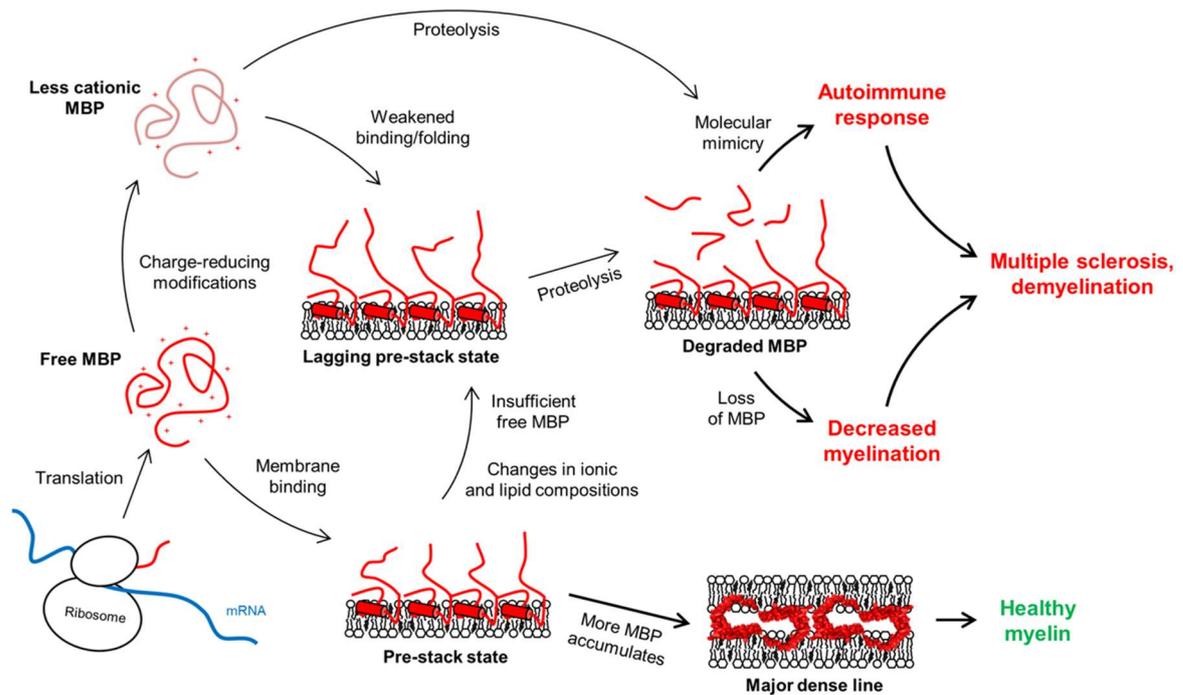


Abbildung 4: Möglicher pathologischer Mechanismus für die Bildung von gesundem und erkranktem Myelin nach Raasakka *et al.* [34]. Änderungen der Membranlipidzusammensetzung, der Konzentration intrazellulärer Ionen oder Proteolyse können zum Verlust von gesundem MBP (rot) führen. Weiterführend könnte eine Immunantwort zu der Entwicklung von MS führen. Grafik entnommen aus Raasakka *et al.* [34]. Weitere Beschreibung der Abbildung siehe vorherigen Textabschnitt.

Das hier verwendete bovine MBP ist ein kommerziell erworbenes Gehirnextrakt des Rindes und ist deshalb eine Mischung aus MBP-Ladungsvarianten. Die Hauptspezies ist jedoch die 18,5 kDa Isoform. Die Mischung aus verschiedenen Ladungsvarianten simuliert das natürliche Auftreten von MBP im ZNS.

2.2 Die Lipide

2.2.1 Struktur und Selbstanordnung der Lipide

Lipide kommen in den verschiedensten Membranen der Lebewesen vor und verrichten dort spezifische Aufgaben. In Zellmembranen fungieren sie als Separatoren zwischen der inneren und äußeren Umgebung, ermöglichen den regulierten Austausch/Transport von Molekülen und Information und tragen somit zur Organisation des Stoffwechselweges bei. [1]

Membranen sind sehr dynamische Strukturen, die einer zweidimensionalen Flüssigkeit ähneln. Beschrieben werden sie meist durch das flüssig-Mosaik-Modell von S. J. Singer und G. L. Nicolson [46], das Membranen als viskose und fluide Schichten beschreibt, die

die Bildung von Lipiddomänen und Protein-Clustern unterschiedlicher Zusammensetzung ermöglicht. Zu beachten ist jedoch, dass die Verteilung von Lipiden und Proteinen in Membranen asymmetrisch und nicht zufällig ist und sich Strukturen nicht im thermodynamischen Gleichgewicht befinden. Zusätzlich ist die Diffusion nicht nur von der Fluidität, sondern auch von der Immobilisierung von Proteinbarrieren abhängig. Außerdem wird die Krümmung und Elastizität (mechanische Eigenschaften) von Membranen durch die Lipidkomposition und -verteilung beeinflusst. [47,48]

Die gängigsten Lipidarten sind Phospholipide, Glycolipide und Sterole. Erstere Gruppe enthält unter anderem die Glycerophospholipide und Sphingomyeline, beide Arten werden in dieser Arbeit, neben Cholesterol, verwendet. Generell bestehen Glycerophospholipide aus einer polaren Kopfgruppe, einem polaren Phosphoglycerol-Rückgrat und zwei unpolaren Kohlenwasserstoffketten (gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren) (siehe Abbildung 5 und Abbildung 6 für Beispiele). Durch den Austausch der Kopfgruppe kann deren Ladung und Größe verändert werden. Ebenso können die Anzahl der Kettensegmente und Doppelbindungen (Sättigungsgrad) der Kohlenwasserstoffketten variiert werden. Phospholipide sind gewöhnlich verantwortlich für den Aufbau einer Membranstruktur, indem diese zu geschlossenen, bimolekularen Blättern organisiert werden [1,49]. Dabei wird eine Hälfte der Lipiddoppelschicht (einzelne Molekülschicht) als Monoschicht bezeichnet (Abbildung 5). Lipide, als eine Art von Amphiphilen, ordnen sich stets parallel zueinander an, so dass sich die polaren Kopfgruppen in einer Monoschicht der wässrigen Phase zuwenden (siehe Abbildung 6). Die unpolaren Acylketten weisen somit immer von der wässrigen Phase weg. Zwei Lipidmonoschichten können sich hydrophob über die unpolaren Kettenseiten zu einer Doppelschicht koppeln. Durch die nach außen zeigenden polaren Kopfgruppen sind geschlossene Doppelschichten wasserlöslich. Da die Phospholipide in dieser Arbeit vorherrschend sind, wird für die Darstellung und Beschreibung von Membranen/Doppelschichten die Grundanordnung der Phospholipide angenommen.

Die Lipidmonoschicht kann als Modell für eine halbe Schicht der Zellmembran (Doppelschicht) verwendet werden. Es können physikalische Eigenschaften des Lipidsystems wie Struktur und Phasenverhalten untersucht werden. An der Luft/Wasser-Grenzfläche ordnen sich die Lipide so an, dass die Kopfgruppe in Richtung der wässrigen Subphase und die Ketten Richtung Luft ausgerichtet sind. Speziell bei Monoschichten auf Wasser können laterale Eigenschaften wie Phasenseparation, Diffusion und Packungsweise betrachtet werden. [27,49] Als vereinfachtes Modell für die innere Myelinscheide wird in dieser Arbeit eine Monoschicht der oben genannten Lipidmischung verwendet. Siehe weiter Informationen zu Monoschichten in Kapitel 2.4.

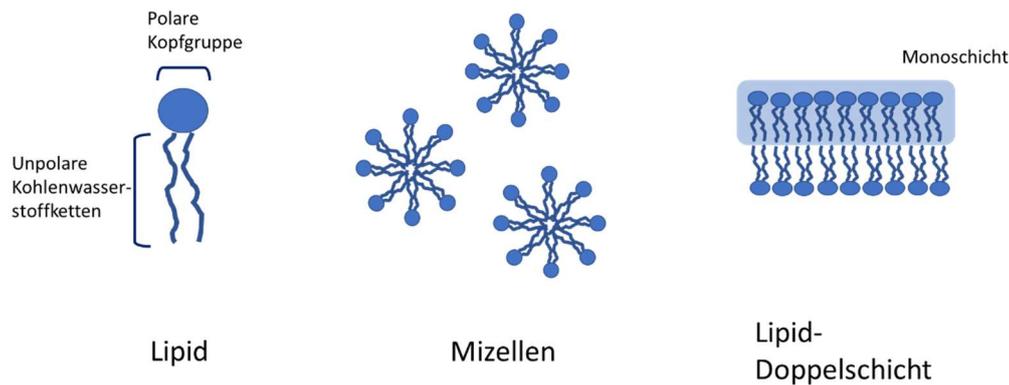


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Lipid-Monomereinheit (links) mit polarer Kopfgruppe und unpolaren Kohlenwasserstoffketten, Mizellen aus Lipiden (Mitte) und eine Lipiddoppelschicht aus zwei entgegengesetzten Monoschicht-Einheiten (rechts). Adaptiert von T. Heimburg, *Thermal Biophysics of Membranes*, S. 15 [49].

Aufgrund des amphiphilen Charakters von Lipiden neigen diese dazu, Aggregate zu bilden, um die hydrophoben Ketten von Wassermolekülen abzuschirmen (hydrophober Effekt [50]). Dabei ist die Bildung von Lipid-Aggregaten konzentrations-, form- und temperaturabhängig. [1,27] Ab einer bestimmten kritischen Mizellenbildungskonzentration aggregieren Lipide zu Mizellen (Abbildung 5). Dies betrifft vorrangig Lipide mit einer Kegel-Form (meist mit einzelnen Fettsäureresten oder Detergenzien). [51] Bei noch höheren Konzentrationen werden Lipiddoppelschichten (Mesophasen) gebildet, die sich in verschiedenen Phasenzuständen befinden können. Mit steigender Temperatur werden meist folgende Phasen, die eine abnehmende Ordnung der Ketten anzeigen, durchlaufen: L_C -, $L_{\beta'}$ -, $P_{\beta'}$ - und L_{α} -Phase. [52] Als L_C beschreibt man die kristalline Phase, in der die Lipidketten alle in der *all-trans* Konformation angeordnet sind. In der Gel-Phase (quasi-hexagonales Gitter oder auch *solid-ordered*, $L_{\beta'}$) sind die Kohlenwasserstoffketten hauptsächlich in *all-trans* anzutreffen, aber mit einer Neigung im Bezug zur Membrannormalen. Die Rippel-Phase[53] (hexagonales Gitter, $P_{\beta'}$) beschreibt den Übergang zwischen $L_{\beta'}$ und L_{α} . In dieser Phase ist die Oberfläche gewellt und die Doppelschicht besteht aus Bereichen die entweder $L_{\beta'}$ oder L_{α} zuzuordnen sind. In der flüssigkristallinen Phase (geschmolzen, flüssig oder auch *liquid-disordered*; L_{α}) sind die Lipidketten ungeordnet und durch die Bildung von *gauche*-Isomeren mit einer hohen Beweglichkeit gekennzeichnet. [1,49]

Die Phasenübergangstemperatur ist definiert als die Temperatur, die erforderlich ist, um eine Änderung des physikalischen Lipidzustands von der geordneten Gelphase, in der die Kohlenwasserstoffketten vollständig ausgedehnt und dicht gepackt sind, zur ungeordneten flüssigkristallinen Phase zu induzieren, in der die Kohlenwasserstoffketten zufällig orientiert und flüssig sind. Phasenübergangstemperaturen können beispielsweise durch Kalorimetrie bestimmt werden [54]. Es gibt verschiedene Faktoren, die die Phasenübergangstemperatur direkt beeinflussen, einschließlich Kohlenwasserstoffkettenlänge, Sättigungsgrad, Ladung und Kopfgruppenspezies. Wenn

die Kohlenwasserstoffanzahl erhöht wird, werden die van-der-Waals-Wechselwirkungen stärker und erfordern mehr Energie, um die geordnete Packung zu stören, wodurch die Phasenübergangstemperatur zunimmt. Ebenso führt die Einführung einer cis-Doppelbindung in die Acylgruppe zu einem Knick in der Kette, welcher viel niedrigere Temperaturen erfordert, um eine geordnete Packungsanordnung zu induzieren.

Mit weiterer Temperaturerhöhung reihen sich noch die kubische (bikontinuierliche Lipiddoppelschicht) und die invertiert hexagonale Phase (zylindrische Lipidröhren angeordnet in einem hexagonalen Gitter, H_{II}) an. Wie sich Lipide in eine bestimmte Mesophase anordnen, wird von vielen molekularen Details, einschließlich der Kopfgruppe, der Kopfgruppenladung, der Kohlenwasserstoffkettenlänge und deren Sättigungsgrad, beeinflusst. Invertierte Strukturen werden begünstigt, wenn der eingenommene Platz der Kohlenwasserstoffketten relativ den der Kopfgruppe übersteigt. Deshalb bildet z. B. PE mit seinen zwei Ketten und der kleinen Kopfgruppe eine invertiert hexagonale Phase. Umgekehrt bildet PC mit seiner großen Kopfgruppe, ebenso wie Lipide mit geladener Kopfgruppe (PS, PI) zusammen mit divalenten Salzen, bevorzugt lamellare Phasen. Die Hydratisierung der Kopfgruppen spielt auch eine wichtige Rolle in der Anordnung der Lipide, so tendieren große und stark hydratisierte Kopfgruppen dazu, die Membran zu ebnet [55,56]. Die Tendenz einer Lipiddoppelschicht Hälfte sich zu krümmen, ist hingegen eine Antriebskraft der Phasenumwandlung von L_{α} zu H_{II} . Die Monoschicht neigt dazu, eine negative Krümmung (zu den Kopfgruppen hin) auszubilden, wenn der laterale Druck der Kohlenwasserstoffketten den der Kopfgruppen übersteigt. Dies führt dazu, dass beim Wechsel zur hexagonalen Phase die freie Energie des Systems verringert wird. Die Strukturen der Lipid-Selbstorganisation werden auch von der Temperatur beeinflusst. Der Beitrag der Entropie zur freien Energie wird bei höheren Temperaturen zunehmend wichtiger. Dies begünstigt die invertiert hexagonale Phase, in welcher die Fluktuation der Kohlenwasserstoffketten größer ist als in der lamellaren Phase. Die spontane Krümmung, die die jeweiligen Phasen benötigen, um geschlossene Strukturen zu bilden, hängt dabei unter anderem auch von der Form (eingenommenes Volumen) der Lipide ab. Planare Doppelschichten können durch zylindrische oder eine geeignete Mischung aus zylindrischen und kegelstumpf-förmigen Lipiden gebildet werden. Durch asymmetrisch angeordnete (umgekehrt) kegelstumpf-förmige Lipide kann die Krümmung unterstützt werden. [1,27,49]

Zellmembranen bilden immer geschlossene Strukturen, deshalb werden als synthetische Membranen häufig vesikuläre Formen verwendet. Diese bläschenartigen Aggregate, mit einem physikalisch abgetrennten, inneren Abteil, können in Größe (*small* < 100 nm, *large* 100-250 nm, *giant* > 250 nm) und Lamillarität (Doppelschichtmenge; unilamellar, multilamellar) variieren. Für die Bildung von Vesikeln wird eine bestimmte Krümmungsenergie benötigt [57]. Um diese zu reduzieren, werden die Lipide asymmetrisch verteilt. Das bedeutet, Lipide mit kleinen Kopfgruppen werden eher in die innere Monoschicht mit größerer Krümmung eingebaut, während größere Kopfgruppen

meist in der äußeren Monoschicht angeordnet werden. Lipidkonformation und Packungsbeschränkungen in gekrümmten Lipiddoppelschichten entsprechen der Membranform. Lipide können auch lokale Domänen mit unterschiedlicher Lipidzusammensetzung und Fluidität bilden. Diese werden als *rafts* (Lipidflöße) bezeichnet, bestehen aus Cholesterol und Sphingolipiden und sind starrer im Vergleich zu deren Umgebung [58,59]. 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 [1]. 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 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.

2.2.2 Relationen zwischen verwendeten Lipiden und MBP

Die hier verwendete myelinartige Lipidmischung (zytoplasmatische Seite) besteht aus PC, PE, SM, PS, PI und Cholesterol. Diese sechs Lipide kann man grob in drei Gruppen einteilen: neutrale Lipide (PC, PE, SM), geladene Lipide (PI, PS) und Cholesterol (Abbildung 6). Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylinositol (PI) gehören zu den geladenen anionischen Lipiden und interagieren durch elektrostatische Wechselwirkungen mit positiv geladenem MBP [37]. Dabei tritt bei Interaktion eine verringerte Fluidität auf, die vermutlich durch Lipidkondensation hervorgerufen wird. Die anderen neutralen Lipide, Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE), sind wichtig für die Gesamtwechselwirkung der Monoschicht mit MBP, scheinen jedoch nicht elektrostatisch mit MBP zu interagieren [37]. Diese dienen als Abstandhalter zwischen den repulsiven Wechselwirkungen der geladenen Lipide und gleichen die Lipidkondensation aus.

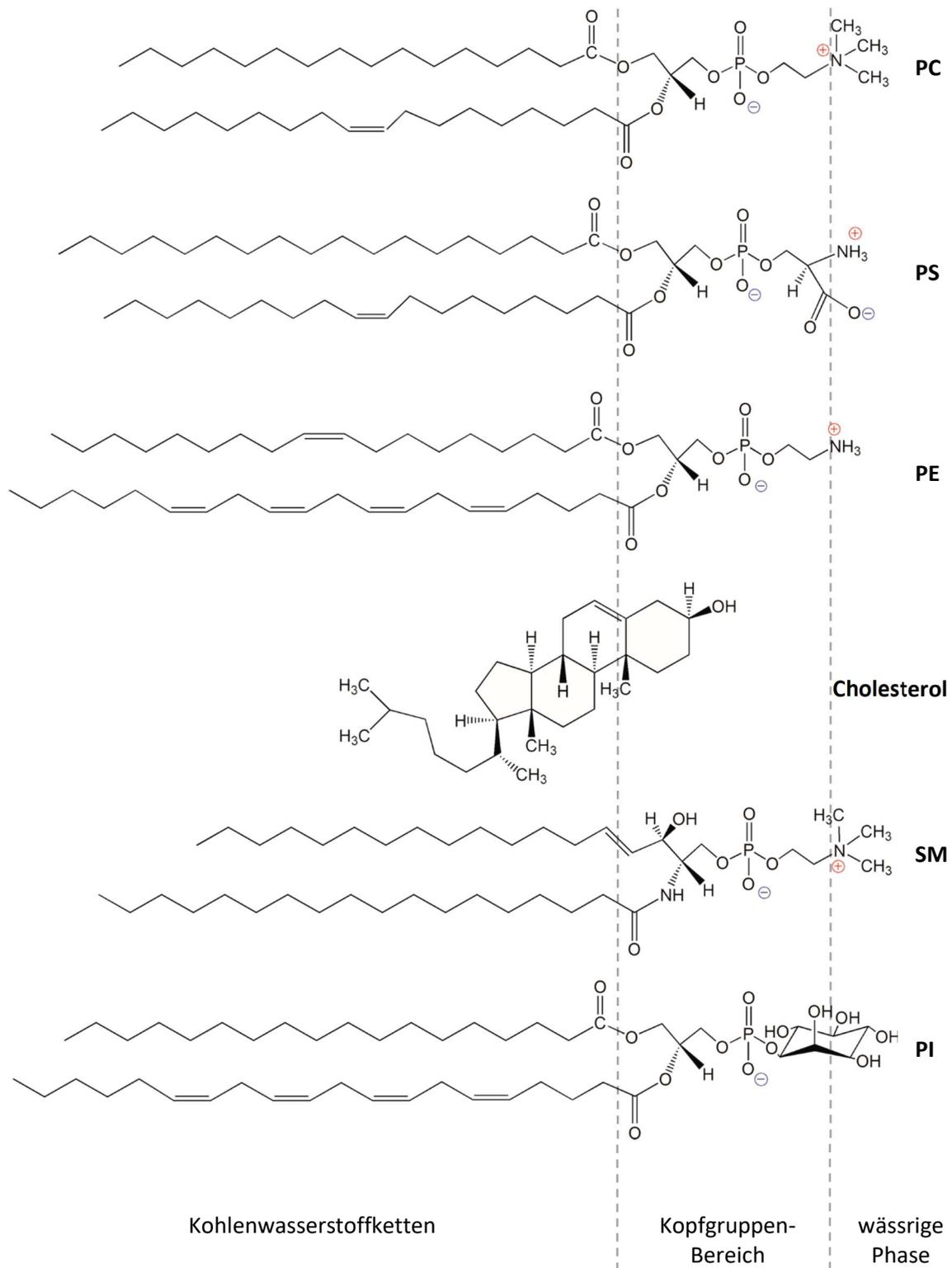


Abbildung 6: Strukturformeln der Lipide PC, PS, PE, Cholesterol, SM und PI (von oben nach unten) nach dem hauptsächlich enthaltenen Lipid im kommerziellen Extrakt (siehe Anhang A1 für Lipidzusammensetzungen). Es ist die ungefähre Position der Lipidkopfgruppen in Bezug zur wässrigen Phase dargestellt.

Cholesterol ist wie andere Membranlipide amphiphil, weist aber eine andere Struktur auf. Während Phospholipide aus einer Kopfgruppe und zwei hydrophoben Acylketten

bestehen, hat Cholesterol eine kurze Isooctylkette, ein starres planares Steroidringsystem und eine kleine polare Hydroxylgruppe. Die Hydroxylgruppe befindet sich zwischen den Kopfgruppen der Phospholipide und das plattenartige Ringsystem ist parallel zu den Acylketten positioniert, das eine Tiefe bis zu den benachbarten C9-C10-Kohlenstoffatome erreicht [60–62]. Die kurze Acylkette setzt sich ins Zentrum der Membran fort. Es ist bekannt, dass Cholesterol die Kopfgruppen-Kopfgruppen-Wechselwirkungen unterbricht und Lipidflöße bildet, die mit Cholesterol und Sphingolipiden angereichert sind [58,59,63]. Diese Flöße sind hochgeordnet und starr, daher wird die Fließfähigkeit der gesamten Membran verringert. Cholesterol senkt die für den Phasenübergang erforderliche Bindungsenergie und verbreitert somit die Umwandlungstemperatur von Phospholipid-Doppelschichten. Cholesterol-Moleküle können auch von der lamellaren in die hexagonale Phase segregieren. Dies verringert den Abstand zwischen den benachbarten Röhren in der hexagonalen Phase, da sich das Cholesterol zwischen den Kohlenwasserstoffketten niederlässt. Die Packungsspannung der Kohlenwasserstoffketten wird durch Füllen der Lücken zwischen den Zylindern gelöst. Es resultieren stärkere van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen den Kohlenwasserstoffketten, die den Abstand in der hexagonalen Phase reduzieren. [45,64]

Es wird angenommen, dass der Einbau von MBP in die Lipidmonoschicht nahe der Domänengrenzen die Linienspannung verringert, was zu einem Energiegewinn führt. Unter anderem hat die An- oder Abwesenheit von SM in einer Monoschicht-Studie gezeigt, dass während der Adsorption von MBP an myelinähnliche Lipidmonoschichten anscheinend zwei energetische Effekte miteinander konkurrieren. Dies ist zum einen die elektrostatische Anziehung und zum anderen die Verringerung der Linienspannung an den Phasengrenzen von phospholipidreichen und cholesterolreichen Domänen. [65]

In Bezug auf MS wurde in früheren Studien bereits festgestellt, dass die Lipidzusammensetzung von großer Bedeutung ist [66–69]. Es wurden verschiedene Lipidkompositionen für gesunde und erkrankte Patienten gefunden. Die Lipidstöchiometrie für die zytoplasmatische Seite der gesunden und kranken Nagetiere ist in Tabelle 1 dargestellt. Charakteristisch ist dabei eine Erhöhung der Konzentration von PS, PE und Cholesterol und eine Erniedrigung des SM-, PI- und PC-Gehaltes [66]. In dieser Arbeit wird stellenweise die Lipidzusammensetzung eines MS-Patienten mit den Messungen eines hohen Cholesterolgehaltes verglichen.

Tabelle 1: Stöchiometrie der Lipidzusammensetzungen von gesunden und kranken Patienten der zytoplasmatischen Myelinmembran im ZNS in mol-%. *: Stöchiometrie wurde aus den Daten von Ohler *et al.* [66] in Kombination mit den ladungsausgleichenden Annahmen von Min *et al.* [67] konstruiert.

Komposition \ Lipide	PC	PS	PE	SM	PI	Chol
Gesund [68]	11	13	27	3	2	44
Krank*	8,1	12,5	28,9	1	0	49,6

Die Myelin-Schädigung korrelierte mit dem strukturellen Phasenübergang von einem Lamellenstapel zu einer invertierten hexagonalen Phase, infolge der veränderten Lipidstöchiometrie und eines niedrigen MBP-Gehalts [44]. Der strukturelle Phasenübergang, induziert durch Änderungen der Lipidkomposition, könnte auf die Beziehung zwischen der Lipidsorte und der resultierenden Mesophase zurückzuführen sein [44,55,56,70]. Die Phasenübergänge haben verschiedene Übergangstemperaturen, die ionenspezifisch und abhängig von der Lipidzusammensetzung sind [45]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Verteilung der Lipide inhomogen ist, wenn Phasen koexistieren. Unabhängig von der anwesenden Ionenart, konkurriert MBP mit der hexagonalen Phase der Lipide und verhindert bei physiologisch relevanten Temperaturen den Übergang zur H_{II} -Phase. Der Übergang zur hexagonalen Phase kann durch Temperaturerhöhung induziert werden. Die zusätzliche Mobilität der Kohlenwasserstoffketten bei erhöhter Temperatur resultiert in einem thermotropen Phasenübergang, der zu einer größeren spontanen Krümmung führt [71,72]. Dabei tritt die invertierte hexagonale Phase bei gesunder Lipidkomposition auf, wenn eine Temperatur von 42 °C überschritten ist und koexistiert mit der lamellaren Phase. Im Fall der veränderten Lipidzusammensetzung bei Erkrankten koexistieren beide Phasen unterhalb von 42 °C und die hexagonale Phase dominiert bei höheren Temperaturen. [45]

Die Initiierung der Faltung von MBP scheint dominiert von der Oberflächenladung der Membran und weniger von der Fluidität oder den Kohlenwasserstoffketten der Lipide, da keine Konformationsänderung mit neutralen PC-Lipiden beobachtet werden konnten. [22,73] Außerdem wird die Bindung von MBP an eine Membran hauptsächlich durch Elektrostatik beeinflusst und vermutlich erfolgt die Insertion von MBP in die Membran erst nach Ladungsneutralisation [22]. Obwohl die anfängliche Assoziation von MBP auf der Membranoberfläche hauptsächlich durch die Oberflächenelektrostatik bestimmt wird, beeinflussen die Lipid-Kohlenwasserstoffketten die Menge an MBP, die in Vesikel eingebaut wird.

2.3 Divalente Metallionen

Neben Lipidmembranen und Proteinen sind Metallionen bei neuronalen Prozessen im Gehirn von Bedeutung. So ist das divalente Zink-Ion das am häufigsten anzutreffende Metallion neben Eisen. Zink existiert in den synaptischen Vesikeln und hat im Allgemeinen die Aufgabe, als endogener Neuromodulator die Nervensignale an den Synapsen zu regulieren.

Zink-Ionen kommen in natürlicher Weise im Myelin vor (50 μ M oder 1,4 μ mol/g Myelin) und interagieren bereitwillig mit MBP [32,74]. Dadurch wird die Fähigkeit von MBP, Membranen zu verknüpfen, verbessert [74–78], allerdings wurde Zn^{2+} auch mit Demyelinisierung in Verbindung gebracht [79,80]. Vorzugsweise komplexiert Zink mit den

Aminosäuren Histidin, Aspartat, Glutamat und Cystein tetraedisch, um die Tertiärstruktur zu stabilisieren [81,82]. Im Fall vom 18,5 kDa MBP stehen 10 Histidine für potentielle Koordinationsstellen zur Verfügung. Es gibt Anzeichen für 4 Histidine, die als Bindungsstellen für Zink dienen: His-Ala-Arg-His (21-24) und His-Pro-Ala-Arg-Thr-Ala-His (60-66) (s. Abbildung 1) [76]. Außerdem wurde gezeigt, dass Zink-Ionen eine geordnete Sekundärstruktur bei MBP induzieren, wenn dieses membranassoziiert ist [77]. In Wechselwirkung mit Lipiden verändern Zink-Ionen das Phasenverhalten der Lipide. Dabei könne Metallionen an die negativ geladenen Lipide binden oder auch mit den Phosphat-Gruppen der Kopfgruppen interagieren und dadurch eine Dehydrierung und Versteifung der Membranoberfläche bewirken [83,84]. In der Gegenwart von Zink können drei Phasen koexistieren, sowohl in der Lipidkomposition eines gesunden Menschen als auch in der eines MS-Patienten: die lamellare (L_{α}), die invertierte hexagonale (H_{II}) und die dichte lamellare Phase [45]. Wobei letztere vermutlich durch die Wellenbildung der Membran und Ion-Ion-Korrelationseffekte, die die Anziehung zwischen gleichartig geladenen Membranen bewirken, angetrieben wird [85–87]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass mit steigender Zinkkonzentration die Länge der Einheitszelle abnimmt, sowohl in der lamellaren als auch in der invertierten hexagonalen Phase. Die entscheidende Konzentration für das Vorhandensein der jeweiligen Phasen ist dabei die Übergangskonzentration, die bei divalenten Metallsalzen ($ZnCl_2$, $MgCl_2$, $CaCl_2$) zwischen 5-9 mM liegt. Die Zink- und Phosphat-abhängige Aggregation von MBP ist ein möglicher Mechanismus bei der Myelinverdichtung und der Aufrechterhaltung seiner Integrität [88]. Außerdem wird vermutet, dass die Kationen-Konzentration sich im erkrankten Zustand ändert und lokal entweder sehr hoch oder sehr gering sein kann [45,89,90]. Diese lokalen Veränderungen können dazu führen, dass strukturelle Veränderungen auftreten, die die Integrität und Stabilität der Membran beeinflussen [45].

Da Zink-Ionen für die Untersuchung mit EPR-Spektroskopie (*electron paramagnetic resonance*) nicht verwendet werden können, wurden in anderen Publikationen Kupfer-Ionen eingesetzt, da sie den Zink-Ionen in Struktur und Verhalten chemisch sehr ähnlich sind. [32] Dabei wurde, in Kombination mit DLS-Messungen, festgestellt, dass drei Kupfer-Ionen-Interaktionsspezies mit MBP wechselwirken (in Phosphat-Puffer), in Abhängigkeit von der Konzentration. Bei geringen Konzentrationen sind isolierte MBP-Moleküle mit gebundenem Kupfer vertreten, die zwei mögliche, spezifische Bindungsstellen repräsentieren. Mit einem deutlichen Überschuss an Kupfer-Ionen tritt eine dritte Spezies hervor, die sich vermutlich an der Grenzfläche zwischen interagierenden MBP-Molekülen befindet und so die Bildung von stabilisierten MBP Aggregaten begünstigt. In aufsteigender Affinitätsordnung bindet MBP $Co^{2+} < Cd^{2+} < Mg^{2+} < Zn^{2+} < Cu^{2+} < Hg^{2+}$. [91] Die Kupferbindung wird somit begünstigt im Vergleich zu Zink. MBP kann statistisch 2,13 Kupfer-Ionen [92] aufnehmen und ist im Myelin mit ca. einem Drittel der Menge (0,4 μ mol/g Myelin)[74] im Vergleich zu Zink vertreten.

Um die Ergebnisse mit der Literatur zu vergleichen, wurden in dieser Arbeit Untersuchungen an Zink- und Kupfer-Ionen durchgeführt.

2.4 Methoden zur Untersuchung von Lipidmonoschichten

Biologische Systeme wie die Zellmembran sind in der Grundlagenforschung komplex zu modellieren. Je nach Zelltyp bestehen sie aus einer Lipiddoppelschicht mit adsorbierenden oder durchdringenden Proteinen. Um die Zellmembran für Experimente zu modellieren, ist es häufig erforderlich, das Membransystem zu vereinfachen. Dies ist möglich, indem eine Doppelschicht mit einer reduzierten Menge an verschiedenen Lipidsorten verwendet wird. Die Bildung von Monoschichten (eine halbe Doppelschicht) in einer Grenzflächenumgebung [93,94] ist ebenfalls eine gängige Praxis, da Eigenschaften wie der Phasenzustand, der Phasenübergang[95] und der Einfluss der Subphase oder Lipidzusammensetzung[93] auf Proteine untersucht werden können, insbesondere wenn es sich nicht um Transmembranproteine handelt.

2.4.1 Langmuir-Filmwaagen

Zur Bildung eines *Langmuir*-Films müssen die amphiphilen Moleküle (Lipide) auf der Luft/Wasser-Grenzfläche der wässrigen Subphase angeordnet werden. Dazu wird zunächst in einem temperierbaren Teflontrog die wässrige Subphase eingefüllt, mit einem bestimmten Volumen bzw. einer resultierenden bestimmten Oberfläche A (Abbildung 7). Daraus wird in Kombination mit der benötigten Fläche eines Lipidmoleküls die Spreitmenge des Lipides berechnet. Monoschichtbildung führt zu einer Erniedrigung der Oberflächenspannung in Abhängigkeit von der Oberflächenkonzentration $\Gamma = n_i/A$. Das wasserunlösliche Lipid wird auf die Oberfläche gespreitet. Der Oberflächendruck wird von einer Wilhelmy-Plättchen-Waage detektiert [96]. 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 der Abfall der Oberflächenspannung γ einer Wasser-Subphase, wenn eine Monoschicht an der Luft/Wasser-Grenzfläche gespreitet und komprimiert wird:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma. \quad (\text{G1})$$

Wobei γ_0 die Oberflächenspannung der Subphase ohne Lipidmonoschicht und γ die Oberflächenspannung der Subphase mit Monoschicht ist.

Die Oberflächenspannung ist dabei definiert als die Arbeit, die aufgewendet werden muss, um die Oberfläche der wässrigen Phase zu vergrößern. [95,96]

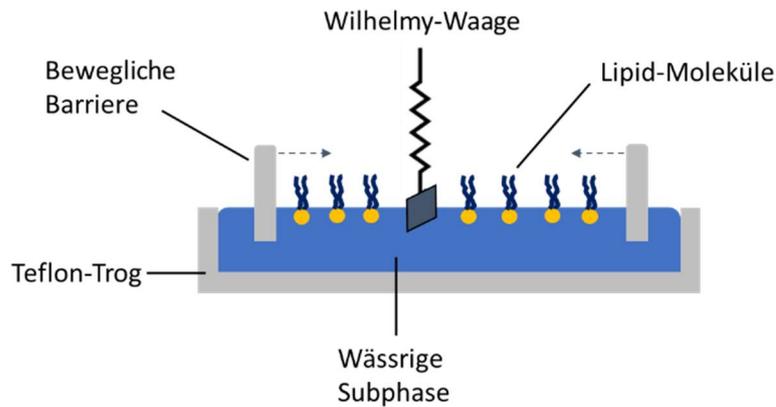


Abbildung 7: Schematische Darstellung einer Langmuir-Filmwaage. Bestehend aus einem mit wässriger Subphase gefüllten Teflon-Trog, zwei beweglichen Barrieren und einer Wilhelmy-Waage als Oberflächendruckmesser.

2.4.1.1 Kompressions-Experimente

Je nach Versuchsaufbau oder Art des Experiments[93,94,97] gibt es im Aufbau der Filmwaagen noch bewegliche Barrieren an beiden Enden (Abbildung 7), mit denen der gespreitete Film komprimiert werden kann, um das Kompressionsverhalten der Lipide zu untersuchen. Dabei wird die Fläche pro Molekül kontinuierlich verkleinert und der Oberflächendruck gemessen. Das Kompressionsverhalten der Monoschicht wird beschrieben durch die Oberflächendruck/Flächen(π/A)-Isotherme. Der Oberflächendruck nimmt bei weiterer Kompression mittels der Barriere der Filmwaage zu, bis zu dem Punkt an dem die größte Packungsdichte vorliegt. Bei weiterer Kompression kollabiert das System und bildet Multischichten. Sowohl der Kurvenverlauf der π/A -Isotherme als auch der Filmkollaps sind unter Gleichgewichtsbedingungen (geringe Kompressionsgeschwindigkeit) ein Charakteristikum der die Monoschicht bildenden Substanz. Es können Rückschlüsse über die Anzahl und Art der molekularen Wechselwirkungen, die Massenorganisation in einer Phase und den Übergang zwischen verschiedenen Phasen gezogen werden. Die Isotherme ist außerdem von Subphasenparametern wie pH-Wert, Ionenkonzentration und Temperatur abhängig. [1,49]

In der Monoschicht, obwohl quasi zweidimensional, liegen unterschiedliche Aggregatzustände vor (Abbildung 8). Der Phasenzustand der Lipidmoleküle ist dabei mit einem realen Gas vergleichbar. Jedoch ist in der Monoschicht der Bewegungsspielraum der Moleküle wesentlich eingeschränkter, da die Kopfgruppe das Lipidmolekül in der Wasseroberfläche fixiert.

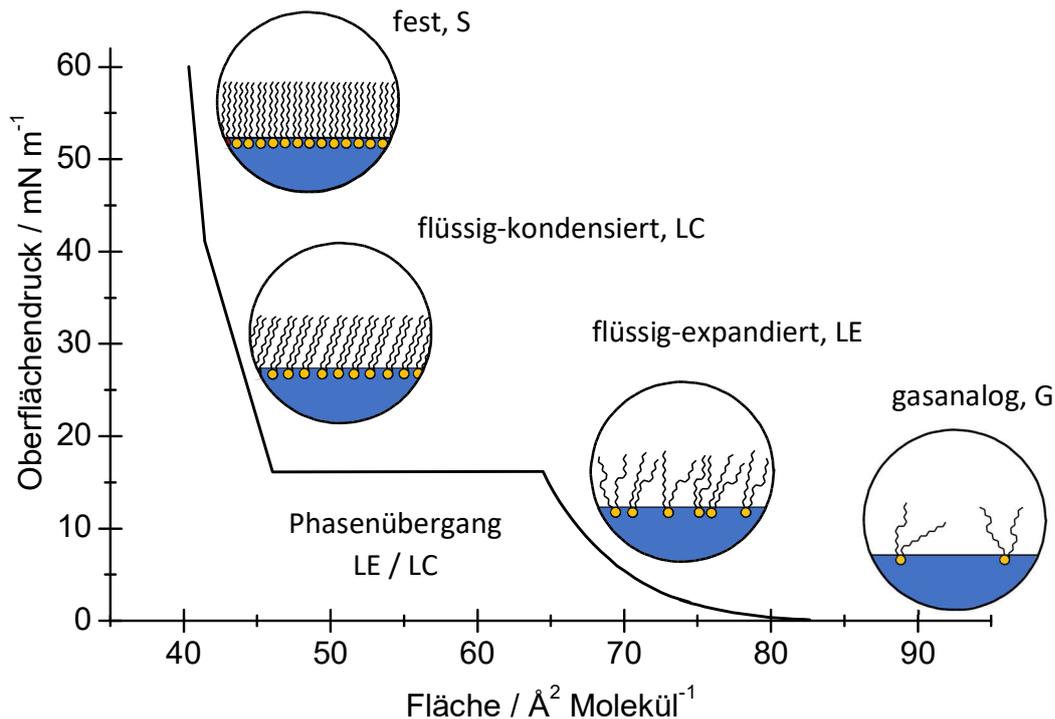


Abbildung 8: Schematische Darstellung der verschiedenen Zustände einer Monoschicht bei isothermer Kompression, adaptiert von A. Kerth [98]. Mit Verringerung der verfügbaren Oberfläche können verschiedene Ordnungszustände (G, LE, LC, S) und Phasenübergänge (LE/LC) durchlaufen werden. Weitere Beschreibung der Abbildung siehe folgenden Textabschnitt.

In Abbildung 8 ist ein beispielhafter Verlauf einer Oberflächendruck/Fläche-Isotherme mit den verschiedenen Phasenübergängen dargestellt. Zu Beginn auf einer expandierten Oberfläche existieren die Lipide isoliert voneinander. Die Moleküle können sich auf der Wasseroberfläche bewegen, ohne sich gegenseitig zu beeinflussen (nicht nachweisbarer Druckanstieg bei Kompression). Da die Monoschicht sich wie ein ideales Gas in einem 3D-Volumen verhält, wird diese Phase als gasanaloge Phase bezeichnet. Durch Verkleinerung des zur Verfügung stehenden Platzes, wird die Lipiddichte erhöht und die Wechselwirkungen zwischen Lipiden dominieren das Phasenverhalten. Die Moleküle 'spüren' einander und setzen der Kompression einen messbaren Druck entgegen (*lift off*): sie werden zunehmend gezwungen, sich z. B. aufzurichten. In der flüssigen Phase können zwei unterscheidbare Phasen beobachtet werden: die flüssig-expandierte (LE) und die flüssig-kondensierte Phase (LC). Sie unterscheiden sich in ihrer Packungsdichte und Fluidität. Manchmal tritt ein Zweiphasengebiet (LE/LC) auf, in dem die Moleküle aus dem fluiden in den rigiden Zustand übergehen. Phasenübergänge sind durch die Änderung der Steigung erkennbar und enthalten in ihrer Form Informationen über die Ordnung des Überganges. Horizontale Plateaus (keine Änderung des Drucks) weisen auf einen Übergang 1. Ordnung hin, während nicht horizontale Übergänge höherer Ordnung sind. In der anschließenden flüssig-kondensierten Phase besitzen die rigiden Ketten noch Rotationsfreiheit und sind z. B. geneigt, um sich wesentlich dichter packen können. Mit

zunehmendem Oberflächendruck wird die Packung der Kohlenwasserstoffketten so dicht wie in kristallisierten Paraffinen und es wird die festanaloge Phase erreicht (S), an die sich der Filmkollaps, mit irreversiblen Veränderungen, anreicht. [1,27,49]

Welches Phasenverhalten beobachtet werden kann hängt von der Lipidstruktur ab; so findet man bei SM-reichen Mischungen, die lange, gesättigte Kohlenwasserstoffketten besitzen, überwiegend feste Phasen. Ungesättigte Phospholipide zeigen meist nur flüssig-expandierte Phasenzustände bzw. reichern sich in diesen an. [99] Ebenso ist die Temperatur entscheidend für die Beobachtung von Phasenübergängen. Bei geringen Temperaturen wird meist eine kondensierte Phase induziert, während hohe Temperaturen die flüssig-expandierte Phase begünstigen. [49]

2.4.1.2 Erweiterte Optionen zur Auswertung von Kompressionsisothermen

Aus den π/A -Isothermen können noch weitere Informationen gezogen werden. So geben sie Auskunft über die Kompressibilität der Monoschichten, die überschüssige freie Mischungsenergie und die theoretische ideale Oberfläche von Lipidmischungen kann bestimmt werden.

Für die Berechnung der theoretischen idealen Oberfläche von Lipidmischungen werden lediglich die Isothermen der reinen Komponenten einer binären Mischung benötigt. Nach

$$\bar{A} = x_X * A_X + x_Y * A_Y \quad (G2)$$

wobei A_X bzw. A_Y die Oberflächen der Isothermen der reinen Substanz X bzw. Y sind, kann die mittlere molekulare Fläche der Monoschicht \bar{A} bei einem bestimmten Druck berechnet werden. x_X and x_Y sind dabei die Molverhältnisse der beiden Substanzen in der Mischung. Je nachdem wie stark die theoretischen Werte für die mittlere molekulare Fläche von den experimentellen abweichen, kann das ideale Mischungsverhalten der Lipidmischung oder zum Beispiel ein kondensierender Effekt bestätigt werden. [100]

Die überschüssige freie Mischungsenergie ΔG_{excess} wird nach

$$\Delta G_{excess} = \int_0^\pi A_{mix} - (x_X A_X + x_Y A_Y) d\pi \quad (G3)$$

berechnet. Dabei sind x_X und x_Y die Molverhältnisse der jeweiligen Lipide X und Y, A_X und A_Y sind die Oberflächen der reinen Lipid-Isothermen und A_{mix} ist die Oberfläche der gemischten Monoschicht. [101–104] ΔG_{excess} -Werte sind negativ, wenn die Monoschicht kondensiert, was auf Anziehungskräfte zwischen verschiedenen Molekülen zurückzuführen ist, und daher wird der Mischprozess thermodynamisch bevorzugt. Hohe positive ΔG_{excess} -Werte legen die Unmischbarkeit des Monoschichtgemisches mit einer möglichen Phasentrennung nahe. [101–105]

Die Kompressibilität κ eines Lipidfilms ist in den Plateau-Regionen der Druck/Flächen-Isotherme besonders hoch. Im Bereich der Kettenschmelze findet man in Abhängigkeit vom Druck deutliche Maxima der Kompressibilität. Diese Maxima verschieben sich zu höheren Drücken, wenn die Temperatur erhöht wird, vergleichbar mit der Verschiebung der Wärmekapazität-Maxima bei höheren Drücken. Bestimmt wird die isotherme Flächen-Kompressibilität κ [27,49] nach

$$\kappa = -\frac{1}{A} \frac{dA}{d\pi} \quad (\text{G4})$$

2.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenz beschreibt den Vorgang, kurzwelliges Licht zu absorbieren und langwelliges Licht zu emittieren. Ein Elektron vom Grundzustand S_0 geht in einen angeregten Zustand S_1 über, an den sich eine strahlungslose Schwingungsrelaxation in den niedrigsten angeregten Schwingungszustand in S_1 anschließt und letztlich eine Emission stattfindet. Als Konkurrenzreaktionen sind z. B. totale strahlungslose Deaktivierung (IC: *Internal Conversion*) und Phosphoreszenz möglich. Dabei werden Elektronen von Doppelbindungen leichter angeregt, da die p-Elektronen der Doppelbindung über beide Atome verteilt und daher nicht so stark gebunden sind. Deshalb dienen als Fluorochrome meist Moleküle mit konjugierten Doppelbindungen. [106]

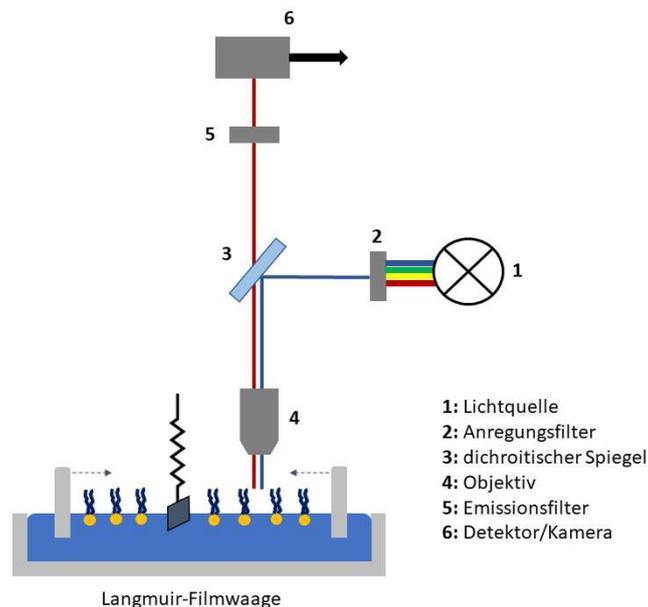


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Aufbaus und Prinzips eines Fluoreszenzmikroskops über der Lipidmonoschicht (adaptiert von N. Wollschläger[107]).

In dieser Arbeit ist mit einem Auflicht(-Epi)-Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 9) gearbeitet worden. Bei einem Auflicht-Mikroskop trifft das kurzwellige Licht der

Lichtquelle, meist Quecksilber- oder LED-Lampen, deren gewünschte Anregungswellenlänge zuvor herausgefiltert worden ist, auf einen dichroitischen Spiegel, der das Licht durch ein Objektiv zur Probe reflektiert. Das langwelligere Fluoreszenzlicht passiert wieder das Objektiv und durchstrahlt den für Emissionslicht durchlässigen dichroitischen Spiegel. Nach Passieren des Emissionsfilters wird das Signal mittels einer EMCCD-Kamera detektiert. [108] Die Charakterisierung von Lipidmonoschichten mittels Fluoreszenzmikroskopie ist möglich, da die Probe nicht mechanisch beansprucht wird und die Sensitivität der Fluoreszenzmikroskopie sehr hoch ist. [109]

Das hier zur Lipidmischung beigemischte Fluorophor, Rhodamin-DHPE, ist aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit in den Phasen für den Hell/Dunkel-Kontrast in der Bildgebung verantwortlich. Dunkle Bereiche in der Abbildung zeigen eine Abwesenheit, helle Bereiche stehen für eine hohe Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes. Außerdem bevorzugt Rhodamin-DHPE die flüssig-expandierte Phase und lagert sich an den Kopfgruppen der Lipide an [110]. Mit diesem Versuchsaufbau kann vor allem die Bildung von Domänen beobachtet werden, da diese eine Phase höherer Ordnung bilden und in Mischungen eine andere Lipidzusammensetzung als ihre Umgebung einnehmen, vergleichbar mit *rafts* in Lipiddoppelschichten. Die Domänen können jegliche Form annehmen, in Kombination mit Cholesterol wurde jedoch in mehreren Studien festgestellt, dass bei niedrigen Oberflächendrücken runde Domänen und bei hohen Oberflächendrücken streifenförmige Domänen ausgebildet werden [111,112].

2.5 Methoden zur Untersuchung von Lipiddoppelschichten

2.5.1 Dynamische Lichtstreuung

Mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) kann man schnell und nicht-invasiv die Größe aller Partikel in einer Probe im Bereich von weniger als einem Nanometer bis zu mehreren Mikrometern bestimmen. Dazu wird die Geschwindigkeit der Brownschen Molekularbewegung von Partikeln gemessen. Die Brownsche Bewegung ist die ungerichtete Bewegung von kleinen Partikeln in Lösung und resultiert aus Kollisionen mit Lösungsmittelmolekülen. Dabei diffundieren kleine Partikel schneller als große. Die Geschwindigkeit der Brownschen Bewegung wird quantifiziert durch den Translationsdiffusionskoeffizienten D . Diffusionsgeschwindigkeiten werden mittels DLS durch die Beleuchtung (Laser) von Partikeln in einer Dispersion erhalten. Die Partikel streuen einen Teil des Laserlichtes und durch die Eigenbewegung der Teilchen fluktuiert die Intensität des gestreuten Lichtes mit der Zeit. Die Kombination von vielen detektierten einzelnen dynamischen Lichtstreuungsintensitäten führt zu einem fluktuierenden Intensitätssignal (Abbildung 10). Die Schwankungen werden durch die Interferenz des von

jedem einzelnen Teilchen gestreuten Lichts verursacht. Die Intensität wird sich mit der Zeit verändern, da die Partikel weiter diffundieren. [113,114]

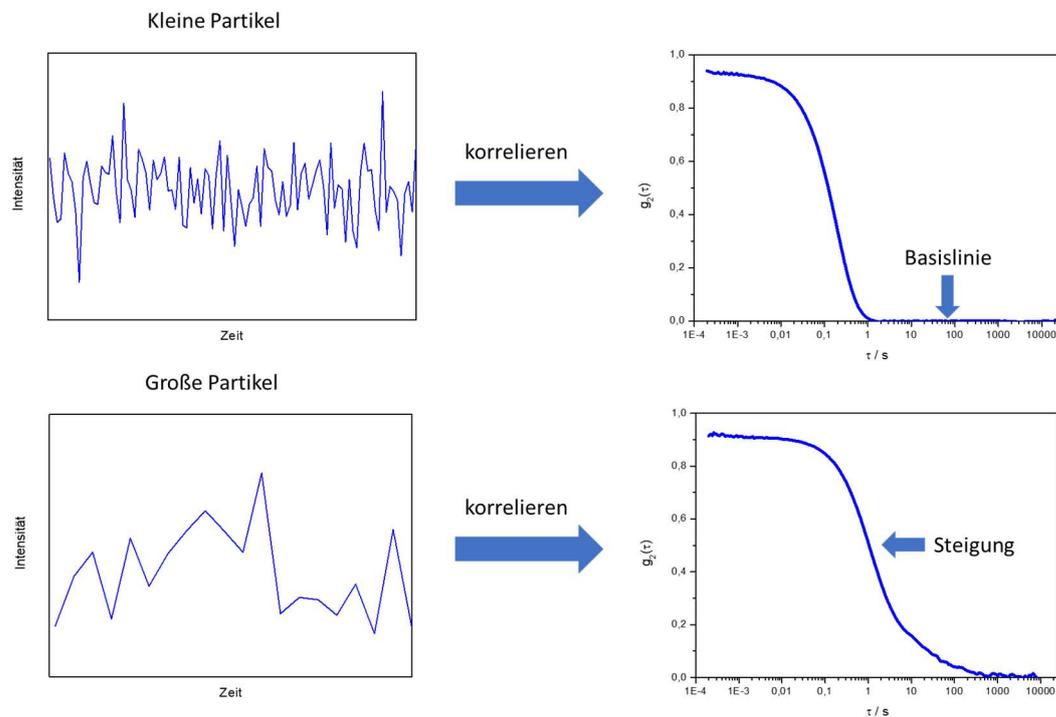


Abbildung 10: Schema der Beziehungen zwischen gemessenen fluktuierenden Intensitätssignalen (links) und Intensitätskorrelationsfunktionen $g_2(t)$ (rechts) für große und kleine Partikel mit Basislinie C und Steigung B wie in Gleichung G7 verwendet.

Die Geschwindigkeit dieser Intensitätsfluktuationen ist abhängig von der Diffusionsrate der Partikel. Je kleiner das Teilchen, desto schneller diffundiert es, was in rapideren Schwankungen des gestreuten Lichtes resultiert. Momentaufnahmen des Lichtstreusignals $I(t + \tau)$ werden schnell nacheinander aufgenommen, wobei diese mit dem ursprünglich gemessenen Signal $I(t)$ verglichen werden. Zwischen aufeinanderfolgenden Aufnahmen, die im Bereich der Korrelationszeit τ von Nano- oder Mikrosekunden liegen, sind die Intensitätssignale sehr ähnlich oder gut korreliert. Wenn man jedoch Momentaufnahmen betrachtet, die zeitlich weiter voneinander entfernt sind, nimmt die Ähnlichkeit oder Korrelation ab. Schließlich ändert sich das Intensitätssignal und es besteht keine Korrelation mehr mit dem ursprünglichen Signal. Der Vergleich der verschiedenen Zeitpunkte wird als Autokorrelation bezeichnet. Je größer die zu messenden Partikel sind, desto langsamer diffundieren sie und desto länger dauert es, bis das Korrelationssignal vollständig verloren geht (Abbildung 10). Bei kleinen Partikeln, die eine schnelle Diffusion erfahren, nimmt die Korrelation des Signals schnell ab. [113–115]

Die bestehende normierte Intensitätskorrelationsfunktion

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t) * I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad \text{G(5)}$$

ermöglicht es, die Translationsdiffusionskoeffizienten zu extrahieren. Dies ist über den Zusammenhang mit der Siegert-Beziehung[116] der Streufeld-Zeitkorrelationsfunktion g_1

$$g_2(\tau) = 1 + |g_1(\tau)|^2 \quad \text{G(6)}$$

möglich, die eine exponentiell abfallende Funktion der Korrelationszeit für den Fall einer idealen monodispersen Suspension in der Brownschen Bewegung darstellt, die ausgedrückt werden kann als:

$$g_2(\tau) = C[1 + Be^{-2\tau\Gamma}]. \quad \text{G(7)}$$

Wobei C die Basislinie, B die Steigung und Γ die Abklingrate der Korrelationsfunktion ist, mit $\Gamma = D * q^2$ und dem Wellenvektor $q = \left(\frac{4\pi n}{\lambda}\right) \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$, die den Streuwinkel θ , die Anregungswellenlänge λ und den Brechungsindex n enthalten.

Um die Größeninformationen zu erhalten, werden diese Werte mittels der Stokes-Einstein-Gleichung[117]

$$d_H = \frac{k_B * T}{3 * \pi * \eta * D} \quad \text{(G8)}$$

in den hydrodynamischen Durchmesser d_H umgewandelt (k_B = Boltzmann-Konstante). Variablen, wie Lösungsmittelviskosität η und Temperatur T , müssen bekannt sein, da diese die Diffusionsrate der Partikel beeinflussen. Die gemessene Größenverteilung wird als Intensitätsverteilung angezeigt. 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 hängt nicht nur von der Größe des Partikelkerns ab, sondern auch von jeder Oberflächenstruktur sowie von der Konzentration und Art der Ionen im Medium. Die Ionen im Medium und die Gesamtionenkonzentration können die Partikeldiffusionsgeschwindigkeit beeinflussen, indem sie die Dicke der elektrischen Doppelschicht ändern. Jede Änderung der Oberfläche eines Partikels, die die Diffusionsgeschwindigkeit beeinflusst, ändert entsprechend die scheinbare Größe des Partikels. Die Art der Oberfläche und des Proteins sowie die Ionenkonzentration des Mediums können die Proteinkonformation beeinflussen, was wiederum die scheinbare Größe um einige Nanometer verändern kann.

Für Proben mit einer multimodalen Größenverteilung muss die Summe aller exponentiellen Abklingfunktionen $g_1(\tau)$ in der Korrelationsfunktion enthalten sein:

$$g_2(\tau) = C[1 + Bg_1(\tau)^2] \quad (G9)$$

Die Breite der Partikelgrößenverteilung wird durch den Polydispersitätsindex (PDI) beschrieben. Dieser wird durch die kumulative Anpassung, welche eine Abklingkonstante der Intensitätskorrelationsfunktion berechnet, abgeleitet. [115,118]

Die Beschreibung der Datenanalyse ist in Kapitel 4.5 zu finden.

2.5.2 Elektrophoretische Lichtstreuung

Vesikel, die, wie in dieser Arbeit verwendet, aus einer Mischung von neutralen und negativ geladenen Lipiden bestehen, bilden in der Summe eine negativ geladene Oberfläche, die man als eine feste oder starre Schicht aus geladenem Material betrachten kann. In einer Elektrolytlösung herrscht eine gleichmäßige Verteilung der Anionen und Kationen in der Masse. In der Nähe des Partikels (LUV) werden Kationen zum Partikel hingezogen, was zu einer höheren Konzentration an Kationen führt und in ähnlicher Weise führt die Abstoßung von Anionen zu einer geringeren Konzentration von Anionen (Abbildung 11). Dieser Bereich ist eine diffuse Ionenschicht, die die Ladung auf dem Teilchen ausgleicht. Es existiert somit eine starre Schicht, die mit der Partikeloberfläche und dem fest gebundenen Material (z. B. MBP) verbunden ist (Stern-Schicht) und eine diffuse Schicht. Kombiniert erhält man die diffuse elektrische Doppelschicht. Die diffuse Schicht ist durch einen Überschuss an Gegenionen gekennzeichnet. Im Bulk dagegen sind alle Ionen gleichmäßig verteilt. Sehr nahe am Partikel wird das Material entweder absorbiert oder ist stark mit dem Partikel verbunden, so dass es beim Partikel verbleibt, wenn das geladene Teilchen sich relativ zur Flüssigkeit bewegt. Der Übergangspunkt zwischen gebundener und freier Flüssigkeit wird als Scher- oder Gleitebene bezeichnet. [119]

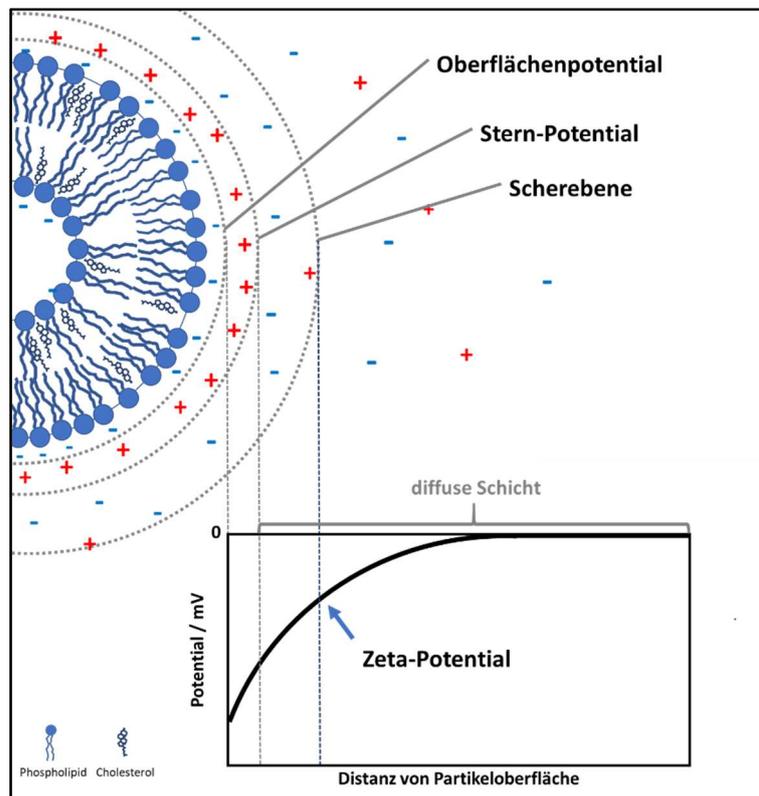


Abbildung 11: Schema einer elektrischen Doppelschicht, die ein Partikel in einem wässrigen Medium umgibt in Beziehung zu einem Graphen des elektrischen Potentials als Funktion der Distanz zur Partikeloberfläche. Das geladene Partikel wird durch einen Querschnitt eines Vesikels dargestellt, bestehend aus einer Mischung aus negativ geladenen Phospholipiden und Cholesterin.

Das elektrische Potential ist ein Maß dafür, wie viel Energie benötigt wird, um eine einzelne Punktladung aus unendlich großer Entfernung zum Teilchen hin zu bewegen. Insgesamt wird das Oberflächenpotential einer Lipiddoppelschicht durch vier Komponenten innerhalb der Kopfgruppenschicht der Lipiddoppelschicht bestimmt: dem molekularen Dipol der Esterbindungs-carbonyle, die Ladungen und molekularen Dipole der Kopfgruppe, die Ladung-Ladung-Wechselwirkungen zwischen benachbarten Kopfgruppen (Ionennetzwerk, Abschirmung) sowie die Wechselwirkung zwischen festen Oberflächenladungen und mobilen Gegenionen (Abschirmung). [1]

Die Oberflächenladung wird durch das Vorhandensein von adsorbiertem Material mit entgegengesetzter Ladung abgeschirmt. Das Potential nimmt somit zwischen der Partikeloberfläche und der Gleitebene ab (Abbildung 11). Das Potential in der Gleitebene ist als das Zeta-Potential definiert [120,121]. Das Potential nimmt aufgrund des Elektrolyten und der polaren Natur der Flüssigkeit über die Gleitebene hinaus weiter ab. Die Distanz, über die sie abnimmt, hängt von einer Reihe von Faktoren ab. Die Dicke der elektrischen Doppelschicht ist definiert als der Abstand, bei dem das Potential auf $1/e$ seines Anfangswertes abgefallen ist und dieser Abstand wird als κ^{-1} (Debye-Länge) beschrieben. κ ist umgekehrt proportional zur Salzkonzentration. Mit steigender Ionenstärke nimmt diese Dicke also ab. [122]

Die gebräuchlichste Methode zur Messung des Zeta-Potentials ist die Elektrophorese, diese bestimmt die elektrophoretische Beweglichkeit der in Lösung befindlichen Teilchen auf dem Weg zur Elektrode entgegengesetzter Ladung, in Gegenwart eines elektrischen Feldes [123]. Wenn ein elektrisches Feld mit zwei Elektroden angelegt wird, bewegt sich ein Partikel in Richtung der entgegengesetzt geladenen Elektrode und es besteht ein Gleichgewicht zwischen der Kraft, die versucht es in Richtung der Elektrode zu bewegen (elektrostatische Kraft) und der Reibungskraft aufgrund der Viskosität der Flüssigkeit. Die resultierende Endgeschwindigkeit ist proportional zum elektrischen Feld und die Proportionalitätskonstante wird als elektrophoretische Mobilität (U_E) bezeichnet. Gleichzeitig versucht die diffuse Ionenschicht um das Partikel herum, sich in die entgegengesetzte Richtung zur anderen Elektrode zu bewegen.

Das Verhältnis des Teilchenradius zur Dicke der Doppelschicht ist $\kappa \cdot a$. Für kleine $\kappa \cdot a$ -Werte kann die Hückel-Gleichung verwendet werden, um das Zeta-Potential aus der elektrophoretischen Mobilität zu berechnen. Das andere Extrem ist eine sehr dünne Doppelschicht, hier wird die Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung verwendet. Fehlt die große Ionenwolke (bei geringen Ionenstärken), die das Partikel verlangsamt, bewegt sich das Partikel schneller. In Bereichen, in denen $\kappa \cdot a \approx 1$ wird die Hückel-Gleichung um einen Multiplikator, der eine Funktion von $\kappa \cdot a$ ist (Henry-Funktion), erweitert. Die Teilchen bewegen sich mit einer Geschwindigkeit, die vom Zeta-Potential, der Feldstärke, der Dielektrizitätskonstante und der Viskosität der Probe abhängt. Nach der Henry-Gleichung[124] steht das Zeta-Potential ζ in Verbindung mit der elektrophoretischen Mobilität:

$$U_E = \frac{2 * \varepsilon * \zeta * F(\kappa * a)}{3 * \eta} \quad (G10)$$

wobei U_E die elektrophoretische Mobilität, ε die Permittivität, ζ das Zeta-Potential, η die Viskosität und $F(\kappa * a)$ die Henry-Funktion mit κ^{-1} = Debye-Länge und a = Teilchenradius ist.

Bei der elektrophoretischen Lichtstreuung (ELS)[120,125] wird ein elektrisches Feld in einer flüssigen Probe erzeugt, wodurch die Partikel in Bewegung gesetzt werden. Je größer die Ladung der Partikel, desto schneller bewegen sie sich. Wenn ein Laserstrahl durch eine Partikelprobe geleitet wird, streut jedes Partikel das Licht und erzeugt eine Doppler-Verschiebung, die von der Geschwindigkeit dieses Partikels abhängt. Die Summe aller Verschiebungen trägt zur Intensität des gestreuten Lichts bei und variiert mit der Zeit. Ein Spektrumanalysator kann verwendet werden, um die Frequenzkomponenten der Doppler-Verschiebungsfrequenzen des gestreuten Lichts anzuzeigen. Die Frequenzverteilung kann in eine Geschwindigkeitsverteilung und diese weiter in eine elektrophoretische Mobilitätsverteilung transformiert werden, welche anschließend in eine Zeta-Potential-Verteilung umgewandelt werden kann. Die Laser-Doppler-Methode (LDV) hat eine Einschränkung hinsichtlich der Menge an Elektrolyt, die in der

Probe vorhanden sein kann. Diese wird mit der *Phase-Analysis Light Scattering*(PALS)-Technik[126] überwunden, indem anstelle der gemessenen Frequenzverschiebung die Phasenverschiebung bestimmt wird. Die gemessene Phasenänderung ist proportional zur Änderung der Position der Partikel (Phase = Frequenz*Zeit). Somit wird die Messung von Proben mit hoher Leitfähigkeit und Proben mit geringer Partikelmobilität ermöglicht [121,127].

2.5.3 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Die Elektronenspinresonanz (EPR)-Technik ist hier geeignet, da die EPR-Spektren nicht von Lichtbeugung und Immobilisierung durch MBP-induzierte Vesikelaggregation beeinflusst werden. Vesikelaggregation ist eine sehr gute Nachahmung der *in vivo* Funktion von MBP in der Myelinhülle und EPR von Spinmarkierungen bietet den Vorteil, dass substituentenspezifische Interaktionen in dieser natürlichen Umgebung untersucht werden können.

Diese spektroskopische Methode basiert auf der Wechselwirkung eines Elektronenspins in einem paramagnetischen Zentrum mit einem externen Magnetfeld B_0 . Ungepaarte Elektronen besitzen einen intrinsischen Spin und daher auch einen magnetischen Impuls, der mit einem externen Magnetfeld interagiert. Aufgrund nicht entarteter magnetischer Spinzustände wird die Energie des Elektrons innerhalb des Magnetfeldes empfindlich gegenüber der magnetischen Quantenzahl m_S . [128]

Der Zeeman-Effekt bezeichnet die Aufspaltung der Energie eines freien Elektronenspins in zwei diskrete Energieeigenwerte in einem Magnetfeld B_0 . Die Größe der Aufspaltung ist proportional zur Stärke des äußeren Magnetfeldes (siehe Abbildung 12).

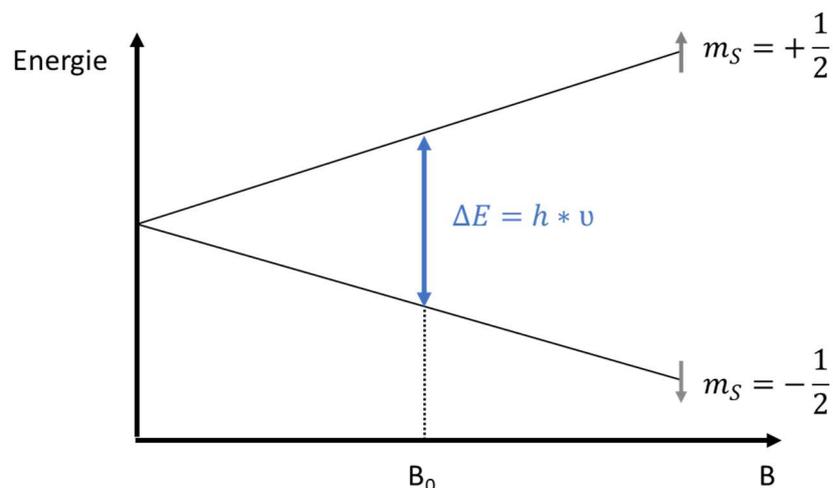


Abbildung 12: Schema einer Zeeman-Aufspaltung eines freien Elektrons in einem externen Magnetfeld B mit den beiden Energieniveaus und die benötigte Energiedifferenz ΔE für einen Spinübergang (in Anlehnung an Referenz [129]).

Die Energieeigenwerte E_{m_S} mit den Spinquantenzahlen $m_S = +\frac{1}{2}$ und $m_S = -\frac{1}{2}$ können mithilfe von Gleichung 11 berechnet werden [130]:

$$E_{m_S} = m_S * g * \mu_B * B_0 \quad (G11)$$

wobei g den Landé-Faktor des ungepaarten Spins und μ_B das Bohr'sche Magneton repräsentiert.

Daraus ergibt sich für die Energiedifferenz ΔE

$$\Delta E = E_{+1/2} - E_{-1/2} = g * \mu_B * B_0 = h * \nu \quad (G12)$$

Dabei ist h das Plancksche Wirkungsquantum und ν die Frequenz der absorbierten Strahlung, mit der Übergänge zwischen den Energieniveaus induziert werden. Diese Strahlung liegt, für EPR typische Magnetfeldstärken, im Mikrowellenbereich. Die Resonanzbedingung (G12) ist erfüllt, wenn die Energie der elektromagnetischen Strahlung der Energiedifferenz zwischen den zwei Spinzuständen entspricht, es kommt zur Absorption und somit zum Übergang zwischen den verschiedenen Energieniveaus. Die Resonanzposition wird durch die Wechselwirkung des Elektronenspins mit dem Magnetfeld spinnaher Atomkerne verändert. [129,131]

Der Spin-Hamilton-Operator \hat{H}_S [132,133] beschreibt die energetischen Wechselwirkungen des Elektronenspins mit seiner Umgebung

$$\hat{H}_S = \hat{H}_{EZ} + \hat{H}_{ZFS} + \hat{H}_{ee} + \hat{H}_{HF} + \hat{H}_{NZ} + \hat{H}_{NQ} . \quad (G13)$$

Dieser besteht, in Bezug auf die Energiebeiträge die den Spin betreffen, aus der Elektron-Zeeman-Wechselwirkung (\hat{H}_{EZ}), der Nullfeldaufspaltung (*zero-field splitting*; \hat{H}_{ZFS}), der Elektron-Elektron-Wechselwirkung (\hat{H}_{ee}), der Hyperfein-Wechselwirkung (\hat{H}_{HF}), der Kern-Zeeman-Wechselwirkung (\hat{H}_{NZ}) und der Kern-Quadrupol-Wechselwirkung (\hat{H}_{NQ}). Die jeweiligen Bestandteile werden im Folgenden vorgestellt.

Die Elektron-Zeeman-Wechselwirkung (\hat{H}_{EZ}) wurde schon im vorherigen Abschnitt der Zeeman-Aufspaltung beschrieben und dominiert im Normalfall im Spin-Hamilton-Operator. Dieser beruht auf der Wechselwirkung der Spinzustände mit dem externen Magnetfeld und wird mittels des Spinoperator \hat{S} definiert als:

$$\hat{H}_{EZ} = g * \mu_B * B * \hat{S} . \quad (G14)$$

Der g -Faktor hat nun die Form einer 3x3-Matrix und kann mittels der Euler-Winkel-Transformation des Magnetfeldvektors in das molekulare Koordinatensystem des Radikals vereinfacht werden. Dabei entsteht eine diagonalisierte Matrix, welche als symmetrischer Tensor aus drei Hauptwerten (g_{xx}, g_{yy}, g_{zz}) und drei Euler-Winkeln ($\alpha, \beta,$

γ), die deren Orientierung im molekularen Koordinatensystem beschreiben, formuliert werden kann. [133]

$$g = \begin{pmatrix} g_{xx} & g_{xy} & g_{xz} \\ g_{yx} & g_{yy} & g_{yz} \\ g_{zx} & g_{zy} & g_{zz} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} g_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & g_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & g_{zz} \end{pmatrix} \quad (\text{G15})$$

Als isotroper Landé-Faktor g_{iso} wird der gemittelte g -Wert beschrieben, der bei schneller isotroper Rotation (z. B. in Lösung) Anwendung findet.

$$g_{iso} = (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz})/3 \quad (\text{G16})$$

Die Nullfeldaufspaltung (\hat{H}_{ZFS}) beschreibt die Aufspaltung der Energiezustände ohne externes Magnetfeld durch mehrere ungepaarte Elektronen in einem Atom. Dabei wird ein inneres Magnetfeld erzeugt, das mit den Elektronenspins wechselwirken kann. Dies ist der Fall in Festkörpern bzw. bei Systemen mit einem Gesamtspin von $S \geq 1$. Für Spinsysteme mit kubischer Symmetrie und $S \leq 2$ verschwindet dieser Term komplett. [134]

Die Elektron-Elektron-Wechselwirkung (\hat{H}_{ee}) ist definiert als die Interaktion mehrerer ungepaarter Elektronenspins, die sich in unterschiedlichen Atomen aufhalten. Die Wechselwirkung kann in die Dipol-Dipol- und Austausch-Wechselwirkungen eingeteilt werden. Unter der Dipol-Dipol-Interaktion wird die Wechselwirkung von weit entfernten Elektronen verstanden, die sich in ihrer Ausrichtung der Spinmomente nicht beeinflussen und deren Energie proportional zur dritten negativen Potenz des Abstands r^{-3} ist. Die Spinaustausch-Interaktion tritt hingegen nur auf, wenn sich die ungepaarten Elektronen in unmittelbarer Nähe zueinander befinden (endliche Aufenthaltswahrscheinlichkeit im gleichen Orbital) und es zu einem quantenmechanischen Austausch der Spinausrichtung kommt. [135]

Die Hyperfein-Wechselwirkung (\hat{H}_{HF}) stellt die Hyperfeinaufspaltung der Energieniveaus aufgrund der Interaktion des Dipolmoments des Kerns mit dem Dipolmoment des Elektrons, dar. Die $2I+1$ -fache Aufspaltung kann beobachtet werden, mit I als Kernspinquantenzahl. Im EPR-Absorptionsspektrum sind gemäß dieser Spinmultiplizität und der quantenmechanischen Auswahlregeln $\Delta m_S = \pm 1$ und $\Delta m_I = \pm 0$ die entsprechende Anzahl an Absorptionslinien zu sehen. Die Hyperfein-Wechselwirkung kann in Analogie zur Elektron-Elektron-Wechselwirkung in eine Dipol-Kern- (\hat{H}_{DN}) und eine Fermi-Kontakt-Wechselwirkung (\hat{H}_F) aufgeteilt werden und ergibt zusammengefasst:

$$\hat{H}_{HF} = \hat{H}_{DN} + \hat{H}_F = \sum_k \hat{S} * A_k * \hat{I} \quad (G17)$$

wobei \hat{I} der Kernspinoperator und A_k der diagonale Hyperfeinkopplungstensor ist mit den Hauptkomponenten A_{xx} , A_{yy} und A_{zz} . In Lösung und mit schnellen isotropen Rotationen des Elektronenspins, wird die Hyperfein-Wechselwirkung komplett durch den Fermi-Kontakt-Beitrag repräsentiert. Die richtungsabhängige Hyperfeinkopplungskonstante a_{iso} ergibt sich aus den Abständen der Nulldurchgänge der Resonanzsignale. [133,134]

$$a_{iso} = (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})/3 \quad (G18)$$

Im Allgemeinen basiert die isotrope Hyperfeinkopplung auf dem direkten Kontakt zwischen dem ungepaarten Elektron und dem Kern, verursacht durch eine endliche Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Elektronen aus den s-Orbitalen am Kernort.

Die Kern-Zeeman-Wechselwirkung (\hat{H}_{NZ}) beschreibt den Einfluss eines externen Magnetfeldes auf den Kernspin I, der mit dem Elektronenspin S über die Hyperfein-Wechselwirkung gekoppelt ist. \hat{H}_{NZ} ist vor allem in Festkörpern oder Doppelresonanzexperimenten von Bedeutung, da dort die anisotropen Anteile nicht ausgemittelt werden. Im Fall von Flüssigkeiten wird die Quantisierungsrichtung ausschließlich durch die Kern-Zeeman-Interaktion bestimmt und parallel zur Richtung des externen Magnetfeldes ausgerichtet. [133,134]

Die Kern-Quadrupol-Wechselwirkung (\hat{H}_{NQ}) tritt nur bei Kernspins $I \geq 1$ auf. Aufgrund der nicht kugelförmigen Symmetrie der Ladungsverteilung resultiert ein Quadrupolmoment. Dieses wechselwirkt mit dem elektrischen Feldgradienten am Kernort. Der Beitrag dieser Wechselwirkung ist jedoch meist vernachlässigbar klein. [133,136]

2.5.3.1 Continuous wave EPR-Spektroskopie

Bei der *continuous wave* (cw) EPR-Spektroskopie wird bei einer konstanten Mikrowellenfrequenz das äußere Magnetfeld variiert und die Aufzeichnung der reflektierten Mikrowellenleistung als Funktion des Magnetfelds ergibt das cw EPR-Spektrum [129]. Die Analyse der EPR-Spektren wird im Folgenden anhand von Nitroxid-Spektren näher erklärt.

Die paramagnetischen Zentren selbst können als Spinmarker in die EPR-Probe eingeführt werden. Dies sind in den meisten Fällen Moleküle mit nur geringem Molekulargewicht, einschließlich eines oder mehrerer paramagnetischer Zentren, die aufgrund sterischer

Hinderung chemisch stabil sind. Die am häufigsten verwendeten paramagnetischen Zentren sind Nitroxide, welche auch in dieser Arbeit verwendet wurden. In Abbildung 13 ist der allgemeine molekulare Rahmen für Nitroxidmoleküle dargestellt, wobei sich die ungepaarten Elektronen überwiegend in den Sauerstoff- und Stickstofforbitalen aufhalten. Dabei verläuft die x-Achse entlang der NO-Bindung, die z-Achse entlang der $2p_z$ -Orbitale und die y-Achse senkrecht zur xz-Ebene.

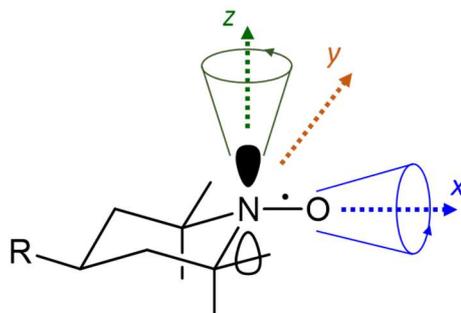


Abbildung 13: Grundstruktur eines üblichen Nitroxid-Spinlabels mit dem Rest R (TEMPO, R=H) mit eingezeichneten Tensorhauptachsen und deren taumelnden Rotationen entlang der Achsen.

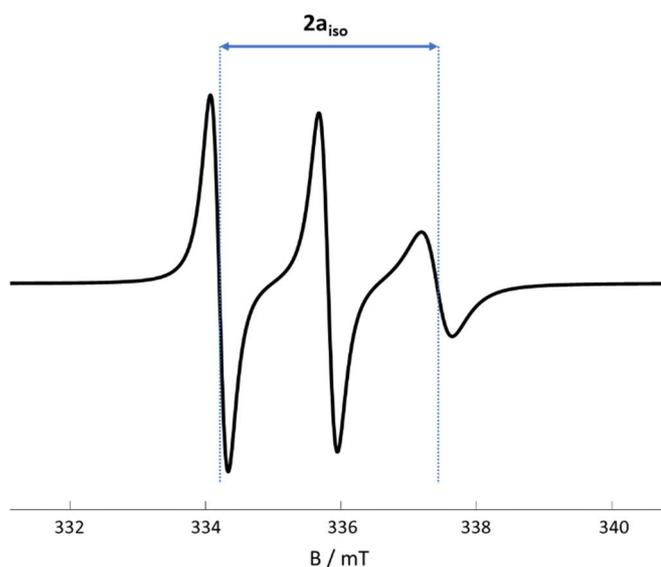


Abbildung 14: EPR-Spektrum (vereinfachte Darstellung) für die Beschreibung der isotropen Hyperfeinkopplungskonstante a_{iso} . $2a_{iso}$ ist gegeben durch den Abstand zwischen dem Punkt der Tieffeld-Linie und dem Punkt der Hochfeld-Linie, die durch die blauen, gestrichelten Linien gekennzeichnet sind.

Ein Vorteil der Nitroxid-Radikale in Lösung ist, dass der Hamilton-Operator vereinfacht werden kann. Meist sind die Elektron-Zeeman- und die Hyperfein-Wechselwirkung ausreichend, um das Spinsystem zu beschreiben [130,137]. Die magnetische Kernspinquantenzahlen sind für ^{14}N -Isotope $m_I = -1, 0, +1$, da $I(^{14}\text{N})=1$. Daraus folgt, dass jedes Zeeman-Energieniveau eines Elektrons in drei Unterebenen aufgeteilt ist, die

durch Hyperfein-Wechselwirkungen verursacht werden. Für schnelle isotrope Rotationen in Lösung sind typischerweise deshalb drei Resonanzlinien im Spektrum von Nitroxiden zu beobachten, die um a_{iso} separiert sind (Abbildung 14).

Generell befindet sich das ungepaarte Elektron bei Nitroxid-Radikalen in der π -Bindung zwischen dem Stickstoff- und Sauerstoffatom. Durch die Umgebung der Spinsonde kann die Elektronendichte des Elektrons beeinflusst werden. Die Elektronendichte des ungepaarten Elektrons wird in einer polaren Umgebung (durch Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen) hin zum Stickstoffatom verschoben. Daraus resultiert eine größere Hyperfein-Wechselwirkung zum Stickstoffatom. [131,133] Mittels der isotropen Hyperfeinkopplungskonstante a_{iso} (G18) kann die Umgebungspolarität der Spinsonde bestimmt werden. Diese ist für Nitroxid-Radikale in guter Näherung axial ($A_{xx} \approx A_{yy}$) und kann vereinfacht dargestellt werden [133,134]:

$$a_{iso,NO} = (2 * A_{xx} + A_{zz})/3 \quad (G19)$$

Je hydrophober die Umgebung des Spins, desto kleiner wird die Kopplungskonstante.

Wie oben bereits angedeutet, ist die Rotation des Spinsystems von Bedeutung für die Untersuchung der möglichen Wechselwirkungen. Das EPR-Spektrum ist hochsensibel für die molekulare Dynamik der Spinsonde, welche mittels der Rotationskorrelationszeit τ charakterisiert wird. Für die isotrope Bewegung von Spinsonden-Molekülen kann die Rotationskorrelationszeit beschrieben werden durch Brownsche Rotationsdiffusion zusammen mit Spezifikationen, basierend auf der Stokes-Einstein-Diffusion

$$\tau = \frac{1}{6 * D} \quad (G20)$$

mit dem Rotationsdiffusionskoeffizienten D . Bei nicht sphärischen Molekülen, die eine anisotrope Rotationsdiffusion ausüben, wird der Rotationsdiffusionstensor $D_{i(i=(x,y,z))}$ eingeführt (siehe Abbildung 13 für Visualisierung) und aus dem geometrischen Mittel der Tensorhauptwerte kann die mittlere Rotationskorrelationszeit

$$\tau_c = \frac{1}{6^3 \sqrt{D_{xx} D_{yy} D_{zz}}} \quad (G21)$$

berechnet werden. Dazu wird über die Euler-Winkel α , β und γ das Hauptachsensystem des Rotationsdiffusionstensors in das Molekülkoordinatensystem überführt. [133]

2.5.3.2 Puls EPR-Spektroskopie

Nachteilig bei cw EPR-Messungen ist die Schwierigkeit der Unterscheidung zwischen den einzelnen Wechselwirkungsbeiträgen des Spin-Hamilton-Operators. Pulstechniken, bei denen die Probe mit einer Sequenz von kurzen Mikrowellenpulsen bestrahlt wird und anschließend die zeitaufgelösten Reaktion gemessen wird, bieten die Möglichkeit eng beieinanderliegende Linien aufzulösen und eignen sich gut zur Messung von Relaxationseffekten [128,138]. Dadurch können selektiv spezifische Wechselwirkungen betrachtet werden, wie z. B. die Elektron-Kern-Wechselwirkung bei ESEEM-Experimenten oder die dipolare Elektron-Elektron-Wechselwirkung in DEER-Experimenten. Zur Beschreibung der Puls-Experimente mit der Bewegung der Magnetisierung eignet sich das Vektorbild.

Die Pulse ändern den Spinzustand, der als Änderung des Winkels des Magnetisierungsvektors in Bezug auf das externe B_0 -Feld beschrieben werden kann. Dabei spielen die Pulslänge und die Magnetfeldamplitude des angewendeten Pulses eine Rolle für die Drehung des Magnetisierungsvektors. [139]

Hahn-Echo-Experimente

Eines der einfachsten Puls-Experimente ist die Detektion des Elektronenspin-Echos (ESE). Dieses beschreibt das Wiederauftreten der Magnetisierung als Echo der anfänglichen Magnetisierung nach einer Impulssequenz von $\pi/2$ - τ - π - τ , welche als Primärecho oder auch Hahn-Echo bezeichnet wird [140]. τ repräsentiert dabei die freie Evolutionszeit.

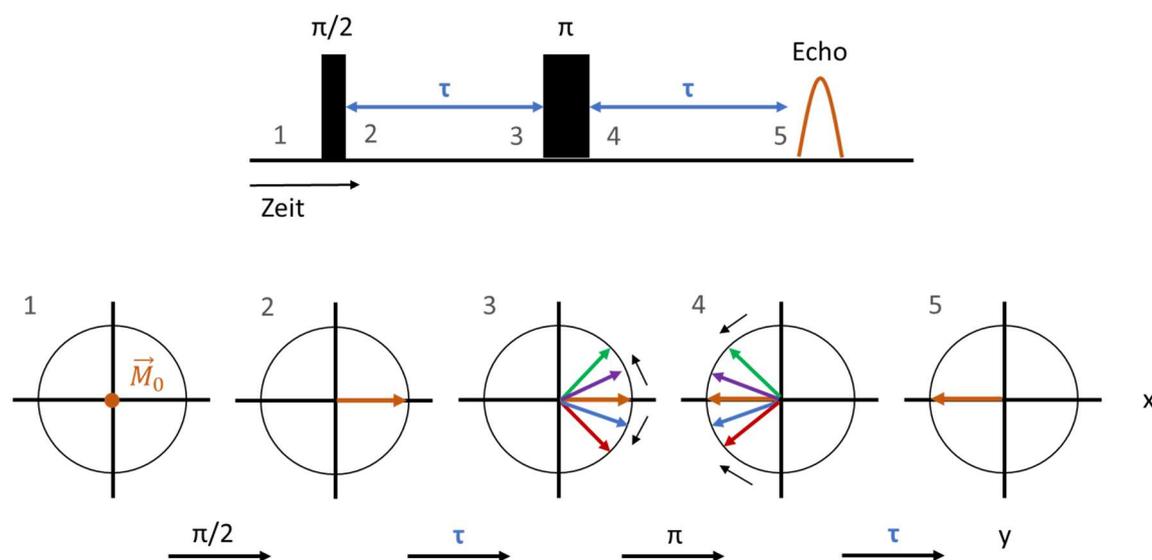


Abbildung 15: Schema der Hahn-Echo-Sequenz $\pi/2$ - τ - π - τ (oben) mit den Positionen und Bewegungen der Magnetisierungsvektoren zu bestimmten Zeitpunkten während der Pulssequenz (unten). Die grauen Zahlen kennzeichnen die zeitlichen Positionen (oben) und die entsprechenden Vektorbilder (unten) (in Anlehnung an Referenz [139]).

In Abbildung 15 ist die Hahn-Echo-Sequenz, mit Verbildlichung der Magnetisierungsvektoren zu verschiedenen Zeitpunkten, dargestellt.

Am Anfang ist der Magnetisierungsvektor entlang der z-Achse, parallel zum statischen Magnetfeld ausgerichtet und befindet sich im thermischen Gleichgewicht (Position 1 Abb. 15). Aufgrund des $\pi/2$ -Pulses (90°) in y-Richtung wird die Magnetisierung um die y-Achse rotierend gekippt (Position 2 Abb. 15). Während der Evolutionszeit beginnen die Spinpakete mit ihrer jeweiligen Larmor-Frequenz zu präzedieren (Position 3 Abb. 15). Daraus resultiert eine Defokussierung der transversalen Magnetisierung. Der zweite Puls spiegelt mit einem Winkel von 180° (π) die Vektoren an der y-Achse, wobei die Richtung der einzelnen Rotationen nicht verändert wird (Position 4 Abb. 15). Deshalb laufen in der darauffolgenden Evolutionszeit die Spinpakete wieder aufeinander zu und bilden das Elektronenspin-Echo (Position 5 Abb. 15). ESE-detektierte EPR ist eine Technik, bei der die Pulsfolge mehrmals beim Durchlaufen des Magnetfeldes wiederholt wird, allerdings werden nur die inhomogen verbreiterten Signale refokussiert [141].

Die endgültige Echointensität ist stark abhängig von der Phasengedächtniszeit T_m . Diese ist definiert als die Zeitkonstante des Abfalls der Echoamplitude und kann über ein 2-Puls-Experiment gemessen werden. Dabei wird das Echo in Abhängigkeit der Zeit bei einem bestimmten Magnetfeld gemessen und der Zerfall mittels einer exponentiellen Funktion angepasst. [142]

DEER-Experimente

Elektron-Elektron-Doppelresonanz (*double electron-electron resonance*, DEER)-EPR-Spektroskopie dient der Untersuchung der schwachen dipolaren Kopplungen zwischen zwei ungepaarten Elektronen, über die der Abstand zwischen den Spins bestimmt werden kann (r^{-3} -Abhängigkeit, im Bereich von ca. 1,5–8,0 nm) [128,138]. Mittels Pulsen mit zwei unterschiedlichen Frequenzen lässt sich die Elektron-Elektron-Wechselwirkung von anderen Interaktionen trennen. In dieser Arbeit wurde eine 4-Puls-Abfolge ohne Totzeit verwendet, die im Folgenden kurz erläutert wird.

Die verwendete 4-Puls-Sequenz, $\pi/2(\nu_{\text{obs}})-\tau_1-\pi(\nu_{\text{obs}})-t'-\pi(\nu_{\text{pump}})-(\tau_1+\tau_2-t')-\pi(\nu_{\text{obs}})-\tau_2$ -Echo [143,144], ist in Abbildung 16 dargestellt.

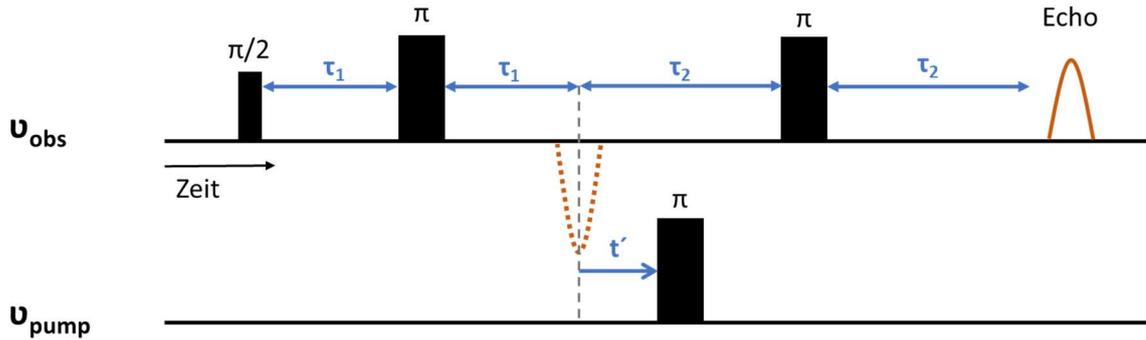


Abbildung 16: Puls-Sequenz für 4-Puls-DEER-Experimente. Die Evolutionszeiten τ_1 und τ_2 der Beobachterfrequenz (u_{obs}) werden konstant gehalten, während die Zeit t' zwischen dem ersten, unbeobachteten Echo (gestrichelte Linie) und dem Pump-puls mit der Pumpfrequenz u_{pump} variiert wird. Adaptiert von G. Jeschke [145].

Es wird angenommen, dass A-Spins nur durch die Beobachterpulse und B-Spins nur durch den Pump-puls angeregt werden. Mittels der Beobachtersequenz wird ein refokussiertes Echo erzeugt, das aus drei Pulsen mit der Beobachterfrequenz u_{obs} besteht und konstante Evolutionszeiten τ_1 und τ_2 aufweist. Der Pump-puls mit der Pumpfrequenz u_{pump} invertiert die Spinzustände, wobei die Bestrahlungszeit des Pump-pulses zwischen der Position des Primär-Echos (das nicht detektiert wird) und des π -Pulses der Pumpsequenz variiert wird. Durch die Invertierung ändert sich auch das lokale Feld der A-Spins, wodurch sich die Präzessionsfrequenz der A-Spins um die Elektron-Elektron-Wechselwirkung ändert. Es entsteht ein Phasenunterschied der Magnetisierung von $\Delta\Phi = \nu_{DD} * t'$. Anschließend wird die Echointensität des refokussierten Echos als Funktion des Pump-pulses zur Zeit t' aufgenommen.

Basierend auf

$$\nu_{DD} = \frac{\mu_0 * g_A * g_B * \mu_B^2}{4 * \pi * \hbar} \frac{1}{r_{AB}^3} \quad (\text{G22})$$

können aus diesem Datensatz die Abstandsdaten extrahiert werden. [145] Weitere Informationen zur Durchführung und Datenanalyse der Puls-Experimente finden sich in Kapitel 4.7.2.

2.5.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) nutzt das Prinzip der Elektronenmikroskopie (EM), die eine direkte Abbildung von Objekten mit Hilfe von Elektronenstrahlen ermöglicht. Hierbei können kleinere Strukturen (bis zu 0,1 nm) erkannt werden, da die freien beschleunigten Elektronen eine kürzere Wellenlänge besitzen als z. B. das sichtbare Licht und somit eine höhere Auflösung ermöglichen. [146]

Der klassische Aufbau eines TE-Mikroskops wird im Folgenden beschrieben. Der Elektronenstrahl wird an einer elektronenliefernden Kathode (Wolframdraht, LaB₆, Feldemission) erzeugt. Die Elektronen werden aus der Kathode mittels Spannung zu einer Anode abgetrennt und die beschleunigten Elektronen treten durch das Anodenloch in den Strahlengang des Mikroskops. Im Strahlengang herrscht ein Vakuum, damit die Elektronen nicht von Molekülen aus der Luft abgelenkt werden. Die Beschleunigungsspannungen liegen im Bereich von 80-400kV. Durch Spulen, die sich in einem elektromagnetischen Feld befinden, wird der Elektronenstrahl gebündelt und fokussiert, somit dienen diese als Linsen. Beim Auftreffen auf die Probe wird der Strahl in Abhängigkeit von der Elektronendichte der Atome, die sich in der Probe befinden, gestreut. Eine hohe Elektronendichte (höhere Ordnungszahl) resultiert in einer stärkeren Streuung nach Rutherford [147]. Der Kontrast von organischen Präparaten (niedrige Elektronendichte) kann durch Verwendung von Schwermetallen erhöht werden [148,149]. Nach Passieren der Probe, die ausreichend dünn sein muss, werden die gestreuten Elektronen von der Objektivblende und Objektivlinse gesammelt. Durch das Projektiv-Linsensystem wird das Zwischenbild weiter vergrößert und kann auf einem mit fluoreszierendem Zinksulfid beschichtetem Detektor direkt beobachtet werden oder über einen Szintillator in Licht umgewandelt und mittels einer CCD-Kamera digital betrachtet werden. [150]

Für anorganische Proben wird z. B. durch Polieren oder Ionendünnung die Probe abgetragen, sodass diese die erforderliche Transparenz aufweist [151–153]. Bei biologischen Proben ist die Herausforderung meist, dass diese in wässrigem Medium existieren. Durch die Entfernung von Wasser (Dehydratisierung mit Ethanol oder Aceton)[154] oder eine Form der Fixierung (mittels Glutaraldehyd[155], Einbettung in Acrylharze[154], Färbung[156], Kryo-Fixierung[157]) kann eine realistische Darstellung erhalten werden.

Kryo-TEM ist eine Weiterentwicklung der standardmäßigen TEM, um das Problem der empfindlichen wässrigen Proben zu lösen. Dabei werden diese auf ein Kohlenstoff-*grid* aufgebracht und die überschüssige Probe mit Hilfe eines Filterpapiers (*blotting*) entfernt. Der dünne Probenfilm wird dann mittels flüssigem Ethan (*plunge-freezing*) schockgefroren. [157,158] Dabei kristallisiert das Wasser nicht, sondern bildet glasartiges (vitrifiziertes) Eis. Die Probe wird anschließend bei Temperaturen von flüssigem Stickstoff vermessen. Diese Methode ermöglicht Proben zu untersuchen, die sich sowohl nur in wässrigem Medium bilden und existieren können, als auch sensibel für Färb- und Trocknungsprozesse sind. Außerdem wird eine geringe Artefaktbildung ermöglicht. Deshalb ist die Kryo-TEM gerade für Lipid-Vesikel und Proteine zu empfehlen. Der teilweise geringe Kontrast kann dabei von Nachteil sein.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse und die dazugehörigen Diskussionen sind in dieser Arbeit in drei große Abschnitte untergliedert:

1. Der Einfluss des Cholesterol- und MBP-Gehaltes auf Lipidmonoschichten an der Luft/Wasser-Grenzfläche
2. Der Einfluss des Gehaltes an Cholesterol und MBP auf unilamellare Lipiddoppelschichten
3. Der Einfluss von divalenten Metallionen auf das Bindungsverhalten zwischen MBP und Lipiddoppelschicht

Alle Lipid-Zusammensetzungen ähneln dabei der zytoplasmatischen Membran von Myelin.

3.1 Einfluss des Cholesterolgehaltes in myelinartigen Monoschichten auf die Interaktion mit MBP an der Luft/Wasser-Grenzfläche

Dieser Abschnitt ist bereits veröffentlicht in:

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. <https://doi.org/10.3390/cells9030529>.

Es gibt viele Studien mit Lipid-Modellsystemen, in denen die Wechselwirkung zwischen MBP und Lipiden untersucht wurde, da die genaue Reihenfolge der Ereignisse und Besonderheiten der Konformation, Orientierung und Selbstorganisation von MBP auf einer einzelnen Membranoberfläche nicht bekannt ist. Diese müssen jedoch mit Vorsicht interpretiert werden, da die Modellsysteme häufig unter Verwendung des gesamten Myelins [159–161] zu komplex oder zu einfach sind, wenn nur Teile der Lipidzusammensetzung der zytoplasmatischen Seite verwendet werden [162–164]. Studien haben gezeigt, dass die Zusammensetzung der Monoschicht und die Menge des darin enthaltenen Proteins für das Ergebnis wichtig sind und ein guter Hinweis auf die Rolle in Lipiddoppelschichten wie Myelin sein können [14,165]. In einer früheren Studie wurde diese Wechselwirkung mit Monoschichtadsorptionsexperimenten untersucht, indem die Zusammensetzung der Lipidmonoschicht variiert und Informationen über die spezifische Rolle jedes Lipids geliefert wurden [37]. Dabei wurde festgestellt, dass Cholesterol im Vergleich zu anderen Lipiden eine untergeordnete Rolle spielt.

Mit einem geringen Einfluss auf die Proteininsertion (zumindest auf MBP) scheint die Cholesterolmenge von 44% der gesamten Lipidmenge in der natürlichen

Zusammensetzung sehr hoch zu sein. Dies wirft die Frage auf, warum der Cholesterolgehalt so hoch ist (in den meisten ZNS-Membranen liegt er unter/etwa bei 20%) und wie MBP-Myelin-Wechselwirkungen von diesem spezifischen Cholesterolgehalt abhängen. Generell stören Abweichungen vom normalen Cholesterolspiegel die Membranfunktionen und führen zu einer Beeinträchtigung der Immunantwort und zahlreichen anderen gesundheitlichen Anomalien [166–168]. Im Rahmen dieses Kapitels sollen nun die Wechselwirkungen zwischen einer Lipidmonoschicht mit der allgemeinen Zusammensetzung der zytoplasmatischen Myelinmembran mit variierendem Cholesterolgehalt und MBP untersucht werden.

Im Folgenden werden die Langmuir-Monoschichtergebnisse von myelinähnlichen Lipidmonoschichten mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt (0%, 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 44%, 50%, 60% und 100% Cholesterol) präsentiert, wobei das Molverhältnis der anderen Lipide in den Gemischen konstant gehalten wird. Zusätzlich wurde die Luft/Wasser-Grenzfläche derselben Proben durch Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Alle Experimente wurden mit und ohne bovinem MBP durchgeführt, um die Wechselwirkung von MBP mit den Monoschichten in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt zu untersuchen.

3.1.1 Kompressionsisothermen

Alle Monoschicht-Messungen wurden bei 20 °C mit einer Subphase von HEPES-NaCl-Puffer (mit 100 nM MBP) durchgeführt. Die untersuchten Lipidmischungen waren eine Kombination verschiedener natürlicher Lipide, ähnlich der zytoplasmatischen Seite von Myelin [68,169]. Gemische von 0%, 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 44%, 50%, 60% und 100% Cholesterol wurden vermessen, wobei die Molverhältnisse der anderen Lipide konstant gehalten wurden (PC/PS/PE/SM/PI 11:13:27:3:2; Durchführungsparameter siehe Kapitel 4.2). Eine Wilhelmy-Plattenanordnung wurde zur Messung des Oberflächendrucks verwendet und der Oberflächendruck selbst liefert Informationen über die Wechselwirkung zwischen Protein und Lipidschicht an der Luft/Wasser-Grenzfläche [170–172].

Die Kompressionsisothermen von Lipidmischungen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt ohne MBP sind in Abbildung 17 dargestellt. Die *lift off*-Bereiche der Isothermen werden im Allgemeinen mit steigendem Cholesterolgehalt zu niedrigeren Oberflächen verschoben, dies weist auf den Aufbau einer kompakteren Monoschicht hin. Die Isotherme von 100% Cholesterol steigt aufgrund der hohen Steifigkeit des Films in der kondensierten Phase stark an und spiegelt die Ergebnisse von Berring *et al.* [100], Demel *et al.* [173] und Rodriguez *et al.* [174] für reines Cholesterol wieder. Die Verschiebung zu höheren Oberflächen mit abnehmendem Cholesterolgehalt zeigt den gleichen Trend wie in den Studien von Smaby *et al.* [175] und in den binären

Lipidsystemen von Berring *et al.* [100] und Kim *et al.* [176]. Die Gesamtform der Kurven bleibt ähnlich: diese geht von einer gasanalogen Phase in eine flüssig-expandierte Phase über und kollabiert bei hohen Oberflächendrücken, wobei kein Phasenübergang in der flüssig-expandierten Phase zu beobachten ist. Das Verhalten der 44%igen Cholesterolisotherme (der nativen Zusammensetzung) scheint besonders zu sein. Es beginnt ähnlich wie die Isothermen mit einem niedrigeren Cholesterolgehalt (30%–35%), endet jedoch in den Oberflächen mit einem höheren Cholesterolgehalt (50%–60%). Dies bedeutet, dass bei höheren Oberflächendrücken die Monoschicht aus 44% Cholesterol eine höhere Ordnung erreicht.

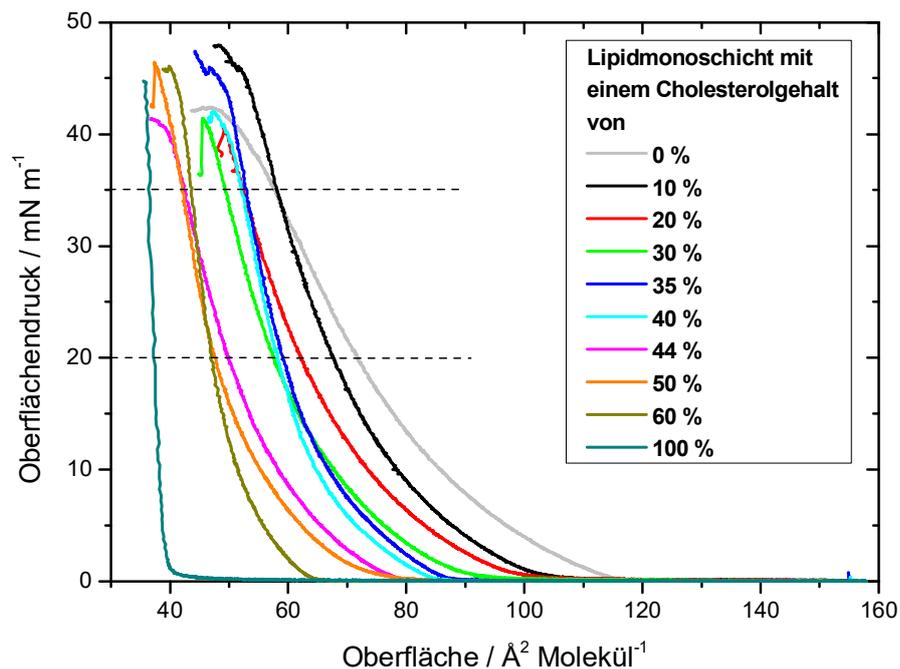


Abbildung 17: Vergleich der Kompressionsisothermen von Lipidmonoschichten mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt. Die Monoschichten haben eine ähnliche Zusammensetzung wie die zytoplasmatische Seite der Myelinscheide mit unterschiedlichen Cholesterolmengen (0%, 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 44%, 50%, 60%, 100%) auf einer N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-ethansulfonsäure (HEPES) -NaCl-Subphase. Die gestrichelten Linien bei 20 und 35 mN/m veranschaulichen die für die weitere Analyse verwendeten Flächenwerte.

Für Gemische mit 20%, 44% und 60% Cholesterol wurde die theoretische ideale mittlere Molekülfläche nach der Additivregel berechnet, wie von Berring *et al.* [100] beschrieben (siehe Gleichung G2, weitere Erläuterungen siehe A2). In allen drei Gemischen sind die experimentellen Werte im Vergleich zu den theoretischen Werten bei niedrigeren Oberflächen zu finden (Abbildung A2) und zeigen den Kondensations- und Ordnungseffekt von Cholesterol. Darüber hinaus wurden die überschüssigen freien Mischungsenergien ΔG_{excess} für Oberflächendrücke von 10, 20 und 35 mN/m für jede Monoschicht berechnet (nach G3, weitere Einzelheiten siehe A3) [101–104]. Die meist negativen ΔG_{excess} -Werte der Monoschichten stammen aus Anziehungskräften zwischen Molekülen, die zu einer Kondensation des Films führen [101,105]. Bei allen drei Oberflächendrücken liegen die

ΔG_{excess} -Werte der Monoschichten mit einem Cholesterolgehalt von 10% bis 40% relativ nahe bei 0 kJ/mol. Bei einem Cholesterolgehalt von 44% sinkt der Wert auf negativere ΔG_{excess} -Werte, die bei höheren Oberflächendrücken sogar abnehmen. Mit höherem Cholesterolgehalt steigt die überschüssige freie Mischungsenergie wieder an. Monoschichten mit 44% Cholesterolgehalt haben daher den höchsten Kondensationseffekt und die stärksten Anziehungskräfte, was zu Monoschichten mit der höchsten thermodynamischen Stabilität führt [177].

Nach Evaluierung des Injektionsprozesses (Diskussion in Anhang A4) wurde das Verfahren mit Injektion des Proteins in die gasanaloge Phase für die weiteren Experimente ausgewählt.

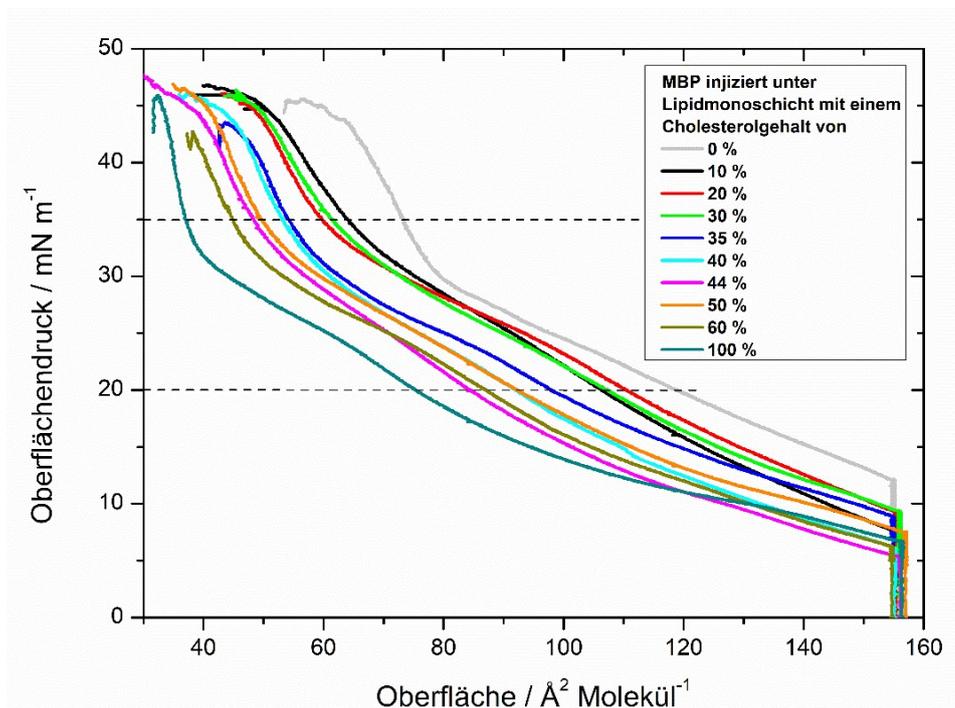


Abbildung 18: Vergleich der Kompressionsisothermen von Lipidmonoschichten mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt und basischem Myelin-Protein (MBP). Monoschichten haben eine ähnliche Zusammensetzung wie die zytoplasmatische Seite der Myelinscheide mit unterschiedlicher Menge an Cholesterol (0%, 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 44%, 50%, 60%, 100%) auf einer HEPES-NaCl-Subphase. Das basische Myelin-Protein wurde in die Subphase (100 nM) injiziert. Die gestrichelten Linien bei 20 und 35 mN/m teilen die Isothermen in die drei im Text diskutierten Regionen und visualisieren die Flächenwerte, die für die weitere Analyse herangezogen wurden (siehe Abbildung 19).

In Abbildung 18 sind die Isothermen der Monoschichten mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt und MBP dargestellt und weisen bereits auf den ersten Blick enorme Unterschiede auf. Die Kurven nach der Injektion von MBP, welches unter die Monoschicht injiziert wurde, weisen nicht nur einen *lift off* an einer viel größeren Oberfläche auf, sondern auch ihre Entwicklung unterscheidet sich stark von denen ohne MBP. Der frühere *lift off* erklärt sich durch den Einbau des Proteins in die Lipidmonoschicht, entweder durch Wechselwirkung mit den Acylketten oder den Lipidkopfgruppen [178]. Durch den Einbau des oberflächenaktiven Proteins steht weniger Fläche zur Verfügung und dies resultiert in

einer Zunahme des Oberflächendrucks. Die Oberflächendruckkurve kann in drei Bereiche unterteilt werden, wie in Abbildung 18 durch gestrichelte horizontale Linien dargestellt. Zu Beginn steigt die Kurve bei Kompression kontinuierlich auf ungefähr 20 mN/m an, gefolgt von einem zweiten Bereich mit einem geringen Anstieg von 20 mN/m bis ca. 35 mN/m, was auf ein Phasenübergangsverhalten hinweist. Deutlich sichtbar ist dieser Übergang in den Kompressibilitätsgraphen für jede Monoschicht mit MBP (Abbildung A5). Dort kann im gleichen Druck-Bereich eine starke Änderung der Kompressibilität beobachtet werden. Im dritten Abschnitt steigt der Oberflächendruck der Isothermen im Bereich zwischen 30 und 35 mN/m steil an, bis die Monoschicht bei etwa 45 mN/m zusammenbricht. Alle Isothermen haben die gleiche allgemeine Form. Das Gesamtverhalten der Isothermen mit MBP zeigt in Bezug auf die Staffelung der Monoschichten eine ähnliche Tendenz wie die Isothermen ohne MBP: In beiden Fällen (Abbildungen 17 und 18) erreichen die Monoschichten eine höhere Lipidordnung mit höherem Cholesterolgehalt.

Die mittleren Flächen pro Molekül für alle Monoschichtfilme in Präsenz und Abwesenheit von MBP, die bei Drücken von 20 mN/m (Abb. 19a) und 35 mN/m (Abb. 19b, siehe auch die horizontalen gestrichelten Linien in Abb. 17 und 18) bestimmt wurden, sind in Abbildung 19 dargestellt. Der allgemeine Trend der Monoschichten, geordneter zu werden, spiegelt sich in abnehmenden Flächen pro Molekül mit zunehmendem Cholesterolgehalt wider. Bei 20 mN/m beträgt der Unterschied zwischen den Oberflächen von Lipiden ohne MBP und Lipiden, die mit MBP interagieren, durchschnittlich $41 \pm 5,6 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ (Abbildung 19a). Dies weist stark darauf hin, dass MBP mit der Lipidmonoschicht interagiert, da sonst für schwache Wechselwirkungen die Flächenwerte weitgehend identisch sein sollten. Der Unterschied in der Oberfläche pro Molekül kann mit ungefähr 30-36 Lipiden pro MBP-Molekül berechnet werden (aus der Anzahl der Lipide für die gesamte Monoschicht durch die Anzahl der Proteine mit einer Oberfläche von 1300 \AA^2 (Durchschnitt aus drei α -Helices), bei 20 mN/m). Durch chemische Bindungsassays haben Sankaram *et al.* [179] ein Verhältnis von 36:1 und MacNaughtan *et al.* [180] durch Röntgenbeugung von 38:1 erhalten, welche mit dem hier erhaltenen Wert übereinstimmen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Menge an positiv geladenen Aminosäuren (31) mit der deduzierten Menge von 31 negativ geladenen Lipiden korreliert [181], die im hier berechneten Umfang der Lipide liegt.

Des Weiteren ist bei der natürlichen Zusammensetzung mit 44% Cholesterol in Anwesenheit von MBP ein deutlicher Abfall in der ansonsten stetig abnehmenden Kurve sichtbar. Die geraden Linien in Abbildung 19a und b zeigen die theoretischen idealen mittleren molekularen Oberflächen und verdeutlichen, dass die Kondensationswirkung von Cholesterol mit und ohne MBP mit 44% Cholesterolgehalt in der Monoschicht am stärksten ist. Ab einem Cholesterolgehalt von 50% und mit MBP im Film wird der Kondensationseffekt abgeschwächt. Das Erreichen einer höheren Ordnung durch Kondensation, bereits in Abwesenheit des Proteins, scheint eine gute Voraussetzung für

die Wechselwirkung mit MBP zu sein, da der Kondensationseffekt verstärkt wird. Eine höhere Ordnung kann zu einem besseren Zugang für MBP zu den Interaktionsstellen, wie z. B. negativ geladenen Lipiden, führen. Es ist bekannt, dass MBP als molekularer Klebstoff wirkt, wodurch die Myelinscheide kompakter wird [21]. Es scheint, dass durch die Wechselwirkung mit einer Membran auch die Monoschicht selbst verdichtet wird, indem die negativ geladenen Lipide zusammengezogen werden. Möglicherweise ist dies notwendig, um die α -Helices (nicht kovalent) in der Membran zu verankern. Dies weist darauf hin, dass die Lipidmischung mit 44% Cholesterol, wie sie auch in menschlichen zytoplasmatischen Zellen vorkommt, eine noch kompaktere Membranschicht zu bilden scheint (stark reduzierte Fläche pro benötigtem Molekül), die am besten mit MBP interagiert.

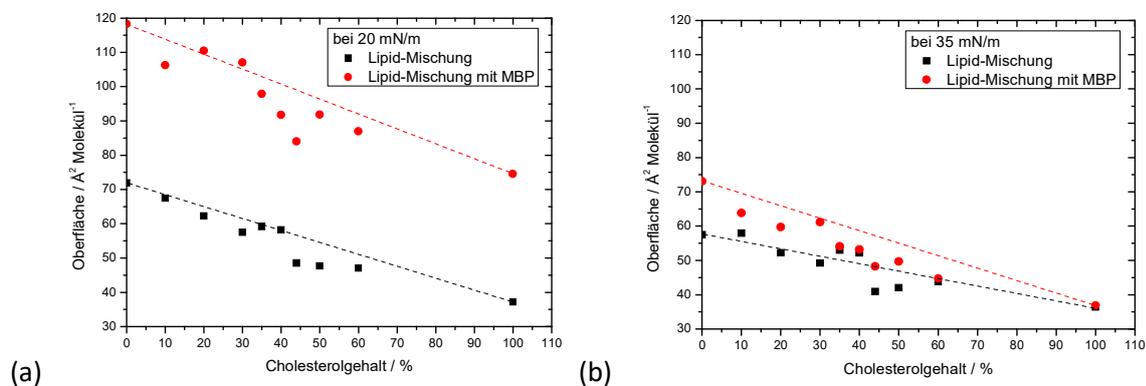


Abbildung 19: Mittlere Oberfläche in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt. Oberflächen von Lipidmonoschichten mit (rot) und ohne MBP (schwarz) aus den Isothermen der Abbildungen 17 und 18 bei Oberflächendrücken von (a) 20 mN/m und (b) 35 mN/m. Gerade Linien geben die theoretisch idealen mittleren molekularen Oberflächen an.

Bei Oberflächendrücken von 35 mN/m (Abb. 19b) gibt es jedoch keinen signifikanten Unterschied in den Oberflächen zu beobachten. Die Lipidmonoschicht verhält sich so, als ob keine Proteine vorhanden wären. Der Kondensationseffekt ist mit 44% Cholesterolgehalt wieder am höchsten, aber die Intensivierung mit MBP fehlt. Kombiniert führen diese Ergebnisse zu der Schlussfolgerung, dass MBP stark mit der Lipidmonoschicht interagiert und einen maximalen Oberflächendruck erreicht, bei dem die Interaktion am effizientesten ist. Nach diesem Punkt wird der Druck in dem System zu hoch und MBP wird wahrscheinlich aus der Monoschicht herausgedrückt (es kann immer noch z. B. von der wässrigen Seite aus haften, aber mit einem fast vernachlässigbaren Beitrag zum Druck). Wie aus den Isothermen ersichtlich, besteht bei hohen Oberflächendrücken über 35 mN/m jedoch immer noch eine gewisse Wechselwirkung zwischen Protein und Lipiden. Diese Vermutung wird auch durch die Ergebnisse von Rosetti *et al.* [182] gestützt, die auch das Oberflächenverhalten mit Langmuir-Filmen, jedoch des gesamten Myelins untersucht haben. Ebenso ist der maximale Insertionsdruck (MIP) von MBP in myelinähnlichen Monoschichten sehr hoch (42 mN/m) [37], was eher auf eine anhaltende Bindung von MBP an die Monoschicht hinweist. Es könnte sein, dass sich MBP tatsächlich in einer

Konformation ausrichtet, die nur minimal mit der Monoschicht interagiert und die von MBP in der Grenzflächenschicht eingenommene Fläche minimal ist. Dies könnte durch Adhäsion über elektrostatische Wechselwirkungen an den Lipidkopfguppen der Monoschicht oder Insertion einer kürzeren Aminosäuresequenz hervorgerufen werden. Betrachtet man die Differenz zwischen den Oberflächen von 20 und 35 mN/m mit MBP in verschiedenen Gemischen mit gleichem Cholesterolgehalt, so zeigt sich, dass mit 44% Cholesterol in der Monoschicht der Unterschied am geringsten ist ($36 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$, siehe Anhang A6 Tabelle A1). Eine mögliche Interpretation dieses Ergebnisses ist, dass die Monoschichten mit 44% Cholesterol und MBP bereits bei niedrigeren Oberflächendrücken einen stabilen selbstorganisierten Zustand erreichen.

3.1.2 Analyse der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen

Um ein besseres Verständnis darüber zu erhalten, warum Lipidmonoschichten mit 44% Cholesterol von den einfachen linearen Trends in Abbildung 19a abweichen, wurde die Luft/Wasser-Grenzfläche der Monoschicht mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Zu diesem Zweck wurde über dem Langmuir-Trog ein Fluoreszenzmikroskop montiert. Das Lipid Rhodamin-DHPE wurde als Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Dieses Phosphatidylethanolamin besitzt eine Kopfgruppe, die mit Rhodamin markiert ist und baut vorzugsweise in der flüssig-expandierten Phase einer Monoschicht ein. Dabei wurde vorab getestet, dass dieses keinen signifikanten Einfluss auf das Monoschichtverhalten hat (siehe Druck/Flächen-Isothermen im Anhang, Abbildung A7). Es werden zuerst die Aufnahmen von Filmen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt ohne MBP diskutiert und anschließend werden die Änderungen, hervorgerufen durch die Präsenz von MBP, analysiert und diskutiert.

Cholesterol hat eine kondensierende Wirkung [111,183], die auf der Bewegungsordnung der Phospholipid-Kohlenwasserstoffketten beruht. Für die Phospholipide in einer Monoschicht an der Luft/Wasser-Grenzfläche steht weniger Oberfläche zur Verfügung, dies führt zu einer Verringerung der Freiheitsgrade der Lipidbewegung [184,185]. Darüber hinaus unterbricht Cholesterol die Kopfgruppen-Kopfgruppen-Wechselwirkungen [63]. Es wird angenommen, dass der Kondensationseffekt zu Lipidflößen (*rafts*) führt: kleine Domänen, die mit Cholesterol, gesättigten Phospholipiden und Sphingolipiden angereichert sind. Diese sind dichter gepackt und weisen in einer ansonsten flüssigen Umgebung eine verringerte Fließfähigkeit auf, was als Koexistenz verschiedener Lipidphasen beschrieben werden kann [58,59]. Der Übergang zwischen einer Zweiphasenregion (Entmischung) und einer Einphasenregion (Mischbarkeit) ist druckabhängig und eine Funktion des Cholesterolgehalts [111,112]. Es sind mehrere Domänenmuster möglich. Streifen erscheinen nahe am oberen kritischen Mischungsdruck, während sich bei niedrigeren Oberflächendrücken kreisförmige Domänen bilden [111].

Veränderung des Cholesterolgehaltes ohne MBP

In Abbildung 20 sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Monoschichten ohne MBP mit der natürlichen Lipidzusammensetzung während einer Kompression dargestellt. Diese zeigen, dass bei 44% Cholesterol in der Monoschicht unterschiedliche Lipiddomänen sichtbar sind. Die hellen Bereiche der Aufnahmen stellen die flüssig-expandierte Phase dar, in der sich der verwendete Farbstoff Rhodamin-DHPE bevorzugt verteilt [186]. Die dunklen Domänen sind mit Cholesterol angereicherte Phasen, bei denen es sich wahrscheinlich um flüssig-geordnete Phasen handelt (ähnlich wie bei Doppelschichten) oder welche mit Lipidflößen zusammenhängen [59,187]. In einer vereinfachten Ansicht bestehen diese Modellmembranen aus Cholesterol und Phospholipiden (und Sphingomyelin), die man als pseudobinäres System beschreiben kann, wie z. B. von Radhakrishnan *et al.* [58] vorgeschlagen, bei welchen eine Trennung in eine phospholipidreiche und eine cholesterolreiche Mikrophase stattfindet. Um sicherzugehen, dass die dunklen Domänen an Cholesterol angereichert sind, wurde das gleiche Experiment mit einem fluoreszenzmarkierten Cholesterol (TopFluor® Cholesterol) durchgeführt. Das Ergebnis zeigt ein inverses Fluoreszenzbild, das beweist, dass Cholesterol in den dunklen Domänen angereichert ist (siehe Abbildung A8).

Bei einem Cholesterolgehalt von 44% (siehe Abbildung 20) und höher haben die Domänen die Form von „Kreisen in Kreisen“ (zwei nicht mischbare Phasen; größere isolierte kreisförmige Domänen, die mit kleineren kreisförmigen Domänen dispergiert sind; Abbildung 20A-C). Es können helle Kreise in dunklen Kreisen sein oder umgekehrt. Es bilden sich hauptsächlich kreisförmige Domänen, was für flüssig-flüssig-Grenzflächen erwartet wird. Die Krümmung der lateralen Grenzflächen ergibt sich aus der Linienspannung, die als Grenzflächenenergie am Domänenrand beschrieben wird und die Änderungen in Wachstum, Größe und Form von Domänen definiert [188,189]. Der regelmäßige Abstand zwischen hauptsächlich cholesterolreichen Phasen, die mit flüssig-expandierter Phase gefüllt sind, ist auf die dipolare Abstoßung zurückzuführen [112], ähnlich den Gemischen aus Phospholipiden und Cholesterol in einem Molverhältnis von 0,3-0,4 Cholesterol [112,190,191].

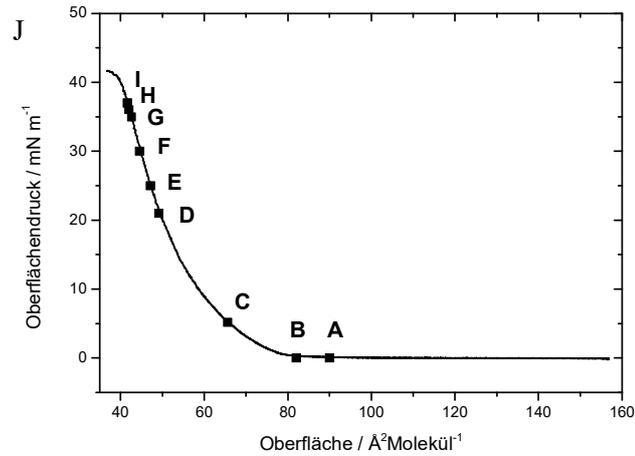
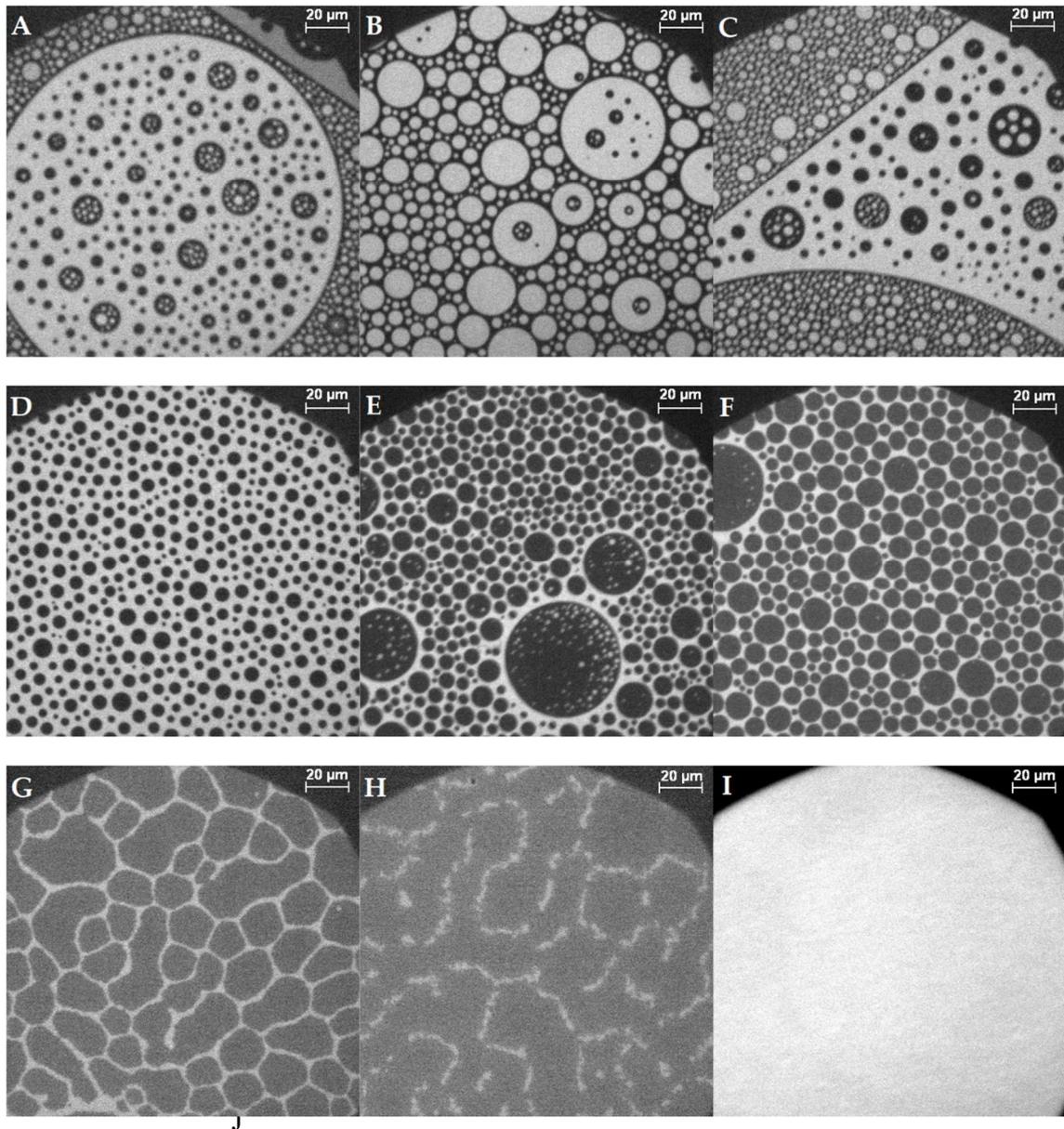


Abbildung 20: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Kompressionsverhaltens der Lipidmonoschicht mit 44% Cholesterol und 0,05 mol-% 1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanol-amin-*N*-(lissamin rhodamin B sulfonyl) (Rh-DHPE) auf einer HEPES-NaCl-Puffer-Subphase bei ca. (A-B) 0 mN/m, (C) 5 mN/m, (D) 21 mN/m, (E) 25 mN/m, (F) 30 mN/m, (G) 35 mN/m, (H) 36 mN/m, und (I) 37 mN/m. Der Maßstabsbalken repräsentiert 20 μm. (J) Kompressionsisotherme.

Kleinere Domänen zeigen eine Brownsche Molekularbewegung und das Domänenverhalten ändert sich aufgrund der Kompression (Abbildung 20B-H). Zunächst werden die Domänen durch Komprimieren der Monoschicht zusammengeschoben, bis zwischen ihnen nur noch eine geringfügige flüssig-expandierte Phase verbleibt (helle Bereiche). Die Verringerung der Linienspannung führt zu kreisförmigen Domänen. Die Tatsache, dass diese einen regelmäßigeren Abstand zueinander einhalten, kann auf abstoßende Wechselwirkungen zwischen ihnen hinweisen [159]. Dann verschmelzen die Domänen mit einer divergierenden Größenverteilung zu Domänen gleichmäßigerer Größe (Abbildung 20F). Wenn eine bestimmte Größe erreicht ist, wachsen die Domänen nicht weiter, sondern werden deformiert. Die scharf abgegrenzten, kreisförmigen, kondensierten Domänen sind weniger regelmäßig geformt, aber immer noch deutlich voneinander getrennt. Zu diesem Zeitpunkt sind in der dunklen kondensierten Phase fast keine hellen Flecken mehr vorhanden. Durch weiteres Komprimieren der Monoschicht lösen sich die Domänengrenzen auf und es entstehen größere kondensierte Bereiche. Die Linien der kondensierten Domänen werden unscharf (Abbildung 20G), und schließlich wandelt sich die Monoschicht in eine homogen gemischte Monoschicht um. Dies führt zu einer plötzlichen Veränderung des Fluoreszenzverhaltens, dem Verschwinden der kondensierten Phase und einem insgesamt grauen, homogenen Bild (Abbildung 20H+I). In anderen Experimenten, z. B. nur mit Phospholipiden, würde 20H einem Zusammenbruch der Monoschicht entsprechen, der normalerweise von einem Abfall des Oberflächendrucks begleitet wird. Dies ist hier nicht der Fall: in den Filmen mit 44%-50% Cholesterol ist kein Hinweis auf die Änderung der Domänen in den Isothermen bei Drücken zwischen 30 und 40 mN/m erkennbar. Der Kollaps der Monoschicht erfolgt nach der Homogenisierung des Fluoreszenzbildes bei Oberflächendrücken von 40-50 mN/m.

Das gleiche Kompressionsverhalten wie Proben mit 44% Cholesterol zeigen Proben mit 50% Cholesterol. Bei 60% und 100% Cholesterol ist bei 20 °C kein finaler Übergang in eine homogene Phase nachweisbar. Bis das Ende der Isotherme erreicht ist bleiben die Domänen getrennt (Anhang A10). Um die Monoschicht mit (nominell) 100% Cholesterol abzubilden, wurden 0,05 mol-% Rh-DHPE hinzugefügt, welches eine endgültige Mischung von 99,95% Cholesterol ergab. Es konnte beobachtet werden, dass PE in einer flüssig-ähnlichen Phase verteilt ist, hauptsächlich außerhalb der dunklen, kondensierten Cholesterolphase oder direkt an der Grenze der Cholesterol-domänen. Dieses Experiment zeigt auch, dass bereits eine sehr geringe Menge Phospholipid zur Domänenbildung führt (siehe Abbildung A9 100%) [192]. Die Gesamtfläche der cholesterolreichen Domänen von Monoschichten mit hohem Cholesterolgehalt ist größer als die bei geringem Cholesterolgehalt. Die Domänengröße ist viel größer als in Proben mit niedrigem Cholesterolanteil und Domänen können sogar die Größe des beobachteten Zielbereiches ($\varnothing = 240 \mu\text{m}$) erreichen. Selbst mit nur 10% Cholesterol in der Membran sind an der Luft/Wasser-Grenzfläche unterschiedliche Domänen sichtbar (siehe Fluoreszenzbilder aller Proben während der Kompression in Anhang A10). Diese Domänen sind jedoch keine „Kreise in Kreisen“, sondern nur dunkle Kreise. Man kann das Verschwinden der Domänen

verfolgen, wenn Fluoreszenzaufnahmen bei unterschiedlichen Drücken in den Isothermen nach dem *lift off* der Isotherme aufgenommen werden.

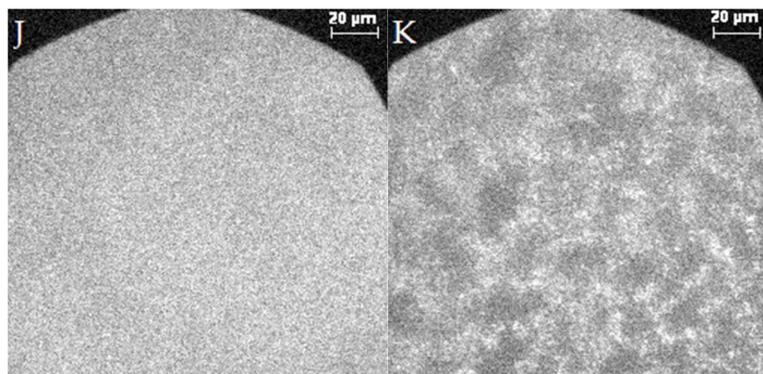
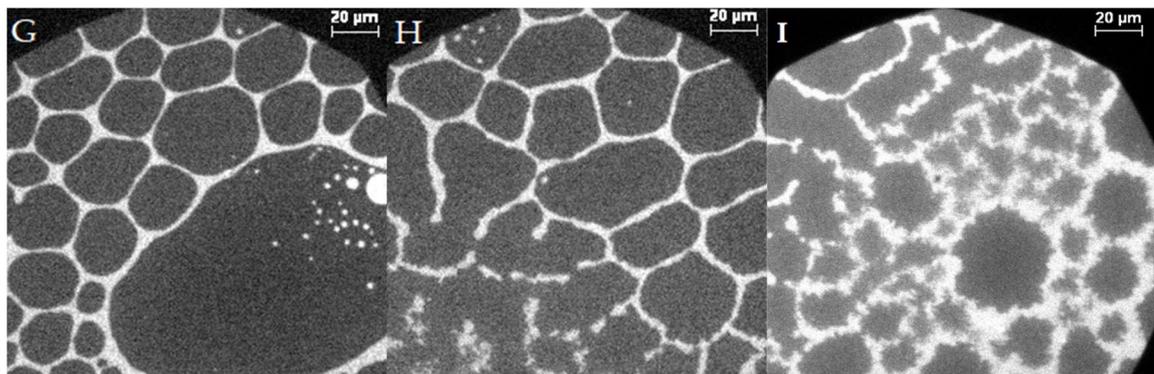
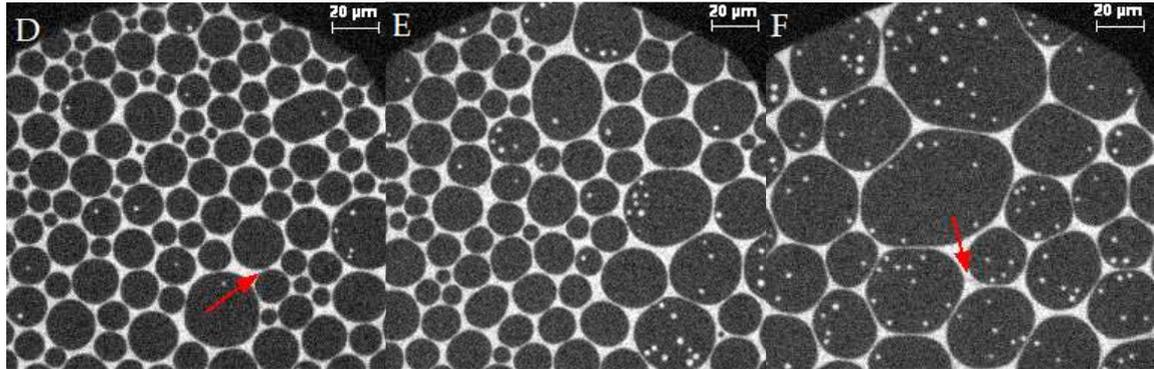
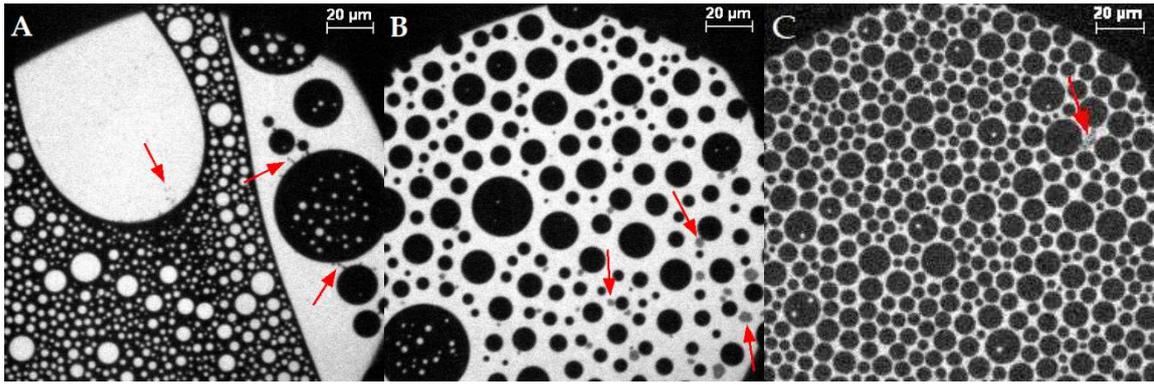
Monoschichten mit bis zu 40% Cholesterol ohne MBP zeigen bereits bei niedrigen Drücken (5-10 mN/m) eine homogen fluoreszierende Grenzfläche (siehe Abbildung A9). Ab einem Cholesterolgehalt von 44% ändert sich Form und Gestalt der Domänen deutlich in Kreise innerhalb von Kreisen und das Verschwinden der Domänen erfolgt bei höheren Oberflächendrücken. Diese Domänenveränderung liegt im selben Cholesterolgehaltbereich wie die aus Abbildung 19 beobachteten Veränderung der Oberflächenwerte.

Darüber hinaus ist es relevant, dass sich in allen Monoschichten Flickenteppiche aus Domänen bilden (siehe Fluoreszenzaufnahmen einer 44%igen Cholesterol-Monoschicht mit einem 20-fachen Vergrößerungsobjektiv anstelle des 50-fachen, Abbildung A11). Die Monoschicht besteht also aus Bereichen, in denen Domänen in einem Verbund auftreten und Bereichen, in denen sich keine oder weniger Domänen bilden. Letztere werden während der Komprimierung des Films kleiner. Dieser Flickenteppich ist jedoch nicht verwunderlich, zieht man in Betracht, dass in Zellmembranen die Verteilung der Lipide bzw. *rafts* auch inhomogen ist [1]. McConnell *et al.* [111] und Keller *et al.* [193–195] beobachteten flüssig-flüssig-Entmischungs-Phasendiagramme für Monoschichten von Phospholipid-Cholesterol-Gemischen. Diese zeigten einen oberen kritischen Entmischungspunkt, der mit dem Verschwinden heller Streifen auf einem dunklen Hintergrund einherging. Aufgrund der inhomogenen Verteilung der Domänen und des begrenzten Beobachtungsbereichs ist es in dieser Studie nicht möglich, das Mischungsverhalten anhand der Fluoreszenzbilder zu quantifizieren. Die Fluoreszenzbilder der Lipidmonoschichten ohne Protein zeigen jedoch auch den allgemeinen Trend, dass mit zunehmendem Cholesterolgehalt mehr cholesterolreiche Domänen gebildet werden (siehe Abbildung A9), die einem höheren Oberflächendruck standhalten (Ende der Phasentrennung bei höheren Oberflächendrücken).

Veränderung des Cholesterolgehaltes mit MBP

Mit der Injektion von bovinem basischem Myelin-Protein unterhalb der Lipidmonoschicht erscheint die Domänenform von „Kreisen in Kreisen“ wie oben beschrieben (ähnlich wie bei McConnell *et al.* [111,112]) in allen Gemischen, selbst bei Proben mit einem niedrigeren Cholesterolgehalt als 44% (Abbildung 21; siehe Vergleich aller Gemische bei 10 mN/m im Anhang, A9). Darüber hinaus wird die von der dunklen, kondensierten Phase eingenommene Fläche mit höherem Cholesterolgehalt in der Lipidmonoschicht größer (siehe Vergleich aller Gemische bei 10 mN/m im Anhang A9). Es ist interessant festzustellen, dass, wenn sich MBP in der Subphase befindet, graue Flecken in den Mikroskopaufnahmen auftreten (Abbildung 21A-B rote Pfeile). Diese Flecken sind ohne MBP nicht sichtbar und weisen stark darauf hin, dass es sich dabei um Wechselwirkungen

von MBP mit der Lipidmonoschicht handelt [37,65]. Die grauen Bereiche befinden sich immer in der Nähe der kondensierten Phase an der Grenzfläche zwischen phospholipidreichen und cholesterolreichen Domänen, wie von Widder *et al.* [37] beschrieben. Der Phasenübergang, der in allen Isothermen der Monoschicht mit MBP beobachtet wird, ist im Allgemeinen ähnlich dem Fall ohne Protein, wie zuvor für 44% Cholesterol beschrieben. Dies spiegelt das von Oliveira *et al.* [159] beschriebene Verhalten wider, dass eine mikroheterogene Oberflächenphase mit unterschiedlichen Zusammensetzungen in Myelinmonoschichten aus ganzem Myelin koexistieren. Das topografische Verhalten wurde dabei in zwei Abschnitte eingeteilt: den ersten bis zu 20 mN/m, der aus meist runden und großen Clustern flüssig-expandierter und cholesterolreicher Phasen besteht, und den zweiten, der das progressive fraktalartige Muster über 20 mN/m beschreibt. Die Domänen haben somit oberhalb von 20 mN/m ihre Form geändert, ähnlich wie dies in der hiesigen Arbeit beobachtet werden kann. Während die Monoschicht komprimiert wird, steigt hier im ersten Bereich der Isotherme mit Protein, unterhalb eines Oberflächendrucks von 20 mN/m, der Oberflächendruck konstant an. Die Domänen werden immer mehr komprimiert (Abbildung 21C). In Region zwei (siehe Abbildung 18) ist von 20 bis 35 mN/m eine leichte Ausbuchtung in der Isotherme sichtbar, die auf den Beginn eines Phasenübergangs oder das Herausdrücken des Proteins hinweist. Diese Änderung des Phasenverhaltens entspricht den Fluoreszenzaufnahmen, die die Verschmelzung von Domänen (Überwindung der Abstoßung) zeigen, bis eine bestimmte Größe erreicht ist und die grauen Flecken, die MBP markieren, verschwinden (Abbildung 21D-E). Oberhalb von ca. 35 mN/m sind keine grauen Bereiche mehr erkennbar. Darüber hinaus verformen sich die Domänenränder von vollständig kreisförmig zu Strukturen mit Rändern, die länglichen, gebogenen Linien ähneln (Abbildung 21F-G). Bei weiterer Komprimierung werden die Ränder wie oben beschrieben unscharf (Abbildung 21H-I), dies wird durch eine schwächere Linienspannung verursacht. Die Entwicklung der mikroskopischen Bilder zeigt deutlich eine Reorganisation des Films aufgrund des Drucks und der Wirkung des Proteins. Diese detailliertere Beobachtung konnte zuvor nicht abgebildet werden. Das Ergebnis untermauert das vorgeschlagene „Herausdrücken“ von MBP aus den Monoschichten bei höheren Oberflächendrücken, in Übereinstimmung mit Rosetti *et al.* [182]. Die Erstellung eines quantitativen Phasendiagramms der kondensierten cholesterolreichen Phase in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt war aufgrund der heterogen verteilten Domänen in Flickenteppiche nicht möglich (siehe Anhang A10).



(Die Abbildung wird auf der nächsten Seite fortgesetzt.)

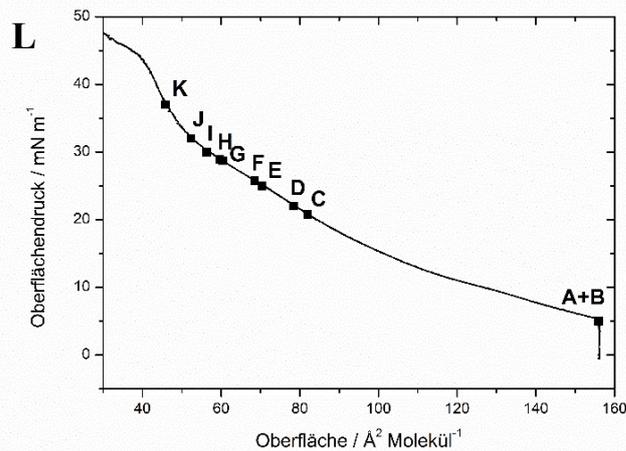


Abbildung 21: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Kompressionsverhaltens der Lipidmonoschicht mit 44% Cholesterol und 0,05 mol-% Rh-DHPE auf einer HEPES-NaCl-Puffer-Subphase nach Injektion von MBP bei ca. (A–B) 5 mN/m [37], (C) 20.8 mN/m, (D) 22 mN/m, (E) 25 mN/m, (F) 25.8 mN/m, (G) 28.7 mN/m, (H) 28.9 mN/m, (I) 30 mN/m, (J) 32 mN/m, und (K) 37 mN/m. Rote Pfeile markieren Regionen mit MBP-Adsorption. Der Maßstabsbalken repräsentiert 20 μm . (L) Kompressionsisotherme.

Cholesterol ist bekannt dafür, dass es Monoschichten stabilisiert und verdichtet [196,197]. Dies kann auch in dieser Studie beobachtet werden: Aufgrund eines höheren Gehalts an kondensierten Domänen, die aus einer höheren Menge an Cholesterol stammen, kann die Lipidmonoschicht zu kleineren Oberflächen komprimiert werden. Cholesterol hat einen fast vernachlässigbaren Einfluss auf die elektrostatischen Wechselwirkungen mit dem Protein [37]. Vergleicht man die experimentellen Ergebnisse von Lipidmonoschichten mit 10% und 44% Cholesterol, stellt man fest, dass sich MBP im ersteren Fall „anders“ in die Monoschicht einfügt. Dies bedeutet, dass mit gleicher Menge an MBP bei größeren Oberflächen hohe Oberflächendrücke erreicht werden (Abbildung 18, schwarz und magenta). Dies könnte bedeuten, dass mehr MBP eingebaut wird oder die Art des Einbaus von MBP in die Monoschicht anders ist. Bei niedrigem Cholesterolgehalt sind die attraktiven Kräfte der Monoschicht geringer, obwohl an der Wasseroberfläche mehr Platz zur Verfügung steht. Dies ist auf eine höhere Menge der geladenen Lipide PS und PI zurückzuführen, die den stärksten Einfluss auf MBP haben und zu elektrostatischen Wechselwirkungen führen [37,198,199]. Dies resultiert in einer durch das positiv geladene MBP induzierten Lipidkondensation und folglich zu einer geringeren Fließfähigkeit [200] der Monoschicht, was zu einem früheren Zusammenbruch der Monoschicht sowie zu einer Phasenumwandlung führt. Der abschirmende Einfluss von PE und PC [37] ist vernachlässigbar, da das Verhältnis aller Lipide in der Mischung (außer Cholesterol) gleich ist und somit die Wechselwirkungen zwischen PE, PS, PC und PI (und möglicherweise auch SM) qualitativ und quantitativ ähnlich sind. Mit 44% Cholesterol in der Monoschicht gibt es schlichtweg einen geringeren Anteil an geladenen Lipiden und somit wird zusammen mit den cholesterolreichen Regionen die reine elektrostatische Wechselwirkung zwischen der Lipidmonoschicht und MBP verringert. Der Bindungs-/Inkorporationsmodus scheint sich jedoch zu ändern, da MBP, wie in den

fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zu sehen ist und wie bereits bei Widder *et al.* [37] berichtet wurde, sich nun vor allem an der Grenzregion von cholesterol- und phospholipidreicher Regionen einzubauen scheint. Infolge des hohen Cholesterolgehalts wird die nicht besetzte, freie Oberfläche für die flüssig-expandierte Phase verringert, aber die Stabilität (höhere Ordnung, attraktivere Kräfte) der Monoschicht wird erhöht, wie dies in Druckisothermen und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen beobachtet werden kann. Eine Zunahme der Gesamtverdichtung, obwohl es mehr kondensierte Domänen gibt, ist auf die höhere Ordnung und die optimierte Oberflächenfüllung in der kondensierten Phase zurückzuführen. Die flüssig-expandierte Phase ist lockerer gepackt und Lipide haben mehr Bewegungsfreiheit. Daher sind die Acylketten möglicherweise nicht ausgerichtet und nehmen im Durchschnitt größere Flächen pro Molekül ein. Die Ergebnisse von Lipidmonoschichten mit 50% und 60% Cholesterol, die mit MBP interagieren, zeigen keine signifikante Verbesserung der Monoschichtstabilität im Vergleich zum nativen Gehalt von 44%. Diese 44% Cholesterol in der Lipidmonoschicht scheinen den besten Kompromiss zwischen einerseits guter Wechselwirkung mit MBP und Fluidität und andererseits vermutlich Monoschichtstabilität zu markieren. Wie Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen geschildert, stabilisiert MBP zusätzlich die cholesterolreichen Domänen der Monoschicht.

3.1.3 Schlussfolgerung

Das Gesamtverhalten der Monoschichten in Präsenz und Abwesenheit von MBP ist identisch: Mit zunehmendem Cholesterolgehalt wird die Oberfläche pro Molekül zu geringeren Werten verschoben, da die Anzahl der mit Cholesterol angereicherten, kondensierten Domänen zunimmt. Daher ist die Packung der Monoschicht geordneter und die Oberfläche kann weiter komprimiert werden. Wenn die Monoschicht einer einzelnen Lipidmischung komprimiert und damit der Oberflächendruck erhöht wird, ändern Domänen ihre Form von kreisförmig in einen unscharfen Zustand, dann in Streifen und schließlich in eine homogen gemischte Monoschicht.

Wenn MBP hinzugefügt wird, zeigen alle Mischungen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt Domänen von „Kreisen in Kreisen“, jetzt in Kombination mit grauen Flecken, auf. Diese können als Cluster von MBP identifiziert werden, die mit der Monoschicht interagieren [37]. Darüber hinaus wird die Existenz dieser favorisierten Wechselwirkung durch den Unterschied der mittleren Molekülfläche von Monoschichten mit und ohne MBP bei 20 mN/m belegt (Abbildung 19a), der einen Unterschied von ungefähr $41 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$ zeigt. Bei 35 mN/m ist der Unterschied jedoch nahezu vernachlässigbar, was bedeutet, dass sich die Kompressionsisothermen mit Protein bei hohen Oberflächendrücken so verhalten, als ob sich kein Protein in der Umgebung befindet. Dies verbietet keine Wechselwirkung von MBP mit Lipiden, deutet jedoch auf

einen geringeren Einfluss von MBP auf die Ordnung der Monoschicht hin, da das MBP seine Verbundenheit mit dem Oberflächendruck ändern und daher möglicherweise nur lose gebunden sein könnte. Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen auch das Verschwinden der grauen Flecken bei höheren Oberflächendrücken zwischen 20 und 35 mN/m. Als Fazit wird ein „Herausdrücken“ in dem spezifischen Druckbereich vorgeschlagen, in dem eine leichte Ausbuchtung in der Kompressionsisotherme sichtbar ist. Dies bedeutet, dass es einen maximalen Druck gibt, bei dem die Wechselwirkung zwischen Lipiden und Protein am effizientesten ist. Danach reorganisiert sich das Protein in seiner Konformation und Wechselwirkung, um den angelegten Stress zu überwinden. Die Monoschichten mit 44% Cholesterolgehalt und MBP stellen die stabilsten Monoschichten dar und weisen die größte Verbesserung der Stabilität bei normalen Membranoberflächendrücken von 35 mN/m im Vergleich zu den Monoschichten mit nur Phospholipiden auf. Dies ist ein klares Zeichen dafür, dass die Zusammensetzung der Monoschicht sehr wichtig ist und die Variation auch nur einer Komponente einen großen Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen der Lipidmonoschicht und dem basischen Myelin-Protein hat.

Zusammenfassend haben die Ergebnisse gezeigt, dass eine Menge von 44% Cholesterol in der nativen Lipidmonoschicht einen signifikanten Einfluss auf das Verhalten der Kompressionsisotherme hat. Hierbei zeigt die Isotherme mit 44% Cholesterolgehalt das einzigartige Verhalten (im Vergleich zu den anderen Gemischen ohne MBP), dass diese bei niedrigeren Oberflächendrücken dem Kompressionstrend von niedrigerem Cholesterolgehalt folgt (30% –35%) und bei höheren Oberflächendrücken sind die Oberflächen mit denen von 50% –60% Cholesterolgehalt vergleichbar. Dieser Einfluss ist auch in Fluoreszenzaufnahmen mit farbstoffmarkiertem PE deutlich sichtbar ist, da in den Monoschichten ohne Protein plötzlich „Kreise in Kreisen“ auftreten. Bei höheren Oberflächendrücken bewirkt die Monoschicht mit 44% Cholesterol eine zunehmende Kondensationswirkung und scheint eine thermodynamisch stabilere Monoschicht zu bilden. Die Mischung mit 44% Cholesterol kombiniert den höchsten Kondensationseffekt (vermutlich korrelierend mit einer guten Verdichtung und Stabilität) und eine optimale Proteinwechselwirkung.

Alles in allem besteht eindeutig eine Wechselwirkung zwischen der Lipidmonoschicht und MBP, was durch die unterschiedlichen Effekte, die in den Druck/Flächen-Isothermen mit und ohne Protein aufgezeichnet wurden, analysiert werden kann. Dies spiegelt sich in dem unterschiedlichen Kurvenverhalten und der Änderung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wider, insbesondere im Auftreten der grauen Flecken von aggregiertem MBP. Es sollte bedacht werden, dass die Lipidmonoschicht nicht unbedingt den natürlichen Zustand des gesamten Myelins darstellt, da sie nur eine halbe Doppelschicht darstellt. Da Oliveira *et al.* [159] ein ähnliches Verhalten im gesamten Myelin berichtet haben, zeigen die Ergebnisse, dass das Monoschichtmodell, das nur mit den ausgewählten Lipiden und MBP verwendet wurde, eine robuste Nachahmung und ein nahezu minimales System für das gesamte Myelin in Bezug auf das Gesamtverhalten der

Lipidschicht und MBP-Wechselwirkung zu sein scheint. Da das verwendete Monoschichtmodell simpler und einfacher zu handhaben ist und in zukünftigen Arbeiten für Änderungen einzelner Komponenten und anderer Proteine genauer hergestellt werden kann, hat es den Vorteil, dass die im gesamten Myelin beobachteten Eigenschaften reproduziert werden. Es ist immer noch ausreichend komplex, so dass das MBP die Grundstruktur seiner natürlichen Umgebung hat, die nicht mit einem System aus einem oder zwei Lipidsorten in der Monoschicht gegeben ist. Trotzdem sollte das Monoschichtmodell dieser Studie verbessert werden, um sich physiologischeren Bedingungen zu nähern, z. B. durch Einstellen des Salzgehalts [201,202].

3.2 Untersuchungen an Lipiddoppelschichten

In den vorherigen Kapiteln wurde der Einfluss des Cholesterolgehaltes auf Monoschichten mit einer myelinartigen Zusammensetzung untersucht und wie diese Veränderung das Bindungsverhalten von MBP beeinflusst. In einem weiteren Schritt werden nun Modell-Membran-Systeme basierend auf einer Lipiddoppelschicht betrachtet. Lipiddoppelschichten (*bilayer*) bestehen, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, aus zwei sich an den Kohlenwasserstoffketten gegenüberliegenden Monoschichten. Die Stoffklasse und Kombination der Lipide bestimmt dabei die resultierende Form/Struktur.

In mehreren Studien wurde der Klebeeffekt von MBP auf Modellmembranen mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) aufgezeigt. [22,44,45,203] Für in vitro Untersuchungen wurden sogenannte multilamellare Vesikel (MLVs; *multilamellar vesicles*) mit Myelinlipidextrakten oder analogen Lipidzusammensetzungen (aus einzelnen Lipiden) verwendet. MLVs sind Vesikel, die nicht nur eine einzelne Lipiddoppelschicht, sondern mehrere Schichten aufweisen und somit die gestapelte Lipidmembran in der Myelinscheide imitieren. Die Lipidzusammensetzungen variieren von einem ausgewählten Lipid wie PC [204] über zwei oder drei Hauptlipide der zytoplasmatischen Myelin-Membran [203,205] bis zur vollständigen Extraktzusammensetzung [22,45,206]. MLVs stellen neben *nanodiscs*[207] das Modellsystem dar, das der natürlichen Struktur der Myelinscheide am nächsten kommt. Multilamellare Vesikel werden verwendet, da die Myelinscheide aus gestapelten Doppelschichten besteht, die um das Axon gewickelt sind (siehe Abbildung 3) und da hauptsächlich MBP diese Doppelschichten (neben PLP, MOBP und OSP im ZNS [34]) zusammenhält [22]. Um eine differenziertere Sicht auf die untersuchten Modellmembranen zu erhalten, lohnt es sich jedoch einen Blick auf vereinfachte Modellsysteme (wie schon in Kapitel 2.2 gezeigt) zu werfen. Im Fall von MBP, welches kein Transmembranprotein ist, sollte die Vereinfachung einen geringen Einfluss auf die Lipid-Protein-Wechselwirkungen haben. Daher wäre es einfacher, die Wechselwirkungen von nur einer einzelnen Lipiddoppelschicht anstelle von vielen zu

beobachten. Dies kann durch die Verwendung von großen unilamellaren Vesikeln (LUVs; *large unilamellar vesicles*) erreicht werden.

Im Folgenden werden stets LUVs verwendet, die definiert sind als Vesikel-Strukturen, welche mit einem Durchmesser von 100-250 nm nur eine Lipiddoppelschicht besitzen. Diese stellen, im Vergleich zu den bisher untersuchten Monoschichten, ein komplexeres System dar und repräsentieren besser den Aufbau der natürlichen Myelinmembran. Im Gegensatz zu planaren Monoschichten, müssen für die Charakterisierung der LUVs zusätzlich unter anderem der Durchmesser der Vesikel, die Krümmung der äußeren und inneren Schale und Effekte zwischen den einzelnen Lipidschichten (z. B. *flip-flops*) mit einbezogen werden. Alle LUVs in dieser Arbeit wurden nach dem Quell-Prinzip hergestellt und anschließend auf eine einheitliche Größe (100 nm) extrudiert, wie in Kapitel 4.4 beschrieben. Für die jeweilige Messmethode und experimentelle Serie wurde ihre Konzentration und/oder Zusammensetzung angepasst.

3.2.1 Einfluss des Cholesterolgehaltes in myelinartigen LUVs auf die Interaktion mit MBP

Als Weiterführung der Experimente mit Lipidmonoschichten (siehe Kapitel 3.1), wurde die Abhängigkeit der MBP-Lipid-Interaktion vom Cholesterolgehalt in LUVs untersucht. Entscheidend für die gewählte Lipidzusammensetzung war, dass MBP spezifisch mit der zytoplasmatischen Seite interagiert und nicht sehr tief in die Lipidmembran eindringt. Die hier verwendete Lipid-Zusammensetzung ist daher angelehnt an die Komposition der zytoplasmatischen Seite der Myelinmembran und besteht aus Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin (PE), Sphingomyelin (SM) und Phosphatidylinositol (PI) im molaren Verhältnis von 11:13:27:3:2 [68]. In den vorherigen Kapiteln wurde gezeigt, dass diese Zusammensetzung in Experimenten mit Monoschichten die Ergebnisse von Monoschichten mit ganzem Myelin im Gesamtverhalten nachahmt [208]. Da reines Cholesterol keine Doppelschichten ausbildet, wurde für die folgenden Versuchsreihen der Gehalt an Cholesterol zwischen 0% und 60% systematisch variiert (bei gleichbleibender Gesamtlipidmenge). Die Messungen wurden anschließend in Kombination mit MBP wiederholt. Die Vesikel wurden mittels Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie, Dynamischer Lichtstreuung, Elektrophoretische Lichtstreuung und Elektronenspinresonanz-Spektroskopie untersucht.

3.2.1.1 Visualisierung des Einflusses des Cholesterolgehaltes mittels Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie

Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM) erlaubt die Untersuchung von Proben, welche eine wässrige Umgebung benötigen, um sich zu bilden und zu persistieren, allerdings auf Trocknungs- oder Färbeverfahren sensibel reagieren. Die sehr schnelle Vitrifikation der Probe und Messung bei Temperaturen von flüssigem Stickstoff ermöglicht die Beobachtung ohne Dehydratisierung, Kristallisation und Reorganisation der Probe. [158] Das ermöglicht das Vermessen von Proben basierend auf amphiphilen Molekülen (insbesondere Vesikel) und Proteinen.

Kryo-TEM wurde in dieser Studie verwendet, da Experimente mit Färbung verzerrte und unscharfe Bilder zeigten, wie dies auch in anderen Vesikelstudien zu sehen war [209]. LUVs mit einem Cholesterolgehalt von 20%, 44% und 60% wurden hergestellt (wobei das Molverhältnis der anderen Lipide konstant gehalten wurde; PC/PS/PE/SM/PI 11:13:27:3:2) und in Präsenz und Abwesenheit von MBP (Lipid/Protein-Verhältnis 567:1 [36]) untersucht. Die Cholesterolmengen von 20% (Beispiel aus dem niedrigen Prozentbereich) und 60% (Höchstwert) wurden ausgewählt, um einen Überblick zu erhalten, was geschieht, wenn der natürliche Gehalt von 44% erhöht oder verringert wird.

In Abbildung 22 (Zeile 1) sind die Kryo-TEM-Aufnahmen von LUVs ohne MBP dargestellt. Unabhängig vom Cholesterolgehalt sind die LUVs klar voneinander getrennt und haben eine runde Form. Neben vereinzelt bi- oder multilamellaren Vesikeln präsentieren die Kryo-TEM Aufnahmen eine Vielzahl an unilamellaren Vesikeln. Diese Erkenntnis korreliert mit den später diskutierten DLS-Daten (siehe Kapitel 3.2.1.2). Shaharabani *et al.* [44,45] haben mittels SAXS und Kryo-TEM gezeigt, dass selbst ohne MBP Unterschiede in MLVs mit einer Lipidzusammensetzung ähnlich der von Menschen mit und ohne MS-Erkrankung bestehen. In MLVs mit einer Lipidzusammensetzung von Erkrankten (hier vergleichbar mit 60% Cholesterolgehalt) konnte eine starke Veränderung der Membran-Krümmung festgestellt werden. In der invertierten hexagonalen Phase, die mit der lamellaren koexistiert, wellt sich die Membran mit großer lokaler Krümmung. Da solch eine Krümmung hier nicht zu beobachten ist, scheint diese Phasenumwandlung erst in multilamellaren Systemen hervortreten oder ist auf die leicht andere Lipidzusammensetzung (zusätzlich PI) zurück zu führen. In der selben Studie wurde ebenfalls der SM- und PC-Gehalt verändert und zeigte bei bestimmten Kombinationen bzw. bei der Veränderung des SM-Gehalts um 1 mol-%, dass keine hexagonale Phase ausgebildet wird [44]. Außerdem wurden ein anderes Puffer-System (MOPS, hier HEPES) und viel größere Salzkonzentrationen (150 mM, hier 10 mM) verwendet. Der Unterschied im Puffer-System ist hier vernachlässigbar, jedoch zeigten vorhergehende Studien einen Einfluss der Salzkonzentration auf das Organisationsverhalten der Lipide [45].

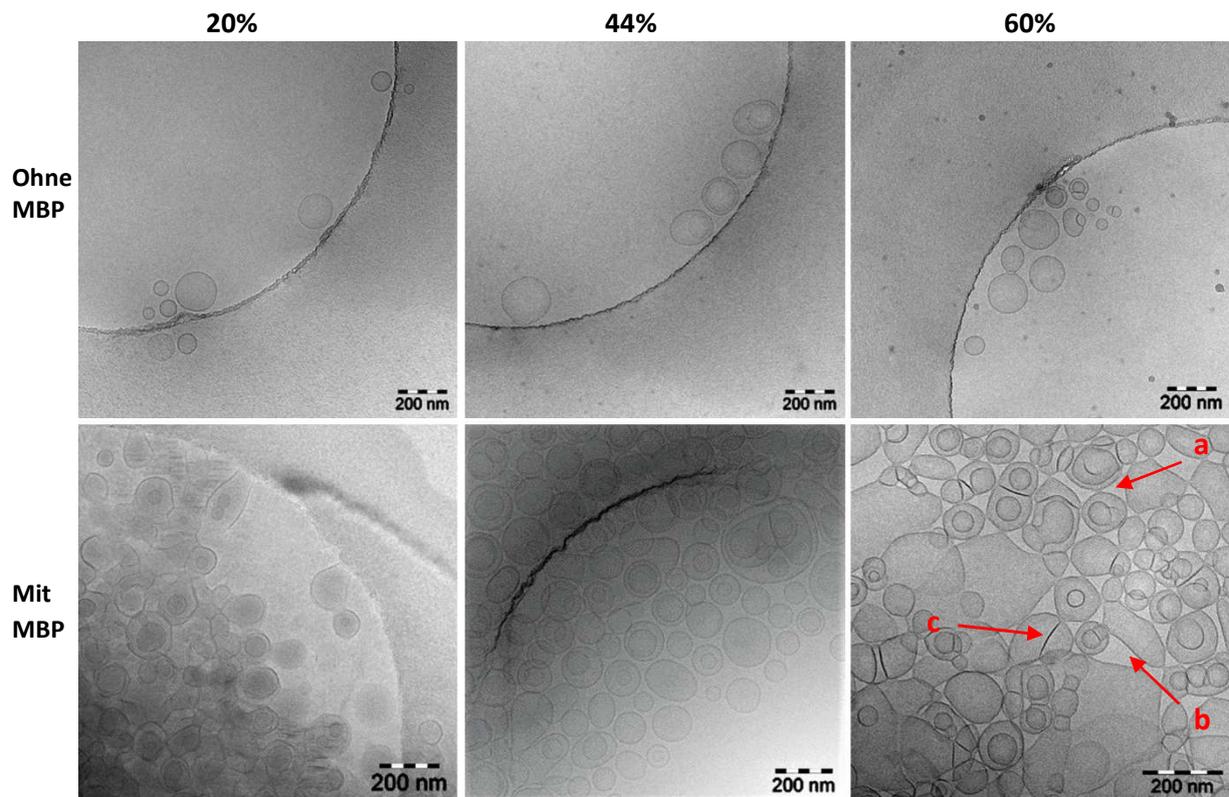


Abbildung 22: Kryo-TEM-Aufnahmen von Vesikeln mit 20% (links), 44% (Mitte) und 60% (rechts) Cholesterolgehalt ohne und mit MBP in HEPES-NaCl-Puffer. Die Präparation der Proben wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die roten Pfeile markieren Bereiche mit besonderen Merkmalen, deren genauere Erläuterung sich im Text findet.

Bei Betrachtung der TEM-Aufnahmen mit MBP ist ein deutlicher Unterschied erkennbar (Abbildung 22 Zeile 2, siehe auch vergrößerte Ansicht in A13). Die Vesikel kleben zusammen und bilden unabhängig vom Cholesterolgehalt größere Aggregate. Bei näherer Betrachtung erkennt man jedoch einen Einfluss des Cholesterolgehaltes auf die Form und den Membranabstand zwischen den LUVs. Bei einem Cholesterolgehalt von 20% in den LUVs (Abbildung 22 links) kann eine starke Deformation der runden Form beobachtet werden, um die maximale Kontaktfläche zwischen zwei gegenüberliegenden Vesikeln zu erreichen. Es scheint, dass zwischen den Vesikeln kein freier Bereich erkennbar ist. MBP zieht zwei Membranen so zusammen, dass nur ein minimaler Abstand zwischen ihnen besteht, wodurch wahrscheinlich die dazwischenliegende Wasserfläche reduziert wird. Diese Verformung ist möglich, weil in der Doppelschicht weniger Cholesterol vorhanden ist. Cholesterol ist im Allgemeinen nicht notwendig für die Interaktion mit MBP, jedoch ist die durch Cholesterol induzierte verringerte Fluidität der Membran von großer Bedeutung für die Schichtbildung im Myelin [22,210]. Ein höherer Cholesterolgehalt führt zu einer steiferen Membran, da mehr mit Cholesterol angereicherte Bereiche (*rafts*) vorhanden sind [211]. Diese sind durch eine höhere lokale Ordnung und damit mit einem Mobilitätsverlust, im Vergleich zu den umgebenden mit Phospholipid angereicherten

Bereichen, definiert. Ein verringerter Cholesterolgehalt gibt der Membran die Möglichkeit, sich leichter zu verformen, da die Menge an mit Phospholipid angereicherten und flexibleren Bereichen größer ist. Zudem ist der Anteil an negativ geladenen Lipiden höher, damit stehen MBP mehr Interaktionsstellen zur Verfügung. In Bezug auf die Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose, bei der Beeinträchtigungen der Signalübertragung bekannt sind, könnte ein fehlender Cholesterolgehalt von 24% solche Symptome wie den Verlust der motorischen und sensorischen Fähigkeiten erklären. Für eine gute Signalübertragung ist ein homogener und dicht gepackter Myelinmantel erforderlich. Membransysteme mit nur 20% Cholesterol erfüllen jedoch nicht die Schichtungsanforderungen für solch einen Myelinmantel aufgrund der fehlenden Form und Stabilität (in Form der Steifheit/Fluidität) innerhalb der Lipiddoppelschicht.

Bei den Experimenten mit einem Cholesterolgehalt von 60% (Abbildung 22 rechts) zeigen sich Analogien zu den zuvor besprochenen Proben mit 20%. Gemeinsam ist ihnen, dass sich Kontaktflächen zwischen gegenüberliegenden Vesikeln ausbilden. Die Anzahl dieser Kontaktbereiche ist geringer als bei einem Cholesterolgehalt von 20%, punktueller und erstreckt sich nicht über einen langen Bereich (Pfeil a). Eine Verformung der Vesikel ist auch bei 60% Cholesterolgehalt sichtbar, jedoch weniger stark ausgebildet als für die 20%-Proben. Der Effekt einer verringerten Kontaktfläche könnte auf die reduzierte Anzahl negativ geladener Lipide zurückzuführen sein. Größere Abstände zwischen benachbarten Vesikeln konnten ebenfalls beobachtet werden (Pfeil b). Zusätzlich werden Bereiche mit einer höheren Elektronendichte aufgezeichnet, die durch dunklere Schattierungen in den Bildern sichtbar sind (Pfeil c). Diese Bereiche mit höherer Dichte bilden sich immer zwischen Vesikeln, die sich berühren und eine nahezu lineare Membran bilden. Es scheint auch, dass die Dicke dieser Bereiche dünner ist als zwei Doppelschichten, die miteinander in Kontakt stehen. Aufgrund der Tatsache, dass in Regionen mit höherer Dichte fast keine Krümmung beobachtet wird und der Rest des Vesikels eine normale Krümmung aufweist, wird vermutet, dass diese Regionen einen hohen Cholesterolgehalt aufweisen. Das überschüssige Cholesterol akkumuliert und bildet daher eine sehr starre Doppelschicht mit sehr geringer Flexibilität aus. Diese Cholesterol-Doppelschichten könnten die von Subczynski *et al.* [62] etablierten Cholesterol-Doppelschicht-Domänen (CBD) sein, eine reine, transmembrane Cholesterol-Doppelschicht ohne Phospholipide. Diese bilden sich bei hohen Cholesterolgehalten über 50% (in Proben einer Lipidart) aus. Raguz *et al.* [212] beobachteten, dass bei einem Mischungsverhältnis von mehr als 2,5 von Cholesterol:Phospholipiden neben der Koexistenz beider Moleküle die CBDs als zweite Domäne erscheinen. In den getesteten Lipidmischungen bleibt dieses Verhältnis unter 1,5. Berücksichtigt man jedoch die Verwendung einer viel komplexeren Lipidzusammensetzung, könnte das die Bildung von CBDs begünstigen. Die Frage ist dann, warum diese Bereiche in den Aufnahmen ohne MBP nicht zu beobachten sind und warum es scheint, als ob diese zusammengeklebten Vesikel mit nur einer Doppelschicht in Erscheinung treten.

Insgesamt existieren für LUVs mit einem Cholesterolgehalt von 60%, die mit MBP interagieren, drei verschiedene Formen an interagierenden Doppelschichten: punktueller Kontakt, größere Distanzierung und Kontakt mit höherer Dichte. Tatsächlich besteht im Membranmodell der induzierten entzündlichen Erkrankung experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) ein höherer Cholesterolgehalt [66,67]. Dieses Tiermodell für MS ist weit verbreitet, da es viele Ähnlichkeiten mit MS in späteren Stadien bei Menschen aufweist. Es wurde gezeigt, dass Multischichten der EAE-Zusammensetzung keine homogene Schichtung bilden [44] und eine Koexistenz von lamellaren und invertiert hexagonalen Phasen vorliegt [45] (hier nicht beobachtbar). Die erkrankte Membran (hier stellvertretend mit einem Cholesterolgehalt von 60%) würde aufgrund der Unterschiede in der Dichte und damit auch in der Dicke keinen konstanten Myelinmantel bilden. Daraus resultieren Aufnahmen ähnlich zu der Studie von Shaharabani *et al.* [44]. Dort wurde aus der wellenartigen Deformation der Membran (in vitro als auch in vivo) auf ein spontanes Induzieren von Poren geschlossen. Diese Poren führen zu einer Anfälligkeit der Membran von Angriffen des Immunsystems [45]. Da zwischen der Myelinmembran um das Axon kein konstanter Abstand besteht, würde die Signalübertragung nicht richtig funktionieren und in klassischer Folge von MS, wie Verlust der motorischen und sensorischen Fähigkeiten resultieren.

LUVs mit 44% Cholesterol (natürliche Cholesterolmenge), die mit MBP interagieren und mit Kryo-TEM untersucht wurden (Abbildung 22 Mitte), führen im Vergleich zu LUVs mit 20% oder 60% Cholesterol zu einem insgesamt unterschiedlichen Adhäsionsverhalten. Die LUVs sind kreisförmig, ähnlich wie die LUVs ohne MBP und der Abstand zwischen ihnen ist als fast regelmäßig zu betrachten. Zudem existieren keine Kontaktflächen und keine Verformungen der Membran, wie dies bei einem Cholesterolgehalt von 20% und 60% der Fall ist. Wie in der Monoschichtstudie [208] im vorherigen Kapitel 3.1 gezeigt, präsentiert der Cholesterolgehalt von 44% ein differenziertes Verhalten im Vergleich zu den anderen getesteten Mischungen. Die natürliche Zusammensetzung kombiniert eine (vermutlich) thermodynamische Stabilität mit einer optimalen Proteinwechselwirkung, was hier in einem makroskopischeren Maßstab zu einer geordneteren Adhäsion der Vesikel führt. Diese Regelmäßigkeit in Form und Abstand ist eine gute Voraussetzung für eine homogene Schichtung der Myelinscheide, wie sie für ein gesundes Gehirngewebe erforderlich ist.

Mit einer Veränderung des Cholesterolgehaltes wird die Natur der Vesikel so stark modifiziert, dass keine homogene Adhäsion erreicht werden kann. Nur bei einem Cholesterolgehalt von 44% kann die "geordnete" Bindung der Vesikel eine Grundlage für eine homogene Schichtung der Myelinscheide bieten.

3.2.1.2 Auswirkungen des Cholesterolgehaltes auf Partikelgröße und -verteilung (dynamische Lichtstreuung)

Experimente zur dynamischen Lichtstreuung wurden durchgeführt, um die Größe und Form der Kryo-TEM-Messungen zu überprüfen und das Aggregationsverhalten zu beobachten.

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) ist eine nicht-invasive Technik zur Messung der Größe von Partikeln und Molekülen in Suspension. [115] Die Technik der dynamischen Lichtstreuung misst die Geschwindigkeit von Partikeln, die einer Brownschen Molekularbewegung unterliegen und ist abhängig von Partikelgröße, Temperatur und Viskosität der Probe. Der hydrodynamische Durchmesser hängt von der Größe des Partikelkerns und der Struktur seiner Oberfläche sowie den umgebenden Ionen ab. Im Weiteren wurden jeweils die Maxima der Verteilungen des hydrodynamischen Durchmessers verglichen. Hier wurde ein Puffer aus HEPES und Natriumchlorid mit einer Ionenstärke von 18 mM verwendet.

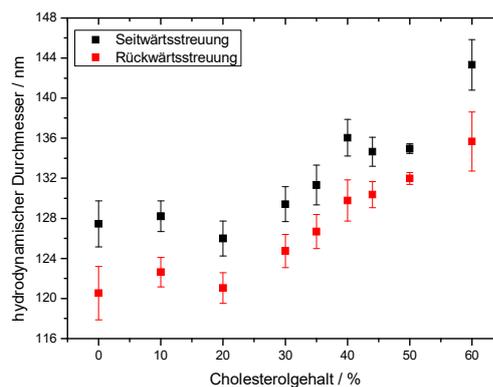


Abbildung 23. Hydrodynamischer Durchmesser von LUVs in einem HEPES-NaCl-Puffer in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt, erhalten durch dynamische Lichtstreuung mit Streuwinkeln von 90° und 175° (intensitätsgewichtet). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts von drei Messungen.

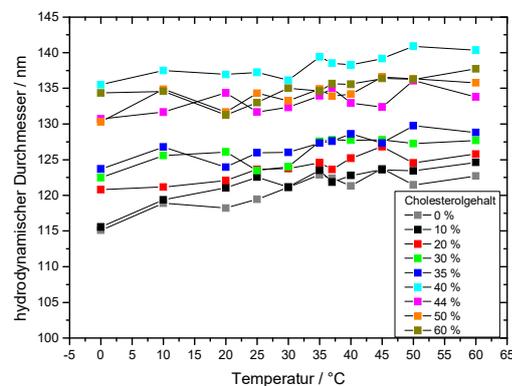


Abbildung 24. Temperaturreihen des hydrodynamischen Durchmessers von LUVs mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt. Erhalten wurden diese durch dynamische Lichtstreuung mit einem Streuwinkel von 90° (intensitätsgewichtet) in einem Temperaturbereich von 0-60 °C in einem HEPES-NaCl-Puffer.

Zur Charakterisierung der Größe und Partikelform wurden Messungen bei Raumtemperatur (20 °C) für zwei verschiedene Streuwinkel durchgeführt: 90° (Seitwärtsstreuung) und 175° (Rückwärtsstreuung). Für die LUVs ohne MBP ergaben sich enge monomodale Größenverteilungen (Polydispersitätsindex (PDI) < 12%, Transmission > 80%, siehe Anhang A14) mit gemittelten hydrodynamischen Teilchendurchmessern von 126,0 nm ± 2,5 nm für beide Winkel und alle Gemische (Abbildung 23). Dies zeigt, dass die Partikel unabhängig vom Cholesterolgehalt sphärisch sind, wie von extrudierten Vesikeln und den bereits gezeigten Kryo-TEM-Daten zu erwarten. Aufgrund der vorhandenen Größenverteilung sind die kleineren Vesikel, die in den Kryo-TEM-Aufnahmen von 20% und 60% zu sehen sind, zuordenbar. Ein kleiner Größenanstieg ist bei beiden Streuwinkeln ab einem Cholesterolgehalt von 30% zu erkennen. Durch die Zugabe von mehr Cholesterol werden die Kopfgruppen der Phospholipide stärker voneinander getrennt [213,214]. Dies könnte zu einem höheren Gehalt an eingebautem Wasser in LUVs mit höherem Cholesterolgehalt führen und die LUVs anschwellen lassen. Hervorgerufen wird dies durch Packungsdefekte im Kettenbereich, die freien Raum schaffen, in den die umgebenden Wassermoleküle eindringen können. Dadurch benötigen die Lipide mehr Platz und erweitern den Vesikeldurchmesser, was auch mit den breiteren Verteilungspeaks bei höheren Cholesterolgehalten (A14a) übereinstimmt.

Um zu überprüfen, wie viele LUVs die mittlere Größe von 126 nm haben, wurden die DLS-Daten anzahlgewichtet analysiert und bestätigen, dass alle LUV-Gemische hauptsächlich Partikel der Größe des hydrodynamischen Durchmessers (Anhang A14b) enthalten. Zusätzlich wurden Temperaturreihen jeder LUV-Mischung mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt mit einem Temperaturbereich von 0 °C bis 60 °C und einem Seitwärtsstreuungswinkel durchgeführt. Abbildung 24 zeigt den hydrodynamischen Durchmesser in Abhängigkeit von der Temperatur. Im Allgemeinen gibt es unabhängig vom Cholesterolgehalt einen kleinen Anstieg des Durchmessers von ungefähr 6 nm mit steigender Temperatur. Dies könnte mit der temperaturinduzierten Quellung der Vesikel zusammenhängen, da die Lipide sich mit steigender Temperatur von einer kristallinen Phase in eine gelartige und dann in eine flüssige Phase umwandeln. Diese Phasenumwandlungen korrelieren mit einer Veränderung der Konformation der Alkylketten von *all trans* zu hauptsächlich *trans* und dann in die *gauche* Konformation, bei der die Lipide größere Flächen einnehmen, aufgrund der Veränderung im Lipid-Packungsparameter (das Verhältnis zwischen der Kopfgruppengröße und der projizierten Kohlenwasserstoffkettenfläche) [1,49,215].

Die Temperatur hat zusätzlich einen Effekt auf die intermolekularen Kräfte zwischen den Wassermolekülen. Dies wiederum verändert deren effektiven hydrophoben Wechselwirkungen und damit die Wasserschicht-Ordnung in der Nähe der Lipiddoppelschicht [216]. Es kann beobachtet werden, dass es leichte Größenunterschiede in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt gibt, wie bereits in

Abbildung 23 festgestellt. LUVs, die 40%, 44%, 50% und 60% Cholesterol enthalten, weisen größere Durchmessern von ca. 130-140 nm auf, während 0%, 10%, 20%, 30% und 35% bei ca. 115-127 nm liegen. Betrachtet man die durch dynamischen Lichtstreuung erhaltenen intensitätsgewichteten Maxima der Partikelgrößenverteilung des Partikeldurchmessers von Cholesterol enthaltenden LUVs in Abhängigkeit von der Temperatur (siehe Anhang A14c), so weisen alle LUVs eine hohe relative Peakintensität zwischen 8-20% und eine monomodale Verteilung auf. Dabei tritt die kleinste statistische Streuung bei Temperaturen von 35 °C und 37 °C auf. LUVs mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt sind im Allgemeinen kugelförmig und bei unterschiedlichen Temperaturen stabil, zeigen jedoch in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt minimale Änderungen des hydrodynamischen Durchmessers.

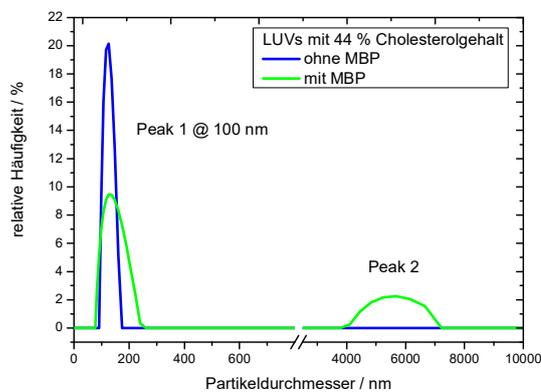


Abbildung 25. Intensitätsgewichtete Verteilungen des hydrodynamischen Partikeldurchmessers von LUVs mit 44% Cholesterol mit und ohne MBP (2 µM) (gemessen bei 20 °C in einem HEPES-NaCl-Puffer mit einem Streuwinkel von 175°), erhalten durch dynamische Lichtstreuung. Bimodale Verteilung der LUVs mit MBP bestehend aus einem Peak 1 bei 100 nm (einzelne LUVs) und einem weiteren Peak 2 (LUV-MBP-Aggregate) bei viel größeren Durchmessern.

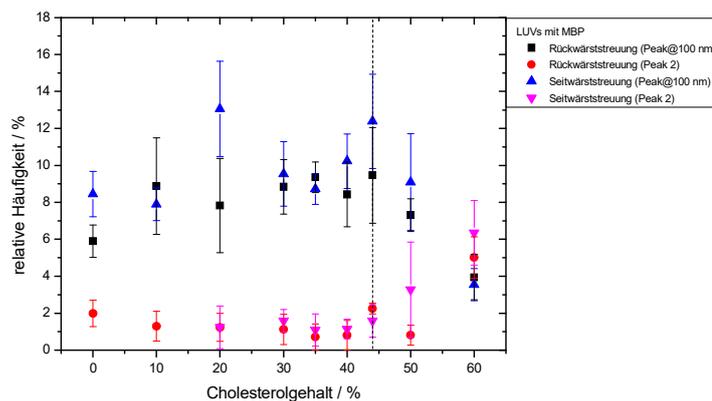


Abbildung 26. Intensitätsgewichtete Peakmaxima des hydrodynamischen Partikeldurchmessers von Cholesterol enthaltenden LUVs mit MBP (2 µM) (gemessen bei 20 °C in einem HEPES-NaCl-Puffer mit einem Streuwinkel von 175° (Rückwärtstreuung) und 90° (Seitwärtstreuung)), erhalten durch dynamischen Lichtstreuung. Peak@100 nm und Peak 2 beziehen sich dabei auf die in Abbildung 25 definierten Peaks der bimodalen Partikelgrößenverteilung. Die gestrichelte Linie bei 44% Cholesterolgehalt visualisiert den Umschlagspunkt des, im Text diskutierten, Aggregationsverhalten. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts von drei Messungen.

DLS-Messungen mit MBP sind nicht reproduzierbar, deshalb werden nur grobe Tendenzen analysiert und beispielhaft sind im Folgenden einzelne Messreihen dargestellt. Die Reproduzierbarkeit scheitert daran, dass MBP keine gleichmäßig großen Aggregate bildet. Die unterschiedlich großen Aggregate sorgen für Unstetigkeiten in der aufgenommenen *count rate*. Diese Unstetigkeiten werden auf die berechnete Korrelationsfunktion und Partikelgrößenverteilung übertragen, was eine Quantifizierung besonders für die LUV-MBP-Aggregate erschwert.

Bei Durchführung der DLS-Messungen derselben LUVs in Präsenz von MBP zeigen die Ergebnisse, dass neben dem Peak bei 126 nm ein zweiter Peak bei Partikeldurchmessern > 200 nm auftritt. Dies stellt eine bimodale Verteilung dar (PDI < 40%, Transmission < 60%, siehe Abbildung 25 beispielhaft 44% Cholesterol und A15a für alle Verteilungen). Der Peak bei größeren Durchmessern ist ein weiterer Beweis dafür, dass MBP die Vesikel zusammenklebt und große Aggregate bildet, wie dies in den Kryo-TEM-Aufnahmen zu sehen ist. Auch die Veränderung von einer > 80% Transmission bei reinen LUV-Proben zu niedrigeren Prozentsätzen von < 60% bei LUV+MBP-Proben ist ein klares Zeichen für die Bildung von Partikeln unterschiedlicher Größe. Der noch vorhandene Peak bei 126 nm zeigt, dass nicht alle Vesikel durch MBP an benachbarten Vesikeln haften. Betrachtet man die zahlengewichtete Analyse, so kann auch aufgezeigt werden, dass neben Vesikeln (126 nm) und Protein-Vesikel-Aggregaten (> 200 nm) auch einzelne MBP-Moleküle/Dimere (10 nm) vorhanden sind (siehe anzahlgewichtete Verteilungen in A15c). Messungen von reinem bMBP in Puffer haben bestätigt, dass MBP-Moleküle im Bereich von 3-10 nm auftreten und numerisch selten große Aggregate bilden (siehe Anhang A15d). Auch das numerische Verhältnis von großen Aggregaten zu LUVs ist sehr klein, was bedeutet, dass nur wenige größere Aggregate gebildet werden und der Hauptteil der Partikel als einzelne LUVs vorliegt. Der Unterschied in intensitäts- und anzahlgewichteten Analysen beruht darauf, dass große Partikel viel mehr Licht streuen als kleine Partikel, da die Intensität der Streuung eines Teilchens proportional zur sechsten Potenz seines Durchmessers ist. Dies wird in der anzahlgewichteten Analyse relativiert.

Ein Blick auf die intensitätsgewichteten Messungen bei 20 °C mit Rück- und Seitwärtsstreuung von LUVs mit MBP (Abbildung 26) zeigt, dass sich das Aggregationsverhalten oberhalb von 44% Cholesterolgehalt ändert. Das Intensitätsverhältnis von einem hochintensiven Peak 1 zu einem weniger stark ausgeprägten Peak 2 ändert sich bei beiden Streuwinkeln zu einem Peak 1 mit niedrigerer Intensität und einen Peak 2 mit höherer Intensität (siehe Abbildung 25 Peak-Definitionen). Dieser Trend ist über den gesamten getesteten Temperaturbereich zu beobachten (A15e). Aus den Autokorrelationsfunktionen der Proben mit MBP ist, ebenso wie in den vorherigen Proben ohne MBP, eine Temperaturabhängigkeit zu vermuten. Mit steigender Temperatur wird die Korrelationsfunktion zu kleineren Zeiten verschoben (siehe A15b). Diese Beobachtung resultiert in diesem Fall aus der Dominanz der Viskositätsverringerung bei Temperaturerhöhung. Die temperaturinduzierte Quellung der Vesikel wird

höchstwahrscheinlich nicht durch MBP unterdrückt bzw. der Anteil an nicht-aggregierten LUVs ist zu hoch, um eine spezifische Aussage bezüglich der direkten MBP-Einwirkung treffen zu können.

Dynamische Lichtstreuungsexperimente haben gezeigt, dass Vesikel ohne MBP im Allgemeinen kugelförmig und unabhängig von ihrem Cholesterolgehalt temperaturstabil sind. Interessanterweise weist der hydrodynamische Durchmesser minimale Änderungen in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt auf. DLS-Experimente von LUVs mit MBP führen zu einer stark erhöhten Partikelgröße, die das Aggregationsverhalten untermauern. Die Protein-Vesikel-Wechselwirkungen von LUVs, die 0-20% Cholesterol enthalten, sind temperaturabhängig. Das Aggregationsverhalten ändert sich in den LUVs mit über 44% Cholesterolgehalt und markiert erneut 44% Cholesterol als wichtige Lipidzusammensetzung. In beiden Versuchsreihen scheint der Temperaturbereich von 35-40 °C (menschliche Körpertemperatur) als Umschlagspunkt wichtig zu sein.

3.2.1.3 Einfluss des Cholesterolgehaltes auf das Zeta-Potential der Vesikel (elektrophoretische Lichtstreuung)

Messungen des Zeta-Potentials ζ können Aufschluss über das Membranpotential an der Position der Scherebene zwischen Stern- und Diffusionsschicht eines Partikels geben. [114,121] Das Membranpotential wird durch die Adsorption oder Insertion geladener Moleküle wie z. B. MBP beeinflusst. Dies hängt vom pH-Wert, der Ionenstärke und der Konzentration der Probe ab [217]. Die Zeta-Potentiale wurden durch Messen der elektrophoretischen Mobilität bei 20 °C unter Verwendung der LASER-Doppler-Velocimetrie (LDV)-Technik in einem elektrophoretischen Lichtstreuungsaufbau (ELS) erhalten (siehe weitere Informationen in Kapitel 2.5.2 und Kapitel 4.6). Zur Berechnung der Henry-Funktion wurde der hydrodynamische Durchmesser aus DLS-Messungen verwendet.

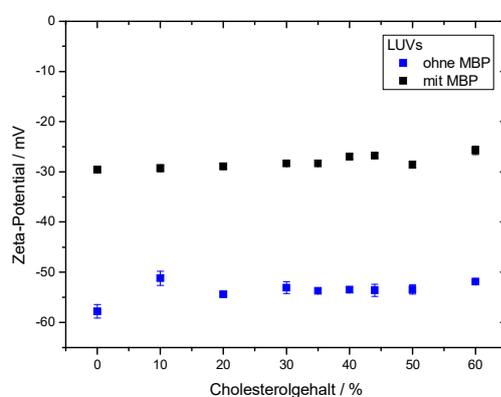


Abbildung 27: Kontinuierlich überwachte Phasenanalyse der Lichtstreuung: mittleres Zeta-Potential von cholesterolhaltigen LUVs mit und ohne MBP (2 μ M) in einem HEPES-NaCl-Puffer (gemessen bei 20 °C mit maximal 40 V, 200x). Das Lipid/Protein-Verhältnis beträgt 567:1. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts von drei Messungen.

Die LUVs wurden bei einem physiologischen pH von 7,4, einer hohen Ionenstärke von 18 mM und einer Temperatur von 20 °C gemessen. Die Konzentration für die reinen Vesikel jeder Mischung betrug 1,1 mM (Transmission > 80%). Durch die Lipidzusammensetzung ist bekannt, dass die Vesikel an der Oberfläche aufgrund der negativ geladenen Lipide PS und PI und der ansonsten neutral geladenen Lipide, negativ geladen sein sollten. Daher ist der gemittelte mittlere Zeta-Potentialwert von $-53,1 \text{ mV} \pm 7,8 \text{ mV}$ für die LUVs mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt nicht überraschend (Abbildung 27). Alle Proben zeigten monomodale Verteilungen der ζ -Werte (siehe A16). Das Zeta-Potential der Vesikel ist unabhängig vom Cholesterolgehalt. In Zellmembranen ist die Zusammensetzung der inneren und äußeren Monoschicht asymmetrisch, da die Krümmung der Membran und möglicher Stress ausgeglichen werden müssen. Eine nicht homogene Verteilung der Lipide wird auch hier in kleinerem Maße angenommen, jedoch ist es unwahrscheinlich, dass vor allem im Vergleich der äußeren Extrema von 10% und 60% Cholesterolgehalt die geladenen Lipide sich mit einer konstanten Anzahl in der äußeren Doppelschicht anordnen und somit in einer gleichen Oberflächenladung resultieren. Möglicherweise wird die Unabhängigkeit vom Cholesterolgehalt durch ein gleiches Verhältnis des verfügbaren Raums (der nicht von Cholesterol besetzt ist) zur Anzahl der negativ geladenen Lipide erreicht. Das Ergebnis ist die gleiche Menge an Lipiden mit negativer Ladung auf einer definierten Membranfläche.

Aus früheren Studien zur Lipid-MBP-Interaktion ist bekannt, dass der erste Schritt nach der elektrostatischen Anziehung die Ladungsneutralisation durch MBP ist. Somit wird nach Zugabe von MBP eine geringere negative Oberflächenladung der Lipide und eventuell eine eher positive Ladung, resultierend aus den verknüpften MBP-Tentakeln (siehe Kapitel 2.1), erwartet. [22,34] Die Zugabe von MBP zu den Vesikeln führt zu einem Anstieg des Zeta-Potentials auf einen durchschnittlichen Wert von $-27,85 \text{ mV} \pm 4,9 \text{ mV}$ (Abbildung 27). Dies liegt daran, dass das positiv geladene MBP die negativen Ladungen der Lipide neutralisiert. Aber selbst wenn die Gemische eine unterschiedliche Menge negativ geladener Lipide enthalten, die mit höherem Cholesterolgehalt abnimmt, ändert sich das Zeta-Potential nicht in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt. Dies könnte bedeuten, dass das Verhältnis von negativen Lipiden zu positivem Protein so hoch ist, dass MBP selbst in den Vesikeln mit 60% Cholesterolgehalt gesättigt ist und die überschüssigen negativen Ladungen dominieren. Aus den DLS-Daten ist bekannt, dass nicht alle LUVs durch MBP zusammengeklebt werden. Es sind noch einzelne LUVs übrig, da der Peak bei 126 nm noch vorhanden ist. Daher ist der Wert des Zeta-Potentials für Proben mit Protein eine Mittelung der durch MBP zusammengeklebten Vesikel und einzelner LUVs. Das Potential für ein einzelnes MBP-Vesikel-Aggregat könnte bei positiveren Werten liegen, wenn man bedenkt, dass reines MBP im Puffer ein Zeta-Potential von $8,91 \text{ mV} \pm 0,5 \text{ mV}$ aufweist (A16B). In den TEM-Aufnahmen in Abbildung 22 konnten für 60% Cholesterolgehalt Bereiche mit höherer Dichte identifiziert werden, die stets zwischen zwei Vesikeln liegen und somit nicht durch ELS detektiert werden können. Die oben vorgeschlagene Annahme, dass diese Bereiche ein erhöhtes Cholesterolaufkommen

darstellen, würde den nicht vorhandenen Einfluss von Cholesterol auf die Zeta-Potentialwerte unterstützen. In der Gesamtbilanz der durch ELS detektierbaren Scherebene würden diese Bereiche deshalb fehlen und zu einem höheren negativen Potential beitragen. Darüber hinaus korreliert das Zeta-Potential nicht direkt mit der Oberflächenladung der Vesikel, sondern nur mit der Gleitebene, die vom Puffer und seinen Ionen beeinflusst wird. Die Zeta-Potentialmessungen mit MBP können nur allgemein analysiert werden, da die Partikelgröße sehr groß ist und daher die Transmission für die Analyse mit der Kalliope-Software und dem Analysemodell auf einem niedrigeren Akzeptanzniveau liegt. Um Details über die tatsächliche Lipid-Oberfläche zu erhalten, wurden im Folgenden Messmethoden durchgeführt, die vor allem die lokale Umgebung der Oberfläche der Lipiddoppelschicht untersuchen.

3.2.1.4 Untersuchungen des spinmarkierten Cholesterols mittels EPR

Die paramagnetische Elektronenresonanz (EPR)-Spektroskopie ermöglicht die Untersuchung der strukturellen und dynamischen Veränderungen von IDPs oder ihrer komplexen Umgebung und hat in der IDP-Forschung zunehmend an Bedeutung gewonnen. [138,218] Der gebräuchlichste Weg, um Informationen direkt über das Protein zu erhalten, erfolgt über die ortsgerichtete Spinmarkierung [219,220] des Proteins. In diesem Projekt wird spinmarkiertes Cholesterol verwendet, um den Einfluss der MBP-Bindung auf die Lipide zu beobachten. Die Spinmarkierung umfasst ein Carboxy-TEMPO, das an der Hydroxylgruppe des Cholesterols (CSOSL) [221] hinzugefügt wurde (Abbildung 28).

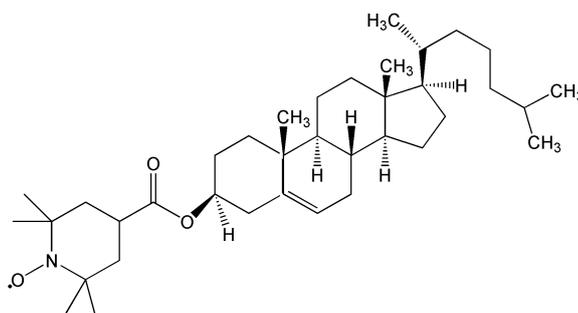


Abbildung 28: Chemische Struktur des spinmarkierten Cholesterols CSOSL.

Da CSOSL und Cholesterol eine sehr hohe Ähnlichkeit in ihrer molekularen Struktur aufweisen, sollten ihre Position und Orientierung in der Lipiddoppelschicht übereinstimmen. Außerdem wurde bereits in anderen EPR-Studien gezeigt, dass MBP sich nicht sehr tief in die Lipiddoppelschicht einbaut und sich auch Teile des Proteins (C1 als auch C8) an der Oberfläche aufhalten [36]. Dies, in Kombination mit der etwas tiefer sitzenden Position von Cholesterol, sollte die Spinmarkierung in einer Tiefe der

Doppelschicht positionieren, in der sich interagierendes MBP aufhalten sollte. Da bei den Zusammensetzungen von 0% und 35% Cholesterolgehalt keine markanten Veränderungen zu dem jeweils nächsthöheren Prozentsatz festgestellt werden konnte, wurde bei den folgenden EPR-Experimenten auf diese verzichtet, um die graphische Übersicht zu verbessern. Alle folgenden EPR-spektroskopischen Experimente wurden bei X-Band-Mikrowellenfrequenzen (9,4 GHz) durchgeführt.

3.2.1.4.1 Continuous wave EPR

Bei der *continuous wave* (cw)-EPR-Spektroskopie wird eine Probe mit Mikrowellen einer konstanten Frequenz bestrahlt, während das externe Magnetfeld abgescannt wird, bis die Resonanzbedingung (G12) erfüllt ist. [128,222] Informationen über die Beweglichkeit der Spinprobe, die Abstände zu anderen paramagnetischen Zentren, die Lösungsmittelzugänglichkeit und die Polarität der Mikroumgebung der Spinprobe können erhalten werden.

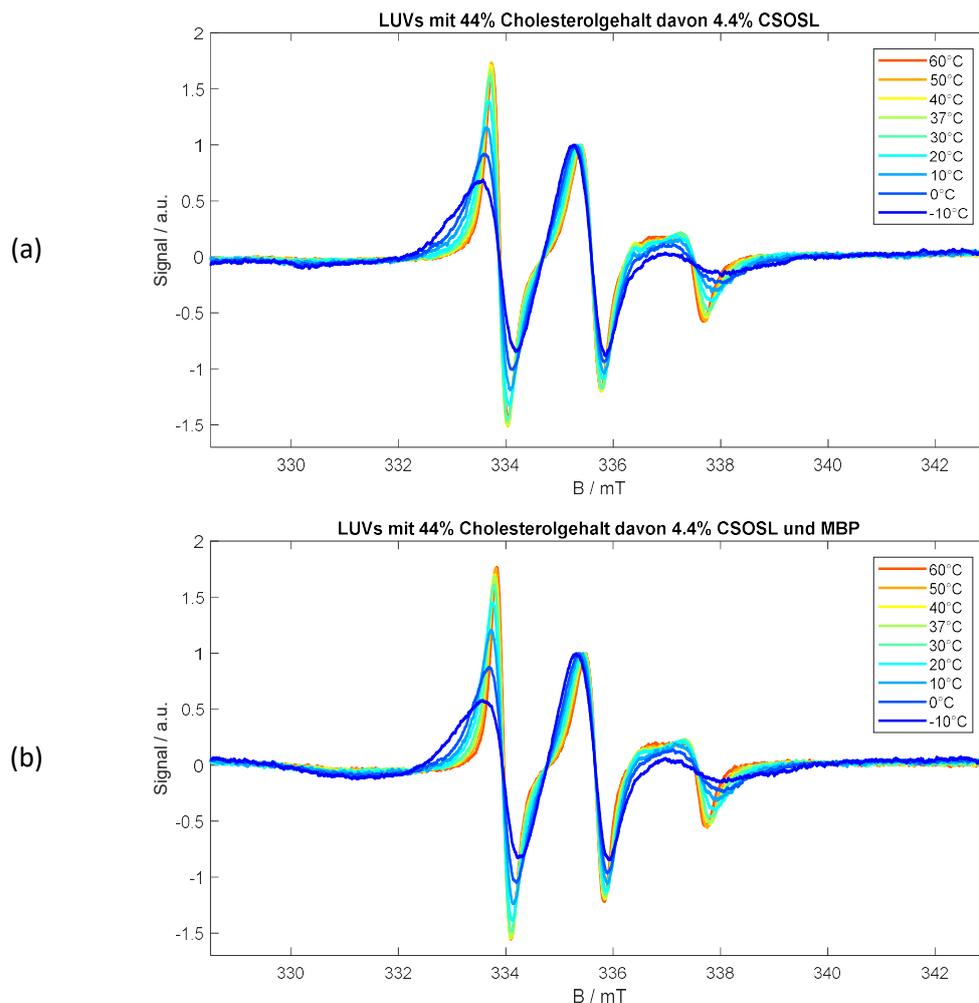


Abbildung 29: Temperaturreihen von X-Band-cw-EPR-Spektren von LUVs mit 44% Cholesterol, davon 4,4% CSOSL, (a) ohne und (b) mit MBP in einem HEPES-NaCl-Puffer, normiert auf Mittelfeld-Peak (jeweils 8 Scans, gemessen bei -10 °C bis 60 °C, MW-Leistung 5-10 dB, Mittelfeld 336 mT, Scanbreite 15 mT, Modulationsamplitude 0,1 mT).

Bei Verwendung eines Nitroxid-Radikals in den LUVs zeigen die Spektren das typische drei-Linien-Muster, wobei die beiden äußeren die Hyperfeinlinien darstellen (Abbildung 29). Alle Proben enthielten unabhängig vom Cholesterolgehalt die gleiche Menge an Spinlabel (50 μM). Der Cholesterolanteil wurde um die entsprechende spinmarkierte Cholesterolmenge verringert. CSOSL sollte sich mit der polaren Gruppe im Kopfgruppenbereich der Phospholipide befinden und dessen hydrophobes Ringsystem mit Alkylkette sollte mit den Kohlenwasserstoffketten der Phospholipide zum Doppelschichtzentrum hin ausgerichtet sein. Die Spektren sind charakteristisch für die Spinmarkierung in Lipiddoppelschichtstrukturen [223–225] und es gibt keinen eindeutigen Hinweis auf das Vorhandensein einer zweiten Komponente (eine definierte lokale Umgebung). Die temperaturabhängigen cw-Spektren der spinmarkierten Cholesterovesikel zeigen, dass sich die Linienformen mit steigender Temperatur ändern, und anisotrop sind. Die gleichen Linienformen und Auswirkungen der Temperatur können bei Proben beobachtet werden, die LUVs und MBP enthalten (Abbildung 29b).

Die Polarität der Nitroxid-Spinmarkierung hängt von der Spindichte der ungepaarten Elektronen am Stickstoffatom ab. Unpolare Lösungsmittel verringern die Dichte, wodurch die Hyperfeinwechselwirkung zwischen dem ungepaarten Elektronenspin und dem Stickstoffkernspin verringert wird. Betrachtet man die scheinbare, isotrope Hyperfeinkopplungskonstante ($a_{\text{iso,app}}$) von cholesterolhaltigen LUVs (Abbildung 30a), wird deutlich, dass die Mikroumgebung ihre Polarität ändert. Unabhängig vom Cholesterolgehalt geht der allgemeine Trend dahin, dass $a_{\text{iso,app}}$ (direkt aus den EPR-Spektren entnommen) bis zu 20 °C steigt, dann konstant bleibt und über 40 °C abfällt. Dies spiegelt sich in der Hochfeldspitze wider, die die Bewegung der Maxima von niedrigeren zu höheren, zurück zu niedrigeren Magnetfeldwerten zeigt (Abbildung 29). Vesikel mit 50% und 60% Cholesterolgehalt sind am hydrophilsten (höchsten $a_{\text{iso,app}}$ -Werte). Ansonsten gibt es keine Korrelation zwischen Cholesterolgehalt und der Hyperfeinkopplung. EPR-Studien zur Hydrophobizität mit spinmarkiertem Cholestan CSL (für Strukturformel siehe A17c) in PC-Doppelschichten haben gezeigt, dass die Hydrophobizität $2A_{zz}$ im Kopfgruppenbereich mit zunehmendem Cholesterolgehalt abnimmt [214,223]. Durch die Trennung der Kopfgruppen der Phospholipide induziert das Cholesterol einen Packungsdefekt, der Wassermolekülen ermöglicht tiefer in die Doppelschicht einzudringen [214,226]. Deshalb kann mit der Spinprobe eine hydrophilere Umgebung detektiert werden. In Bezug auf die vorliegende Arbeit mit komplexeren Lipidmischungen konnten solche Abhängigkeiten vom Cholesterolgehalt nicht in diesem Ausmaß beobachtet werden. Nur die Proben mit sehr hohen (60%) und niedrigen (10%) Cholesterolgehalte entsprechen den schon publizierten Trends. Bei der Arbeit mit einer komplexeren Mischung von Lipiden können jedoch andere Eigenschaften die Polarität beeinflussen. Die Polarität der Mikroumgebung des spinmarkierten Cholesterols ändert sich mit steigender Temperatur und erreicht bei Temperaturen von 20-40 °C ein Maximum. Fretten *et al.* [227] haben gezeigt, dass temperaturinduzierte Strukturänderungen um die Phasenübergangstemperatur herum auftreten und eher auf

Lipid-Lipid-Wechselwirkungen zurückzuführen sind. Sie gingen auch von einer zweiten Strukturänderung bei niedrigeren Temperaturen von ca. 10 °C aus. Die hier beobachteten temperaturbedingten Änderungen der Hyperfeinkopplungskonstante könnten daher eine Änderung der Lipid-Lipid-Wechselwirkung sein. Wenn wir eine Phasenübergangstemperatur von 37 °C (menschliche Körpertemperatur und in den DLS-Messungen angedeutet) annehmen, würde die temperaturinduzierte Änderung der Polarität damit übereinstimmen. In DSC-Messungen mit der natürlichen Zusammensetzung von 44% Cholesterol, konnte jedoch keine Phasenübergangstemperatur detektiert werden. Dies ist nicht verwunderlich aufgrund des immer breiter und weniger intensiv werdenden Wärmekapazitätspeaks mit steigendem Cholesterolgehalt in Lipidmischungen [228].

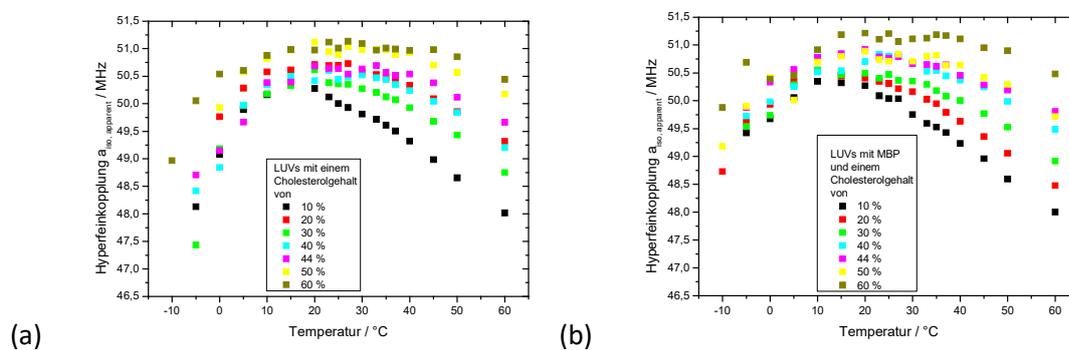


Abbildung 30: Scheinbare isotrope Hyperfeinkopplungskonstante $a_{iso,app}$ von LUVs mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt, die 4,4% CSOSL enthalten (a) ohne und (b) mit MBP in Abhängigkeit der Temperatur. Die LUV-Proben wurden bei X-Band-Frequenzen in einem HEPES-NaCl-Puffer und mit einem Lipid/Protein-Verhältnis von 567:1 vermessen.

In Anwesenheit von MBP zeigt die scheinbare, isotrope Hyperfeinkopplungskonstante das gleiche allgemeine Muster von 1. Zunahme - Plateau - Abnahme und 2. 60% cholesterolhaltige LUVs sind am hydrophilsten (Abbildung 30b). Die Hydrophobizität nimmt jedoch mit abnehmendem Cholesterolgehalt zu. MBP ändert die Polarität der Spinlabel-Umgebung. Durch die teilweise Insertion von MBP in die Doppelschicht wird der verfügbare Raum für Lipide verringert und die Lipide müssen sich in eine geordnetere Phase umorganisieren. Wie bekannt ist, bildet Cholesterol kondensierte *rafts* [111,183], die bereits hoch geordnet sind und sich daher nur sehr bedingt reorganisieren, nur miteinander verschmelzen oder die mit Phospholipid angereicherte Phase zwischen zwei *rafts* minimieren können. Aus Monoschichtstudien ist auch bekannt, dass MBP wahrscheinlich nicht mit Cholesterol angereicherten Regionen interagiert, sondern die negativ geladenen Lipide PS und PI, in der umgebenden flüssig-expandierten Phase der Cholesterol-*rafts*, bevorzugt oder an den Grenzflächen von kondensierten zu flüssig-expandierten Phasen interagiert [37,208]. Dies ist in Abbildung A17d zu sehen, in der die Differenzen $\Delta a_{iso,app} = a_{iso,app}(MBP) - a_{iso,app}(LUVs)$ dargestellt sind und nur minimale Unterschiede im Temperaturbereich von 15 °C bis 45 °C aufweisen. Die Änderung der

Polarität könnte auf die weitere Entstehung von Stapelfehlern zurückzuführen sein, die ein stärkeres Eindringen von Wasser oder eine Änderung der Krümmung der Vesikel-Doppelschicht [229,230] und somit eine bessere Exposition gegenüber dem umgebenden Wasser, ermöglichen. Hydrophober sind stattdessen LUVs, die 20% Cholesterol und MBP enthalten. Dies könnte mit dem Verlust der Krümmung (Doppelschicht planarer) und der Stabilität durch Zusammenkleben mit einer maximalen Kontaktfläche zusammenhängen, wie mit TEM beobachtet (Abbildung 22). Zwischen zwei Doppelschichten kann vermutlich weniger Wasser existieren und die Polarität wird verringert.

Durch Analyse der Spektrenform mittels Simulation mit dem EasySpin-Softwarepaket [231] kann die Mobilität des Spinlabels analysiert werden. In der Nitroxideinheit verläuft die z-Achse parallel zu den $2p_z$ -Orbitalen des Stickstoffs und Sauerstoffs, die das ungepaarte Elektron enthalten, die x-Achse verläuft entlang der N-O-Bindung und die y-Achse verläuft senkrecht zur xz-Ebene (siehe Abbildung 13 in Kapitel 2.5.3.1). Die x-Achse fällt mit der Längsachse des Cholesterolmoleküls zusammen. Alle Spektren wurden unter Verwendung des gleichen g-Tensors simuliert und der Diffusionskoeffizient für die Rotation senkrecht zur Hauptachse ist auf $D_{xx}=D_{yy}=0,5D_{\perp}=0,9\cdot 10^7\text{ s}^{-1}$ festgelegt (siehe alle Simulationen in A17). Die Nitroxid-z-Achse ist in einem festen Euler-Winkel β (0, β , 0) zur Hauptrotationsachse (II) ausgerichtet. Es konnte keine Abhängigkeit der Euler-Winkel beobachtet werden, wie dies bei anderen spinmarkierten Lipiden der Fall ist [232]. Da das Spinlabel nicht wie bei CSL (Abbildung A17c) starr angebracht ist, hat das Spinlabel mehr Rotationsfreiheit relativ zum Ringsystem.

Die Rotationskorrelationszeit τ_{corr} wird berechnet und in Abbildung 31 in Abhängigkeit von Temperatur und Cholesterolgehalt dargestellt. In beiden Fällen, mit und ohne MBP, nimmt die Rotationsmobilität mit höherer Temperatur bis 40 °C zu, da die τ_{corr} -Werte sinken und stagniert bei weiterem Temperaturanstieg. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Proben und somit keine Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt. Oberhalb von 40 °C wird ein Maximum an Rotationsfreiheit erreicht, eine freiere Rotation, jedoch mit verändernder Polarität. Die allgemeine Tendenz zu einer schnelleren Rotation bei höherer Temperatur könnte mit der oben erwähnten Umwandlung von der kristallinen in die flüssige Phase von Lipiden zusammenhängen. Diese Transformation dominiert auch wenn MBP vorhanden ist. Im Allgemeinen konnte die Veränderung der Dynamik mit Temperaturerhöhung und speziell im Bereich der Übergangstemperatur bereits in verschiedene Lipidstudien beobachtet werden [227,233]. Wie durch Neutronenstreuung gezeigt, wird die Molekulardynamik von Lipiddoppelschichten durch MBP beeinflusst [233,234]. In einer Studie mit DMPA und MBP wurde festgestellt, dass die Membrandynamik außerhalb der Ebene zur Membrannormalen (*out of plane*) in der Zeitskala von 1 ns deutlich charakterisiert ist durch räumlich begrenzte vertikale Diffusionsbewegungen der Lipide und diese werden durch MBP oberhalb des DMPA-Phasenübergangs (Gel zu flüssig-kristallin) signifikant verstärkt [233]. Dies konnte in der

Rotationskorrelationszeit nicht beobachtet werden. Da Cholesterol nur eine sehr kurze Alkylkette besitzt und nicht mit MBP direkt interagiert, ist dieser Effekt vermutlich nicht sehr stark ausgeprägt in der Betrachtung von CSOSL.

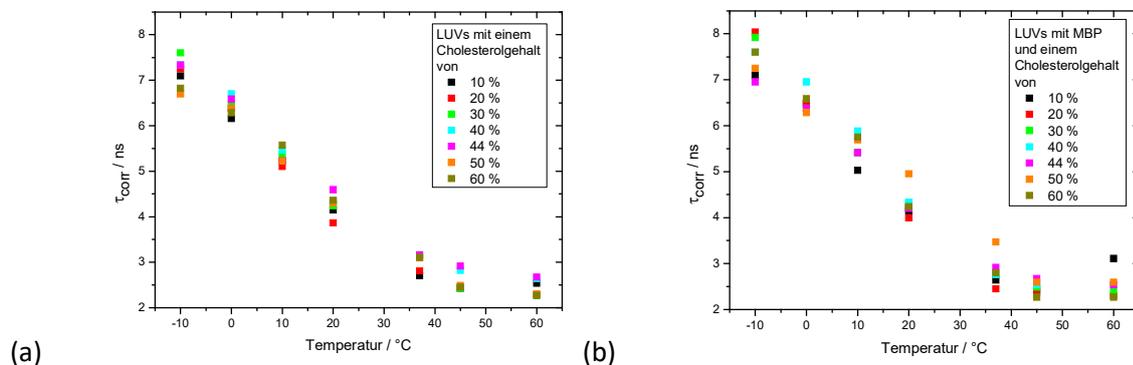


Abbildung 31: Rotationskorrelationszeit τ_{corr} in Abhängigkeit der Temperatur von 4,4% CSOSL in LUVs mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt (a) ohne und (b) mit MBP in einem HEPES-NaCl-Puffer, erhalten durch Simulation von X-Band-cw-Spektren.

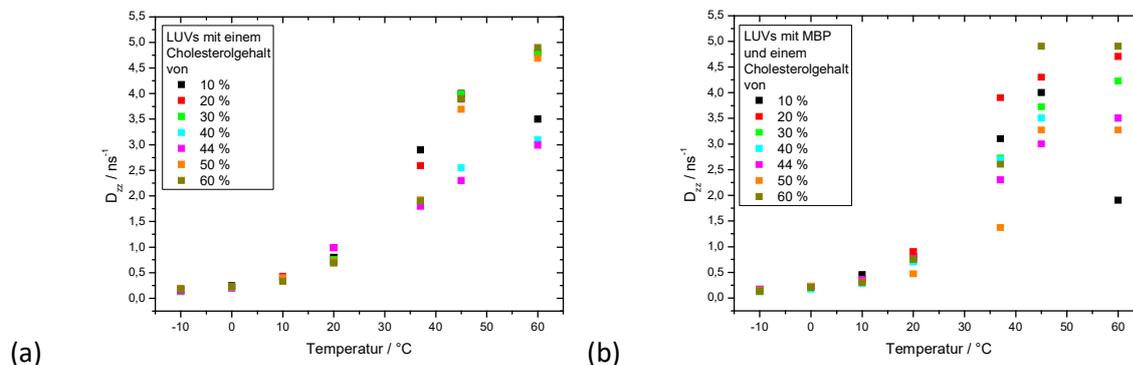


Abbildung 32: Rotationsdiffusionstensorelement D_{zz} in Abhängigkeit der Temperatur von 4,4% CSOSL in LUVs mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt (a) ohne und (b) mit MBP in einem HEPES-NaCl-Puffer, erhalten durch Simulation von X-Band-cw-Spektren.

Kusumi *et al.* [235] haben die Rotationsdiffusion des Cholestan-Spin-Markers CSL untersucht und gezeigt, dass CSL gegenüber der Gesamtordnung entlang der Alkylketten des Wirts und dem Cholesterolgehalt empfindlich ist. Da hier das Molverhältnis der anderen Lipide konstant ist und sich nur die Cholesterolmenge ändert, sollte der Einfluss der Alkylketten vernachlässigbar sein. Die Studie betrachtete zwei unabhängige Bewegungen nach der Methode von Israelachvili[225]: eine axiale Rotation, schnell um die lange Achse und eine taumelnde Bewegung (*wobbling*) der langen Achse in Kegelform. Die Rotationskorrelationszeit ist abhängig von der Diffusionsrate D und dem Euler-Winkel β . Hier nimmt D_{zz} (Drehung um die Längsachse) mit höherer Temperatur zu, siehe Abbildung 32. Unterhalb von 20 °C hat der Rotationsdiffusionskoeffizient für Proben mit und ohne MBP ungefähr den gleichen Wert und eine langsame Bewegung. Dies könnte an der energetisch eingeschränkten kristallinen/gelartigen Phase der Lipide mit ohnehin sehr geringer Rotationsrate liegen.

Oberhalb von 20 °C steigen die D_{zz} -Werte steiler an, aber nicht identisch. Bei LUVs ohne MBP trennen sich ab 45 °C die LUVs mit 44% Cholesterol von den anderen Proben und zeigen eine langsamere Rotation (40% weniger). Alle anderen Proben haben ungefähr die gleiche schnellere Drehung um die lange Achse. Die angegebenen Veränderungen der Lipid-Lipid-Wechselwirkung von Fretten *et al.* [227] kann hier bei 10 °C (letzter gemeinsamer Wert) und 37 °C (Phasenübergangstemperatur, ca. Separation von 44%) beobachtet werden. Auch spinmarkiertes MBP reagiert auf die Umwandlungstemperaturen der Lipide [236]. Der Cholesterolgehalt von 44% verhält sich anders als andere Cholesterolmengen [208]. Wenn MBP mit den Vesikeln interagiert, ändert sich das Rotationsverhalten über 20 °C im Vergleich zu Proben ohne MBP (Abbildung 32b). Der Unterschied von D_{zz} zwischen Proben mit und ohne Protein wird deutlicher, wenn man die Differenz $\Delta D_{zz} = D_{zz}(\text{MBP}) - D_{zz}(\text{LUVs})$ in Abhängigkeit von der Temperatur betrachtet (Abbildung A17e). Wie bereits erwähnt, ändert sich die Rotation von D_{zz} bei niedrigerer Temperatur nicht unabhängig vom Proteingehalt ($\Delta D_{zz} = 0$). Bei Temperaturen über 20 °C ist ein deutlicher Unterschied zu beobachten. Im Allgemeinen zeigen Proben mit MBP eine schnellere Rotation bei 37 °C im Gegensatz zu geringeren Temperaturen. Dies könnte mit der oben beschriebenen Dynamikveränderung in der L_{α} -Phase zusammenhängen, jedoch sollte diese die *in plane*-Rotation nicht signifikant beeinflussen. Durch die Wechselwirkung mit der Doppelschicht nimmt MBP selbst Platz ein, aber wie zuvor spekuliert, könnte MBP auch die negativ geladenen Lipide zusammenziehen und dadurch die Lipide verdichten [208]. Dies führt zu einer teilweise höheren kondensierten Lipidschicht und lässt Cholesterol mehr Raum für Rotationen. Möglicherweise ist dies für die nichtkovalente Verankerung in der Membran erforderlich. Wie in Monoschicht-Experimenten gezeigt, hat ein Cholesterolgehalt von 44% den höchsten Kondensationseffekt im Vergleich zu allen anderen getesteten Mischungen, was zu einer bereits hochgeordneten Monoschicht führt, die eine gute Voraussetzung für die MBP-Wechselwirkung liefert [208]. Bei 37 °C scheint sich das System im optimalen Zustand für die Interaktion mit MBP zu befinden, da mit zunehmender Temperatur der ΔD_{zz} -Wert abfällt, sogar auf negative Werte, was bedeutet, dass die Rotation ohne MBP schneller ist. Der Temperatureffekt auf die Rotation entlang der Molekülachse scheint mit MBP bei Körpertemperatur ein Maximum zu erreichen. Interessant ist, dass Proben mit 44% Cholesterol dieses Verhalten nicht zeigen. Es kann beobachtet werden, dass die D_{zz} -Rotation von CSOSL in LUVs (44% Cholesterol) mit MBP im Temperaturbereich von 37-60 °C immer $0,6 \text{ ns}^{-1}$ schneller ist als ohne MBP. Dies zeigt zum einen erneut, dass 44% Cholesterol eine besondere Rolle spielt, und zum anderen, dass 44% Cholesterol enthaltende LUVs ihre Rotation mit MBP unabhängig von der Temperatur konstant erhöhen.

Die unterschiedlichen Rotationsraten bei 37 °C können sich aus unterschiedlichen Ausgangssituationen ergeben. Bei LUVs mit weniger Cholesterol (10-30%) ist die Membran bei höheren Temperaturen fluider (höhere D_{zz}) als bei einem Cholesterolgehalt von 44%. Aus TEM-Aufnahmen weiß man, dass die Krümmung für die 20%-Probe weniger

stark ausgeprägt (planarer) ist. Eine planare Membran zeigt an, dass der verfügbare Raum pro Lipid zylindrisch ist und daher die Drehung entlang der Längsachse kaum eingeschränkt ist. In einer kugelähnlichen Struktur (LUV) ist dieser Raum kegel- oder kegelstumpfförmig und die Drehung entlang der x-Achse ist eingeschränkt. In einer kürzlich durchgeführten Studie wurde berichtet, dass die Zunahme der Dicke von Phosphat-zu-Phosphat (parallel zur Doppelschichtnormale) mit zunehmendem mol-% Cholesterol begleitet wird von einer Abnahme der Fläche pro Lipid [237]. Dies bedeutet, dass die höheren D_{zz} -Werte für LUVs mit niedrigerem Cholesterolgehalt und MBP aus der verfügbaren Raumgeometrie resultieren könnten. Während die Lipidkohlenwasserstoffketten die Bindungsaffinität, Kinetik oder Faltung von MBP nicht wesentlich beeinflussen, definieren die dynamische Freiheit und räumliche Besetzung der Ketten, wie viel MBP binden kann, um die Membranoberfläche zu sättigen [22]. Die Wechselwirkung von MBP mit eher planaren oder gekrümmten Oberflächen resultiert somit auch in einer anderen Anordnung der umgebenden Lipide, da die Eindringtiefe und der kondensierende Effekt davon abhängen. Die Tatsache, dass bei höheren Temperaturen der ΔD_{zz} -Wert abnimmt, könnte mit dem Übergang in die flüssige Phase zusammenhängen. Die Lipide sind agiler, benötigen mehr Platz und verschaffen sich untereinander einen größeren Abstand. MBP muss größere Entfernungen überwinden, was energetisch ungünstig wäre. Durch das Verlassen der Doppelschicht von MBP wird die Rotationsfreiheit verringert. Möglich ist auch, dass sich einzelne Lipide von der Wechselwirkung mit MBP lösen und die für die Wechselwirkung der α -Helix erforderliche Lipidsequenz unvollständig ist, das nächste fehlende Lipid jedoch zu weit entfernt ist. In Proben mit niedrigem Cholesterolgehalt, ist dies auf die hohe Fließfähigkeit zurückzuführen, in LUVs mit hohem Cholesterolgehalt vergrößern die Cholesterol-rafts die Entfernung. Dies würde auch bedeuten, dass MBP seinen Anker verliert und seine Konformation ändert, resultierend in einer anderen Wechselwirkung mit der Lipiddoppelschicht und das CSOSL erfährt einen Verlust an Bewegungsfreiheit. Die *trans-gauche*-Isomerisierung kann aufgrund der kurzen Alkylkette im Cholesterol vernachlässigt werden.

3.2.1.4.2 DEER-Messungen

Die Puls-EPR-Methode der Elelektron-Elektron-Doppelresonanz (DEER) zeichnet ein dipolares Modulationssignal zwischen zwei ungepaarten Elektronen auf, um Strukturinformationen zu erhalten. [143,145,238] In dieser Arbeit wurde die 4-Puls-Variante bei 50 K verwendet (weitere experimentelle Informationen zu Aufbau- und Messtechnik können in Kapitel 4.7.2 gefunden werden). DEER-Messungen wurden repräsentativ für LUVs mit einem hohen (60%), mittleren (44%) und niedrigen (20%) Cholesterolgehalt in Präsenz und Abwesenheit von MBP durchgeführt. In jeder Probe war der CSOSL-Gehalt gleich (100 μ M). Die Probe wurde bei Raumtemperatur (22 °C)

hergestellt, mit Glycerol versetzt und dann schockgefroren. Vor jeder DEER-Messung wurde eine Elektronenspin-Echo (ESE)-Messung durchgeführt, um die Frequenzen des Beobachter- und Pumpimpulses zu ermitteln und eventuelle zusätzliche Informationen bezüglich Phasenrelaxation und Atomkern-Modulationen zu erhalten. Allerdings konnten aufgrund des Signal/Rausch-Verhältnisses keine Unterschiede zwischen den Spektren der Proben festgestellt werden (A17g), weshalb diese nicht weiter diskutiert werden.

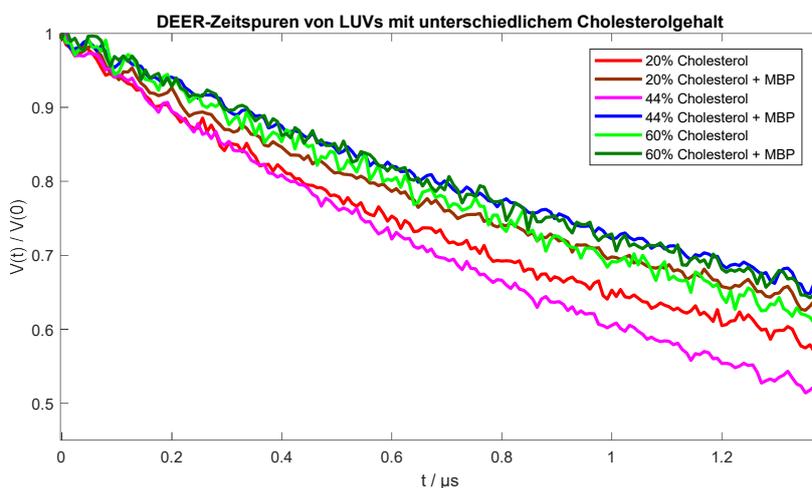


Abbildung 33: Hintergrund- und phasenkorrigierte DEER-Zeitspuren von CSOSL in Vesikeln mit einem Cholesterolgehalt von 20%, 44% und 60% mit und ohne MBP bei einem Lipid/Protein-Verhältnis von 567:1 in einem HEPES-NaCl-Puffer bei 50 K ($\tau_2=1,5 \mu\text{s}$).

Abbildung 33 zeigt die Abhängigkeiten $V(t)/V(0)$ von t , die für die LUVs mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt mit und ohne MBP erhalten wurden. Alle resultierenden Zeitspuren zeigen keine dominanten Modulationen, dies ist charakteristisch für die Überlagerung vieler dipolarer Evolutionsfrequenzen, wodurch die Beobachtung der einzelnen Schwingung behindert wird [239]. Betrachtet man zunächst die Zeitspuren der reinen LUV-Experimente, so zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit des Cholesterolgehalts. Vesikel mit 44% Cholesterolgehalt zeigen die tiefste Modulationstiefe, 60% die niedrigste und 20% präsentiert eine Mischung aus beiden. Die qualitative Anzahl der Spins innerhalb des zugänglichen Entfernungsbereichs kann aus der Modulationstiefe extrahiert werden [240]. Dies bedeutet, dass bei einem Cholesterolgehalt von 44% die spezielle Verteilung und der Abstand zwischen den Spinmarkierungen optimal sind, was zu der größten Modulationstiefe und der höchsten lokalen Konzentration von Spins führt. Abermals zeigt ein Cholesterolgehalt von 44% ein besonderes Verhalten. LUVs mit 60% Cholesterol weisen die geringste Tiefe auf, dies bedeutet, dass sich weniger Spins in der beobachtbaren Entfernung befinden. Dies könnte auf die erzwungene zunehmende Entfernung zwischen den CSOSL-Molekülen zurückzuführen sein, da sich immer mehr mit Cholesterol angereicherte Domänen bilden [208]. Bei einem Cholesterolgehalt von 20% weist die Zeitspur zu Beginn einen ähnlich steilen Abfall auf wie bei 44%, endet jedoch im Bereich von 60%. Bei der gleichen Menge an Spinmarkierungen in weniger Cholesterol-

Domänen kann man davon ausgehen, dass dies die Spinmarkierungen in einer Domäne näher zusammenbringt (44% Anteil), aber die Domänen selbst haben größere Abstände zwischen sich (60% Anteil). Obwohl kein deutlicher Unterschied in den makroskopischeren Techniken (TEM, DLS) zu beobachten war, zeigen die LUVs mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt im nanoskopischen Maßstab einen deutlichen Unterschied.

Mit MBP liegen alle Zeitspuren auf der Messung von reinen LUVs mit 60% Cholesterolgehalt. Die Modulationstiefe ändert sich somit nach der Zugabe von MBP nicht signifikant für die 60%-Probe, jedoch für die LUVs mit 20% bzw. 44% Cholesterolgehalt. Weniger Spins sind in auflösbarer Entfernung, dies deutet darauf hin, dass MBP in die Doppelschicht eingebaut wird und den verfügbaren Raum pro Lipid verringert und daher die spinmarkierten Cholesterolmoleküle auseinanderschiebt. Es zeigt aber auch, dass es eine Art maximalen Abstand gibt, da sich die Modulationsamplitude in einer Probe mit 60% Cholesterolgehalt nicht ändert. MBP hat mit 44% Cholesterolgehalt die stärkste Wirkung auf die LUVs, da der Unterschied zwischen der Modulationstiefe ohne und mit MBP am größten ist. Dies könnte daran liegen, dass 1.) das Verhältnis zwischen SM und Cholesterol optimal ist und die kompaktesten Domänen bildet, die für die Myelinverdichtung erforderlich sind [62], 2.) die Fließfähigkeit (Gehalt an ungesättigten Ketten) und die Steifheit (Cholesterolmenge) der Doppelschicht in perfektem Gleichgewicht [62,241] ist und/oder 3.) die Strukturen der Cholesteroldomänen und der phospholipidreichen Phase werden optimiert, um das Minimum an freier Energie zu erhalten [213].

3.2.1.5 Schlussfolgerung

In diesem Teilabschnitt wurde die Wirkung des Cholesterolgehalts in LUVs mit einer Lipidzusammensetzung ähnlich der zytoplasmatischen Seite der Myelinmembran auf die Wechselwirkung mit dem basischen Myelin-Protein untersucht. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Messtechniken durchgeführt, die Einblicke in das mikroskopische/nanoskopische Verhalten geben.

Auf der globaleren Skala zeigte DLS, dass LUVs mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt kugelförmige und gleich große Vesikel bilden und in einem Bereich von 0 °C bis 60 °C temperaturstabil sind. In Wechselwirkung mit MBP werden größere Aggregate gebildet, was erneut die Klebewirkung von MBP in der Myelinscheide belegt. Es werden jedoch nicht alle LUVs zusammengeklebt, neben den Aggregaten sind einzelne LUVs und reines MBP vorhanden (sichtbar in der nicht monomodalen Partikelgrößenverteilung). Interessanterweise ändert sich das Aggregationsverhalten mit einem Cholesterolgehalt von 44%. Zur Abbildung der reinen LUVs sowie deren aggregierten Strukturen wurde Kryo-TEM verwendet. Wiederum zeigten die LUVs ohne MBP keinen Unterschied in

Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt. Form und Größe stimmten mit den DLS-Daten überein. Mit MBP waren deutliche Unterschiede hinsichtlich Form und Aggregationsverhalten erkennbar. Bei niedrigem Cholesterolgehalt (20%) verformen sich die Vesikel stark, um eine maximale Kontaktfläche zu haben. Dies hängt mit der fehlenden Starrheit der Membran zusammen, die hauptsächlich durch Cholesterol und der relativ erhöhten Menge an negativ geladenen Lipiden (Hauptinteraktionspartner für MBP) induziert wird. Bei hohen Cholesterolgehalten (60%) wird, im Vergleich zu der vorhergehenden Probe, eine veränderte Verformung der Doppelschicht beobachtet. Der Kontaktbereich ist selektiver und es treten Bereiche mit höherer Dichte auf. Das selektive Verhalten könnte auf die höhere Steifheit der Vesikel und die geringe Menge an PS und PI zurückzuführen sein. Bei einer Übersättigung mit Cholesterol können sich sehr große *rafts* bilden, die aufgrund einer höheren Packungsordnung eine höhere Dichte aufweisen. Dies muss jedoch spezifischer untersucht werden. Mit einem Cholesterolgehalt von 44% (native Menge) ist die Bindung durch MBP geordneter. Die Vesikel behalten ihre anfängliche runde Form und bleiben in nahezu regelmäßigem Abstand zueinander, ohne die Wirksamkeit der Aggregation zu beeinträchtigen. In Bezug auf den Myelinmantel, der spiralförmig um das Axon gewickelt ist und daher die Krümmung mit größerem Durchmesser ändert, scheint es, dass 44% cholesterolhaltige LUVs die Änderung des Durchmessers am besten ausgleichen können, indem Stabilität, Form und Homogenität aufrechterhalten werden. 20% und 60% cholesterolhaltige LUVs können die erforderliche Ordnung nicht erzielen. Betrachtet man das Membranpotential der Gleitebene über das Zeta-Potential, so konnte weder ohne MBP noch mit Wechselwirkung von MBP eine Abhängigkeit des Cholesterolgehalts beobachtet werden. Nur der mittlere Zeta-Potentialwert änderte sich von $-53,1 \text{ mV} \pm 7,8 \text{ mV}$ für die reinen LUVs auf $-27,85 \text{ mV} \pm 4,9 \text{ mV}$ mit MBP, da die negativ geladenen Lipide durch das positiv geladene MBP neutralisiert werden.

Mittels EPR-Spektroskopie können Informationen über ein bestimmtes Molekül erhalten werden. Dafür wurde Cholesterol mit einem Carboxy-TEMPO an der Hydroxylgruppe spinmarkiert (CSOSL). Aus der bestimmten Hydrophobizität von Spektren mit einem spinmarkierten Cholesterol geht aus anderen Studien [62,223] hervor, dass die Polarität in der Kopfgruppenregion mit zunehmendem Cholesterolgehalt zunimmt. Dies ist in dieser Studie nur teilweise zu beobachten. Für LUVs ohne MBP zeigt sich keine klare Korrelation, aber mit MBP nimmt die Polarität mit zunehmendem Cholesterolgehalt zu. Dies bedeutet, dass sich die Polarität der Spinmarkierung durch die Wechselwirkung mit MBP ändert, obwohl MBP nicht direkt mit Cholesterol interagiert. Es wird angenommen, dass die Änderung der Polarität auf die Erzeugung von Packungsdefekten zurückzuführen ist, die es Wassermolekülen ermöglichen, in die Doppelschicht einzudringen und/oder die Krümmung zu ändern. Auch die Polarität ist temperaturabhängig und eine Änderung der Lipid-Lipid-Wechselwirkung bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ wird vermutet. Die Rotationskorrelationszeit τ_{corr} zeigt eine Übergangstemperatur von $37\text{-}40 \text{ }^\circ\text{C}$ an. Durch die Untersuchung der Rotationsrate um die lange Molekülachse (D_{zz}) werden die Bewegungsunterschiede

deutlicher, da 44% cholesterolhaltige LUVs im Vergleich zu den anderen Proben unterschiedliche Rotationsraten mit und ohne MBP aufweisen. In allen Simulationen wird ein Maximum bei 37 °C beobachtet. Die Untersuchung der Modulationstiefe von Zeitspuren der DEER-Experimente hat gezeigt, dass LUVs mit 44% Cholesterolgehalt den optimalen Abstand und die optimale Verteilung von Cholesterol zu haben scheinen. Dieselben Experimente mit MBP zeigen, dass weniger Spins unabhängig vom Cholesterolgehalt in der auflösbaren Reichweite sind, mit dem größten Effekt bei 44% Cholesterol. Dies stärkt die Theorie, dass MBP den verfügbaren Platz in Doppelschichten reduziert.

Es wird sehr deutlich, dass der Cholesterolgehalt für die MBP-Wechselwirkung mit der Doppelschicht bedeutsam ist. Bei Versuchen in Anwesenheit von MBP ändert sich je nach Cholesterolgehalt die Größe, die Form, das Aggregationsverhalten, die Stabilität und die Fließfähigkeit sowie die Rotationsbewegung, die Umgebungspolarität und die Verteilung des spinmarkierten Cholesterols. In fast jeder Versuchsreihe zeigt ein Cholesterolgehalt von 44% ein unregelmäßiges Verhalten oder markiert einen Umschlagspunkt. Bei verschiedenen Analysemethoden wurde beobachtet, dass 37 °C (menschliche Körpertemperatur) unabhängig vom Cholesterolgehalt eine relevante Temperatur ist.

Basierend auf den präsentierten Daten lässt sich (vorläufig) vermuten, dass MBP die Veränderungen des Cholesterolgehalts in der Umgebung nicht wahrnimmt, da alle Proben aus der Ferne betrachtet (aber immer noch nanoskalig) die gleichen Eigenschaften zu haben scheinen. MBP erkennt die Änderungen erst, wenn es sich in unmittelbarer Nähe der Doppelschicht befindet. Um den Defekt (falscher Cholesterolgehalt) auszugleichen, könnte sich MBP durch Variation zu C1-C8 ändern. Dadurch würde, durch Signalisieren eines Defekts, ein Schneeballsystem gestartet, welches weitere Veränderungen nach sich ziehen könnte.

3.2.2 Untersuchung des Einflusses von divalenten Metallionen auf die Interaktion von MBP mit myelinartigen LUVs

Wie in den Grundlagen bereits erwähnt sind in der natürlichen Umgebung der Myelinscheide divalente Metallionen vertreten. Hierzu gehören unter anderem Zink, Kupfer, Eisen, Calcium und Magnesium. Vor allem Zink mit 50 µM (1,4 µmol/g Myelin) zeigt eine hohe Konzentration auf. Kupfer liegt, im Vergleich dazu, nur zu etwa einem Drittel (0,4 µmol/g Myelin) vor [74,242]. MBP hat 10 Histidineinheiten, die als Koordinationstellen für Metallionen geeignet sind. Dabei können pro MBP-Molekül 0,9 Zink-Ionen und 2,13 Kupfer-Ionen aufgenommen werden [92]. Wie bereits in anderen Studien festgestellt wurde, haben divalente Metallionen einen Einfluss auf das Bindungsverhalten von MBP mit Lipiden. So ist die Bindungsaffinität von Kupfer-Ionen gegenüber Zink-Ionen größer, Zink-Ionen induzieren bei Lipid-gebundenem MBP eine

veränderte Sekundärstruktur und es wird eine synergistische MBP-Membran-Kation-Interaktion vermutet [77,88,91,243,244]. Auch die Lipide selbst können über elektrostatische Wechselwirkungen mit den Metallionen interagieren, vor allem PS und PI als negativ geladene Lipide. Zinkmangel führt zu einer abnormalen ZNS-Entwicklung und neuropsychologischen Beeinträchtigung [245–247]. In neurofibrillären Verwicklungen, die mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind, wurde über ungewöhnlich hohe Zinkspiegel berichtet [248]. Außerdem wird vermutet, dass die Kationen-Konzentration sich im erkrankten Zustand ändert und lokal entweder sehr hoch oder sehr gering sein kann [45,89,90]. Diese lokalen Veränderungen können dazu führen, dass strukturelle Veränderungen auftreten, die die Integrität und Stabilität der Membran beeinflussen [45]. Bisher wurde jedoch meist nicht die komplette Lipidzusammensetzung verwendet oder die Reihenfolge der Zugabe der Komponenten nicht berücksichtigt. Deshalb wird in den folgenden Kapiteln der Einfluss von unterschiedlichen divalenten Metallionen auf die Interaktion von MBP mit myelinartigen LUVs untersucht.

Als Modellsystem für die Lipidmembran werden auch in diesem Kapitel LUVs verwendet. In diesem Teil der Arbeit wurde zunächst immer der Einfluss der einzelnen Chloridsalze der Metallionen auf die LUVs untersucht. Anschließend wurde MBP in das System eingebracht, wobei die Reihenfolge der Zugabe beachtet wurde, da nicht bekannt ist, ob zuerst Protein oder Metallionen im Myelin vorhanden sind. Im Weiteren werden immer drei verschiedene Pipettier-Reihenfolgen unterschieden, wobei die Grundlage stets die LUVs mit der natürlichen Lipidzusammensetzung (PC/PS/PE/SM/PI/Chol im Mol-Verhältnis von 11:13:27:3:2:44 [68]) sind und als „myelinartig“ im Folgenden bezeichnet werden:

1. Metallionen- danach Proteinzugabe (M^{2+} +MBP),
2. Protein- danach Metallionenzugabe (MBP+ M^{2+})
3. Protein und Metallionen werden zusammen inkubiert ((MBP+ M^{2+})).

Sowohl bei der Zugabe von Protein als auch bei der von Metallionen wurde stets eine Inkubationszeit von 15 min abgewartet. Zu Beginn werden die Auswirkungen von mehreren Metallionenkonzentrationen untersucht, mit Fortschreiten des Projektes wurde sich auf bestimmte Konzentrationen fokussiert (Tabelle 3). Ausgangspunkt sind die natürlichen Metallkonzentrationen von 50 μ M Zink-Ionen und 14 μ M Kupfer-Ionen [74,242].

3.2.2.1 Einfluss des Metallionengehalts auf Form und Größe der myelinartigen Vesikel (dynamische Lichtstreuung)

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) misst zeitabhängige Schwankungen der Streuungsintensität, die von Partikeln herrühren, die einer zufälligen Brownschen Bewegung unterliegen. Informationen über den Diffusionskoeffizienten und die Partikelgrößen können aus der Analyse dieser Schwankungen erhalten werden. Das Verfahren bietet die Möglichkeit, Größenmerkmale von Vesikeln oder Proteinen, sowie auch das Aggregationsverhalten dieser in einem flüssigem Medium zu messen. [113,115]

Zunächst wurde untersucht, ob die Art der Metallionen (Zink oder Kupfer) und die Konzentration der einzelnen Metallionen einen Einfluss auf die Form und Größe der Vesikel haben. Zur Überprüfung der Homogenität der Proben wurden mittels dynamischer Lichtstreuung die Größenverteilung der extrudierten LUVs bei 20 °C aufgenommen. Der hydrodynamische Durchmesser hängt von der Größe des Partikelkerns und der Struktur seiner Oberfläche sowie den umgebenden Ionen ab. Hier wurde ein Puffer aus HEPES und Natriumchlorid mit einer Ionenstärke von 18 mM verwendet, wobei je nach addierter Metallionenkonzentration die Ionenstärke im Bereich von 0,056-0,256 mM variiert. Es zeigte sich, dass die Zugabe von divalenten Metallionen keinen signifikanten Einfluss auf die Größe der Vesikel besitzt, da die hydrodynamischen Durchmesser (Abbildung 34a) bei verschiedenen Konzentrationen an Kupfer- und Zink-Ionen unverändert bei $131 \text{ nm} \pm 3,6 \text{ nm}$ bleiben. Die Partikeldurchmesser sind leicht erhöht zu den $127,4 \text{ nm} \pm 0,3 \text{ nm}$ der Vesikel mit natürlicher Zusammensetzung ohne zusätzliche Metallionen. Dies kann durch die Veränderung der Oberflächenstruktur durch Interaktion negativ geladener Lipide mit Metall-Kationen und der Ionenkonzentration im Medium, welche die Diffusionsgeschwindigkeit der Partikel beeinflussen, erklärt werden [216,249]. Alle Intensitätskorrelationsfunktionen sind steil und liefern eine unimodale und enge Größenverteilung (PDI < 12%, Transmission > 80%). Die Messungen bei Seit- und Rückstreuung deuten auf eine sphärische Form der Vesikel hin (siehe Anhang A18a). Die globale Form wird somit nicht verändert im Vergleich zu Vesikeln ohne zusätzliche divalente Metallionen. Die anzahlgewichtete Analyse der Proben bestätigte die monomodale Verteilung der Partikelgröße und die häufigste Größe der Partikel entspricht dem hydrodynamischen Durchmesser (Abbildung A18b). Ebenso sind die LUVs temperaturstabil wie aus Abbildung 34b ersichtlich ist. Jedoch kann kein Anstieg der Partikelgröße mit steigender Temperatur beobachtet werden, wie dies der Fall ist bei Messungen mit verschiedenem Cholesterolgehalt (siehe Kapitel 3.2.1.2). Das Aufquellen der Vesikel ist somit durch die Zugabe von Metallsalzen stark vermindert. Dies deutet auf ein darauf hin, dass die Metallionen mit den Lipiden interagieren und somit die temperaturabhängigen Phasenübergänge beeinflussen und zum anderen das oberflächennahes Wasser teilweise verdrängt wird und somit die Wasserschicht-Ordnung in der Nähe der Lipiddoppelschicht verändert wird [216]. Dies stimmt mit den Fakten überein, dass divalente Metallionen an Lipiddoppelschichten adsorbieren und durch die

Ion-Dipol-Wechselwirkung Konformationsänderungen der Lipidkopfgruppen verursachen [250,251] und dies zu einer Versteifung und Dehydrierung der Lipidkopfgruppen führt [83,84,252].

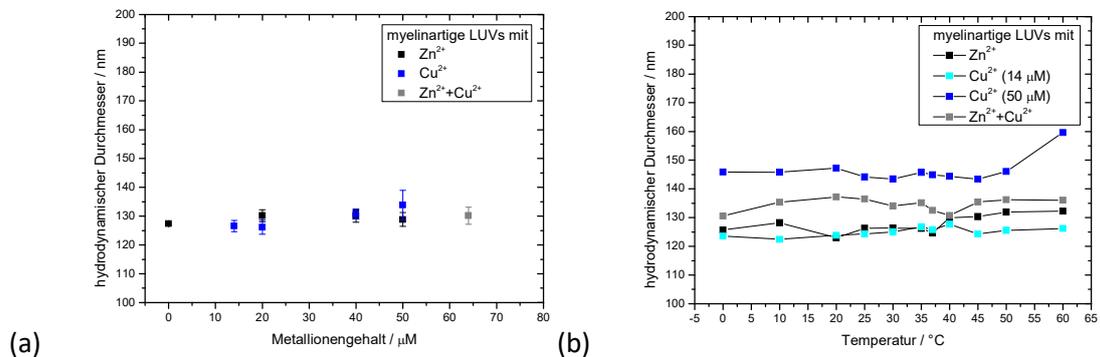


Abbildung 34: Hydrodynamischer Durchmesser von LUVs in Abhängigkeit vom Metallionengehalt, erhalten durch dynamische Lichtstreuung mit Streuwinkeln von 90° und 175° (intensitätsgewichtet). (a) gemittelter hydrodynamischer Durchmesser aus Seit- und Rückwärtsstreuung bei 20 °C, Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts von drei Messungen. (b) Temperaturabhängigkeit des hydrodynamischen Durchmessers mit einem Streuwinkel von 90°.

Bei Proben mit basischem Myelin-Protein konnte in der intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung abermals das Auftreten eines zweiten Peaks bei Partikelgrößen >150 nm beobachtet werden (wie in Kapitel 3.2.1.2, siehe A19a). Diese bimodalen Verteilungen (PDI < 30%, Transmission < 65%) belegen, dass die Anwesenheit von divalenten Metallionen nicht die generelle Fähigkeit von MBP aufhebt, Membranen zu verbinden. Neben den großen aggregierten MBP-LUV-Partikeln, konnten auch einzelne LUVs nachgewiesen werden, somit werden nicht alle Vesikel zu Aggregaten verklebt. Die anzahlgewichtete Analyse ergab, dass nur wenige große Aggregate gebildet werden und zudem auch einzelne MBP-Moleküle/Dimere sich in Lösung befinden (Peak bei 3-10 nm, siehe Abbildung A19b). Temperaturabhängige Messungen ergaben keine Tendenzen, da aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit von Proben mit MBP die DLS-Daten nicht konkreter ausgewertet werden konnten.

Die Betrachtung der Partikelgrößenverteilung zeigte, dass die Vesikel ohne MBP uniform und temperaturstabil sind, obwohl die Konzentration der Metallionen variiert wurde.

3.2.2.2 *Beeinflussung des Zeta-Potentials durch divalente Metallionen (elektrophoretische Lichtstreuung)*

Bei Betrachtung des Potentials der Scherebene, bestimmt durch cmPALS-Messungen, wird ersichtlich, dass der Metallionengehalt die reinen LUVs in Abwesenheit von MBP beeinflusst und abhängig von Konzentration und Metallionenart ist. Alle Zeta-Potential-Verteilungen sind monomodal (siehe Anhang A20) und die Partikelgrößenverteilung aus

DLS-Experimenten ist bei allen LUVs ähnlich, somit ist die Änderung des Potentials auf die Zugabe der Ionen zurückzuführen. Interessanterweise erreichen die gemessenen Potentiale für niedrige Metallionen-Konzentrationen ($< 30 \mu\text{M}$) negativere Werte als für reine LUVs und werden positiver mit höherer Konzentrationen (Abbildung 35a). Der Anstieg des Zeta-Potentials ist jedoch nur im Bereich von ca. 4,5 mV und nicht als sehr signifikant zu betrachten. Außerdem sind die Zeta-Potential-Werte der verschiedenen Metallionen bei niedrigen Konzentrationen in etwa gleich, wohingegen diese bei hohen Konzentrationen zunehmend differieren. Die Art des Metalls ist somit von Bedeutung. Kupfer-Ionen erzielen bei selber Konzentration einen negativeren Wert als Zink-Ionen und weisen einen höheren Standardfehler auf. Zudem liegen alle Zeta-Potentiale von Experimenten mit Kupfer-Ionen unterhalb der Referenz. Dies könnte womöglich an dem leicht größeren hydrodynamischen Durchmesser und einer anderen Oberflächenbeschaffenheit aufgrund von unterschiedlichen präferierten Koordinationen (Zn: tetraedrisch, Cu: quadratisch planar [253]) liegen, die die elektrophoretische Mobilität beeinflussen. Die Messung der Mischung aus Zink- und Kupfer-Ionen positioniert sich zwischen den Messungen der einzelnen Ionenarten. Obwohl nur $14 \mu\text{M}$ Cu^{2+} enthalten sind, im Vergleich zu der 3,5-fachen Menge an Zink-Ionen, scheinen diese doch einen großen Effekt auf das Potential der Scherebene zu haben, da der Potentialwert zu niedrigeren Werten verschoben wird im Vergleich zu $50 \mu\text{M}$ Zn^{2+} . Die Zugabe von verschiedenen divalenten Metallionen resultiert somit in leicht unterschiedlichen Ausgangssituationen, in Abhängigkeit von Metallionenkonzentration und –art, für die folgenden Messungen mit MBP.

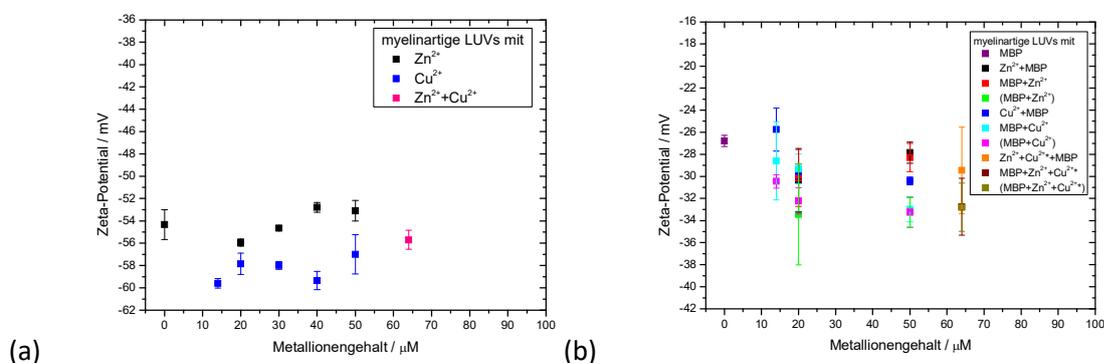


Abbildung 35: Kontinuierlich überwachte Phasenanalyse der Lichtstreuung: mittleres Zeta-Potential von (a) myelinartigen LUVs mit unterschiedlichem Metallionengehalt und (b) myelinartigen LUVs mit unterschiedlichem Metallionengehalt und MBP in verschiedenen Pipettier-Reihenfolge (gemessen bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ mit maximal 40 V , $200\times$). Die Mischung aus Zink- und Kupfer-Ionen wurde bei der Gesamtionenkonzentration von $64 \mu\text{M}$ eingetragen. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts von drei Messungen.

Wie bereits durch DLS-Messungen bestätigt verhindern die zusätzlichen Metallionen nicht die allgemeine Funktion von MBP die Vesikel zu verkleben. Auch in dieser Versuchsreihe mit MBP kann die Interaktion von MBP mit den Vesikeln beobachtet werden, da das Zeta-Potential für alle Proben sich zu positiveren Dimensionen verschiebt (Abbildung 35b, die monomodalen Verteilungen der Zeta-Potentiale sind in Anhang A20 zu sehen). Dies

entspricht der Neutralisation der negativ geladenen Lipidladungen mit den positiven Ladungen des Proteins. Allerdings sind, im Gegensatz zu Messungen ohne Metallionen/MBP, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Metallionenarten bzw. -konzentrationen zu erkennen. Auch die Reihenfolge der Zugabe von Protein und Metallionen zeigt keine klaren Unterschiede. Die Ergebnisse liegen aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit mit MBP in einem breiten mV-Bereich. Aus den DLS-Daten ist bekannt, dass nicht alle LUVs durch MBP zusammengeklebt werden, da der Peak bei 131 nm noch besteht und somit noch einzelne LUVs vorhanden sind. Daher ist der Wert des Zeta-Potentials für Proben mit Protein eine Mittelung der durch MBP zusammengeklebten Vesikel, einzelner LUVs und eventuellen freien Metallionen. Diese Mischung aus mehreren Partikelmöglichkeiten und das unterschiedliche Aggregieren von MBP mit LUVs, könnte die schlechte Reproduzierbarkeit erklären. Jedoch kann man sagen, dass die Mehrheit der Potentialwerte die Referenz bei -27 mV nicht überschreiten. Die Zugabe von MBP, egal in welcher Reihenfolge, scheint die äußeren Unterschiede zwischen Kupfer und Zink in der Scherebene zu minimieren.

3.2.2.3 *Visualisierung des Einflusses von divalenten Metallionen auf die LUV-MBP-Interaktion mittels Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie*

Da die Zeta-Potential-Ergebnisse ein anderes Ladungsverhältnis der Oberfläche nahelegen und im vorherigen Kapitel zur Cholesterolabhängigkeit große Unterschiede der Aggregation mittels Kryo-TEM beobachtet werden konnten, werden auch hier die Proben mittels Kryo-TEM untersucht. Möglicherweise könnte man neben den unterschiedlichen Bindungsverhalten von MBP und Vesikeln auch konkrete Unterschiede der Vesikeloberflächen beobachten. Die Aufnahmen aus Abbildung 22 mit 44% Cholesterolgehalt aus Kapitel 3.2.1.1 dienen hier als Vergleich für das System ohne divalente Metallionen. Diese sind nochmal kompakt in Abbildung 36 dargestellt. Für die folgenden TEM-Messungen wurde sich auf einzelne Konzentrationen fokussiert. Es wurden 50 μM Zn^{2+} und 14 μM Cu^{2+} als natürliche Einzel-Konzentrationen [242], die Mischung aus beiden und als Referenz 50 μM Cu^{2+} selektiert. Zunächst wurden die Vesikel ohne MBP betrachtet (Abbildung 36). Dabei stellte sich heraus, dass keine Unterschiede weder zwischen den verschiedenen Metallionensorten, noch verschiedener Konzentrationen, noch Zusammensetzungen erkennbar sind. Alle Vesikel sind rund, teilweise multilamellar, besitzen circa die gleiche Größe und sind separiert voneinander, wie auch die Vesikel ohne Metallionen (Abbildung 36). Dies deckt sich mit den Resultaten der vorherigen DLS-Messungen (Kapitel 3.2.2.1). Shaharabani *et al.* [44,45] haben mittels SAXS gezeigt, dass bereits in MLVs ohne MBP (egal ob Lipid-Zusammensetzung von Gesunden oder Erkrankten) Phasenunterschiede auftreten in Abhängigkeit der Metallionensorte und -konzentration. Da dies hier nicht zu beobachten ist, könnte die Entstehung von koexistierenden Phasen auf die Multilamellarität oder auf die leicht

andere Lipidzusammensetzung (hier zusätzlich PI) zurück zu führen sein, ebenso wie auf die höhere Salzkonzentration im verwendeten Puffer.

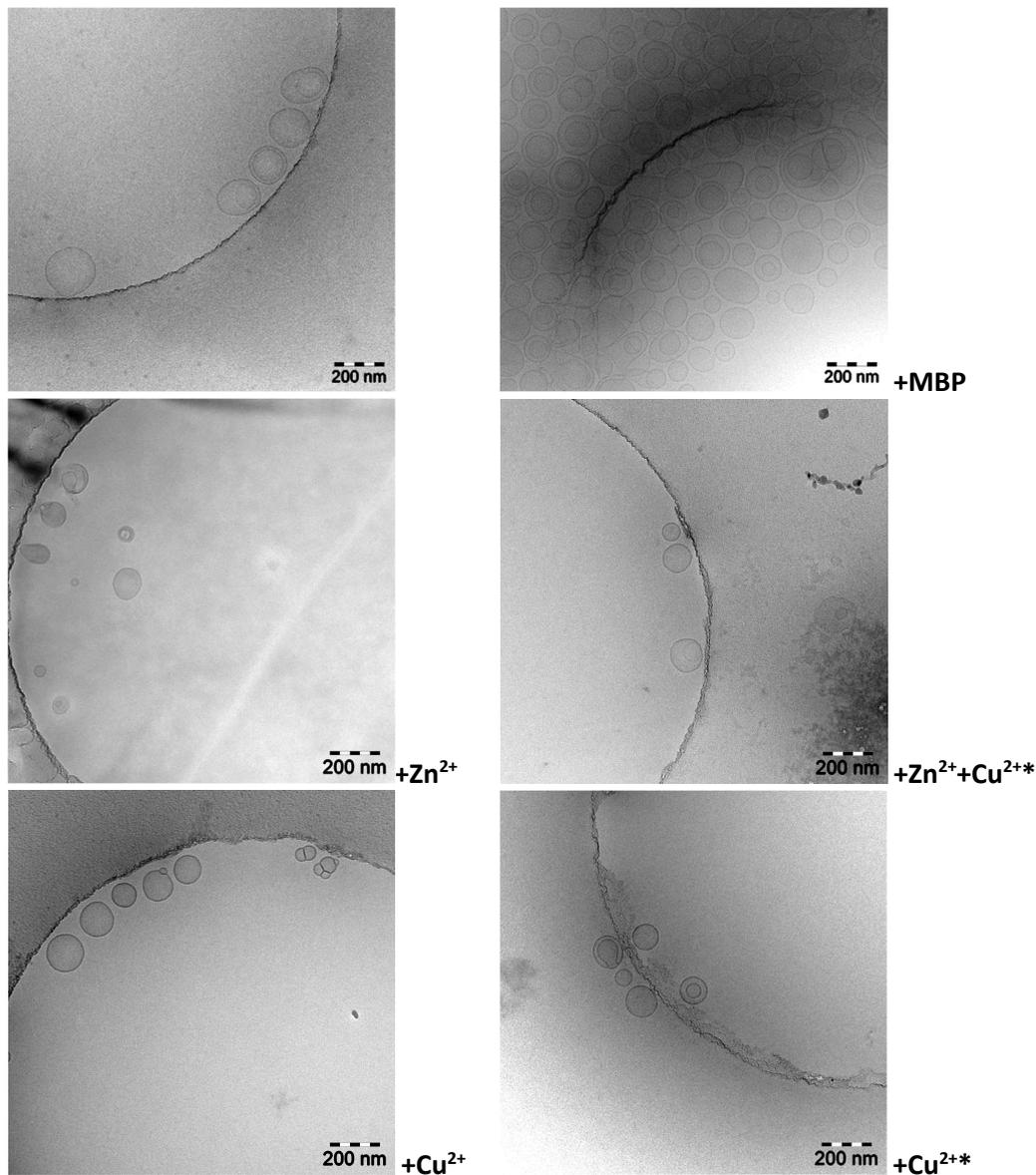


Abbildung 36: Kryo-TEM-Aufnahmen von myelinartigen Vesikeln ohne bzw. mit verschiedenen Zugaben von divalenten Metallionen oder MBP in einem HEPES-NaCl-Puffer. Zn²⁺= 50 μ M, Cu²⁺= 50 μ M, Cu²⁺= 14 μ M und 50 μ M Zn²⁺+14 μ M Cu²⁺.

Wenn MBP als Interaktionspartner zur Verfügung steht, sind die resultierenden Aufnahmen sehr unterschiedlich (Abbildung 37). Allgemein kann wieder festgestellt werden, dass in jeder Probe mit MBP eine Verklebung der Vesikel stattfindet. Allerdings variiert diese in der Art und Weise wie die Vesikel miteinander verbunden werden. Wie bereits in Kapitel 3.2.1.1 beschrieben, erhalten die Vesikel mit MBP, aber ohne Metallionen (Abbildung 36 rechts oben), ihre runde Form und berühren benachbarte

Vesikel nicht, sondern haben einen regelmäßigen Abstand zwischen zwei Membranen. Diese Regelmäßigkeit in Form und Abstand ist vermutlich günstig für ein homogenes Schichten der Myelinscheide.

Wenn Zink-Ionen hinzugefügt werden, werden die Vesikel in allen drei Fällen der Probenpräparation sehr stark deformiert (Abbildung 37, siehe auch Abbildung A21 für vergrößerte Ansicht), um eine möglichst große Kontaktfläche zu benachbarten Vesikeln zu ermöglichen. Jedoch gibt es Unterschiede zwischen den Pipettier-Varianten. Bei der Zugabe von Zink-Ionen und anschließend MBP berühren die Vesikel sich so stark, dass kein Freiraum zwischen den Lipiddoppelschichten erkennbar ist, es sind aber zwei definierte, separierte Doppelschichten vorhanden (Abb. 37 Pfeil A). Die Wasserschicht zwischen den Vesikeln scheint bis auf ein Minimum reduziert. An den Stellen, die in Kontakt mit einer benachbarten Doppelschicht stehen ist keine Krümmung erkennbar, es sind somit lineare Abschnitte. Dies ist auch der Fall in der (MBP+Zn²⁺)-Variante, jedoch sind dort auch teilweise Bereiche vorhanden, in denen keine zwei separierten Lipidschichten erkennbar sind (Abb. 37 Pfeil B). Außerdem behalten die Vesikel in beiden Fällen im Groben die anfängliche Größe bei. Wenn zuerst Metallionen mit den Lipiden interagieren können, ist aus mehreren Studien bekannt, dass die Abfolge der Wechselwirkung in zwei Schritten erfolgt [254]:

1. Elektrostatische Wechselwirkungen mit großer Reichweite können die lokale Konzentration von Ionen in der Nähe der Membranoberfläche stark erhöhen. Beispielsweise ziehen Lipide mit anionischen Kopfgruppen (Phosphoserin oder Phosphoinositol) Kationen in erheblichem Maße an [255].
2. Dringen Metallionen in den polaren Bereich der Membran ein und bilden Komplexe mit bestimmten Stellen aus. Die Art der Metallionenbindung betrifft vorzugsweise die Phosphodiester- und Carbonylgruppen, sowie das Wasser der Hydratationshülle der Lipide und Ionen [255].

Durch die Interaktion von Zink-Ionen mit der Lipiddoppelschicht kommt es somit zu Konformationsänderungen der Lipide, die eine Auswirkung auf die Bindung zu MBP haben, wie es auch hier beobachtet werden konnte. Wenn MBP und Zink-Ionen zunächst inkubiert werden, ist bekannt, dass diese die unstrukturierte Form von MBP in wässrigen Medium nicht verändern [77], somit keine Auswirkung auf die Sekundärstruktur des MBP haben. Jedoch wird nicht ausgeschlossen, dass Zink-Ionen trotzdem mit dem Protein interagieren [91]. Die ähnlichen TEM-Aufnahmen deuten rein optisch jedoch an, dass hier die Veränderung durch die Lipid-Ionen-Wechselwirkung dominiert.

Die MBP+Zn²⁺-Probe zeigt im Gegensatz zu den anderen beiden Varianten einen konsistenten Abstand zwischen den Vesikeln. Dieser ist jedoch nicht so weit wie bei den Experimenten ohne Metallionen. Eine Änderung ist ebenfalls, dass die Vesikel fusioniert sind zu größeren Gebilden, die einerseits weniger stark deformiert sind und andererseits gemeinsame Lipiddoppelschichten aufweisen. Die Verdichtung durch Zink spiegelt sich in

den Ergebnissen von Smith *et al.* [77] wieder, in deren Studie mittels ATR-FTIR-Spektroskopie unter anderem gezeigt wurde, dass bei Zugabe von Zink-Ionen zu membran-assoziierten MBP die Sekundärstruktur verändert wird, hin zu einer größeren α -Helizität. Wenn somit MBP bereits mit Lipiden wechselwirkt und Zink-Ionen hinzugegeben werden, ändert sich vermutlich hauptsächlich nur die Konformation des MBP, sodass die verankerten, gegenüberliegenden Lipidschichten näher zusammengezogen werden. Aber auch die Bildung eines Zink-Phosphat-MBP-Komplexes ist ein möglicher Mechanismus in der Verdichtung von Myelin und der Aufrechterhaltung seiner Integrität [88].

Die Zugabe von Zink-Ionen hat somit einen Einfluss auf das Bindungsverhalten zwischen MBP und LUVs. Jedoch ist dieses auch von der Interaktions-Reihenfolge abhängig. Es scheint, dass die Regelmäßigkeit in Form und Abstand durch Zink-Ionen größtenteils aufgehoben wird. Vor allem die Zn^{2+} -MBP-Variante ist vergleichbar mit den Kryo-TEM-Ergebnissen von 20% Cholesterolgehalt und MBP (Abbildung 22 links). Bei MS-Patienten wurde ein dramatischer Anstieg der Zinkspiegel in Erythrozyten beobachtet, möglicherweise aufgrund einer Störung der normalen Kompartimentierung von Zink während der Demyelinisierung [256]. Dies lässt vermuten, dass auch ein bestimmter Gehalt an Zink bzw. die Reihenfolge ein homogenes Stapeln der Myelinmembranen behindert. Auch die Konkurrenz um negativ geladene Lipide könnte eine Rolle spielen, da sowohl die Metall-Kationen als auch die positiven Ladungen des MBP präferiert mit diesen interagieren.

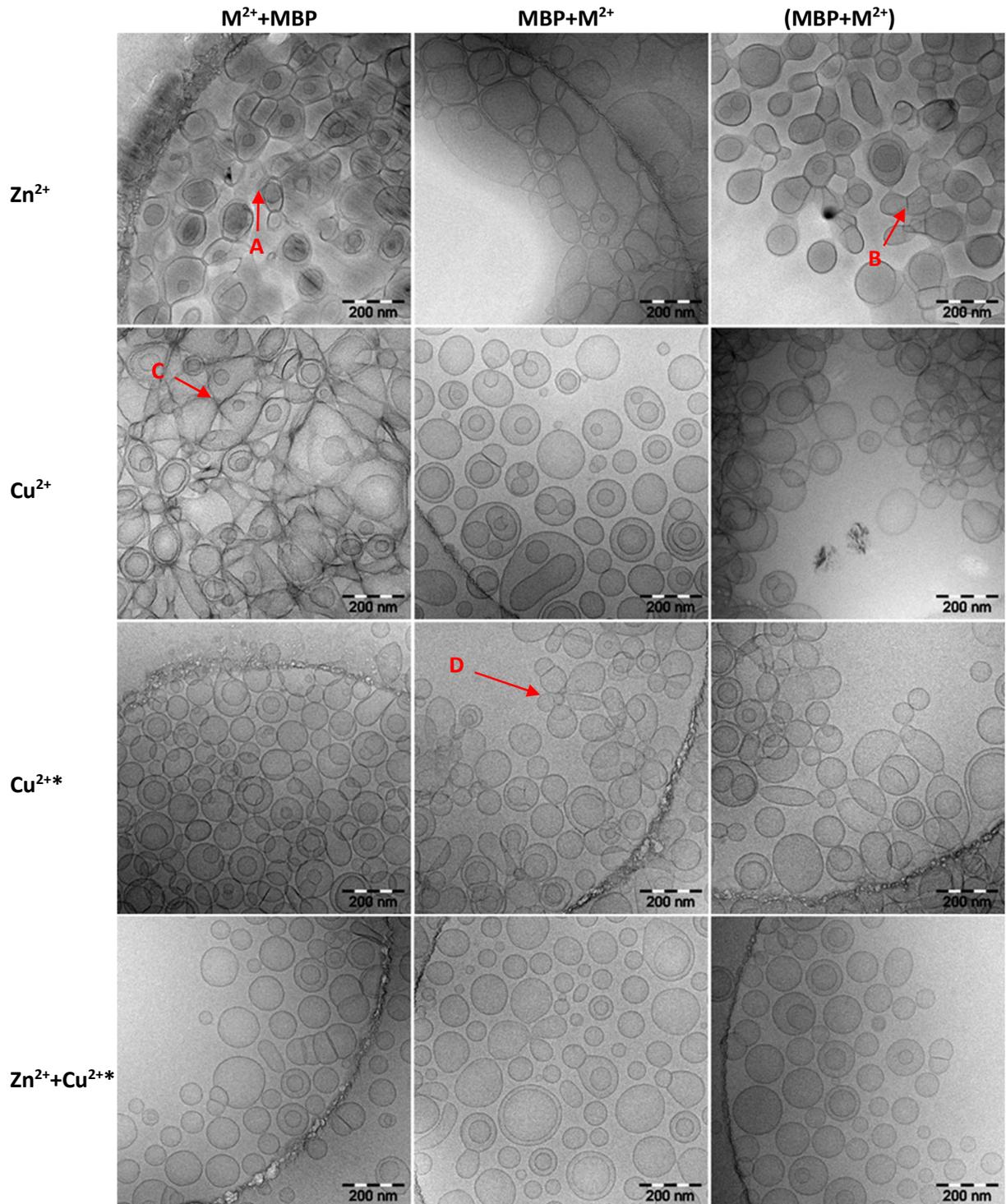


Abbildung 37: Kryo-TEM-Aufnahmen von Vesikeln mit 44% Cholesterolgehalt mit MBP und verschiedenen divalenten Metallionen. Es wurde in drei verschiedenen Reihenfolgen Protein und Metallionen hinzugegeben: Metallionen dann Protein ($M^{2+}+MBP$), Protein dann Metallionen ($MBP+M^{2+}$) oder Protein und Metallionen wurden inkubiert ($(MBP+M^{2+})$). Dabei stehen die Abkürzungen der Ionen für folgende Konzentrationen: $Zn^{2+}=50 \mu M$, $Cu^{2+}=50 \mu M$, $Cu^{2+*}=14 \mu M$. Die roten Pfeile markieren Bereiche mit besonderen Merkmalen, deren genauere Erläuterung im Text zu finden ist. Vergrößerte Ausschnitte der hier präsentierten Aufnahmen sind in A21 zu finden.

Die Zugabe von $50 \mu M$ Kupfer-Ionen ergibt ein anderes Resultat. Das markanteste ist, dass die Oberfläche der Vesikel in allen drei Proben rau erscheint (Abbildung 37, siehe

Abbildung A21 für vergrößerte Ansicht). Dies war bei den vorherigen Experimenten, selbst bei den LUVs ohne Protein (Abbildung 36), nicht zu beobachten. Nur die Kombination aus Kupfer und MBP resultiert in einer massiven topographischen Veränderung der Lipid-Oberfläche. Sicherlich wird auch die Topographie in Kombination mit Zink verändert, jedoch nicht in dem Maß, dass es deutlich in mikroskopischen Aufnahmen im Nanometer-Bereich erkennbar ist. Dies weist darauf hin, dass einerseits MBP und Kupfer eine andere Koordination einnehmen als MBP und Zink, welche eine andere Wechselwirkung mit der Lipiddoppelschicht bewirkt und andererseits sich die Lipid-Kupfer-Wechselwirkung im Vergleich zu Lipid-Zink unterscheidet. Dies ist nicht verwunderlich, da zum einen festgestellt wurde, dass die Aufnahmekapazität ($n(\text{Cu})=2$, $n(\text{Zn})=1$) für beide Ionen unterschiedlich ist und zum anderem die Koordinationsstrukturen (Zn: verzerrt tetraedrisch; Cu: verzerrt quadratisch planar [253]) sich unterscheiden, sowie die Bindungsaffinität mit MBP ($\text{Zn} < \text{Cu}$) [91]. In den vorangestellten DLS-Messungen wurde ebenfalls eine Veränderung der Vesikel-Oberfläche vermutet aufgrund der leicht erhöhten dynamischen Durchmesser mit $50 \mu\text{M Cu}^{2+}$ (Kapitel 3.2.2.1). Die Cu^{2+} +MBP-Variante zeigt neben Bereichen, die einen unregelmäßigen Abstand aufweisen, eine Verklebung der Vesikel an größeren punktuellen Bereichen (Abb. 37 Pfeil C). Durch das punktuelle Verbinden werden die Vesikel etwas lang- und breitgezogen und die ursprüngliche Krümmung ist nicht mehr vorhanden. Vergleichbar dazu ist die (MBP+ Cu^{2+})-Probe, die ebenfalls punktuell die benachbarten Vesikel verbindet, jedoch weniger stark wie die Cu^{2+} +MBP-Variante. Zudem ist die runde Form der Lipidschicht größtenteils intakt. Eine Studie über die Kupfer-induzierte Selbstorganisation von MBP in Lösung fand heraus, dass neben den zwei effizienten Kupferbindungsstellen, ein drittes Kupfer-Ion ab einer bestimmten Konzentration (MBP zu Cu^{2+} 1:3) zur Aggregation von MBP-Molekülen führt [32]. Dies konnte hier vernachlässigt werden, da das molare Verhältnis von MBP zu Cu^{2+} ($50 \mu\text{M}$) im Bereich von 1:2 liegt. Wenn zuerst MBP und danach Kupfer-Ionen hinzugegeben werden, sehen die TEM-Aufnahmen ähnlich zu denen ohne Metallionen aus. Die Vesikel sind rund und voneinander separiert, allerdings mit unregelmäßigen Abständen und einer rauen Oberfläche, im Allgemeinen aber geordneter als die anderen beiden Varianten. Auch bei Verwendung von Kupfer-Ionen spielt die Reihenfolge der Komponentenzugabe eine wichtige Rolle und rein optisch scheinen die beiden Varianten Cu^{2+} +MBP und (MBP+ Cu^{2+}) durch die Lipid-Ionen-Wechselwirkung dominiert zu werden. Alle drei Varianten verkleben die Vesikel, aber anders als ohne Metallionen.

Auch die Metallionensorte ist entscheidend: mit Kupfer scheint die Grundstruktur der Lipiddoppelschichten besser erhalten zu werden, jedoch wird die Topographie stark verändert; mit Zink scheint die Membrankrümmung stark beeinflusst, jedoch die Topographie unverändert. In beiden Fällen scheint es, als ob im ungebundenen, gelösten Zustand von MBP Bindungsstellen für Metallionen verfügbar sind, die im membran-assoziierten Zustand nicht zugänglich wären. In Kombination mit unterschiedlichen Lipid-Metallionen-Wechselwirkungen führt dies zu verschiedenen Resultaten der Gesamtanordnung von Lipiddoppelschichten und MBP. Mit beiden Metallionen konnte

eine Art Ordnungsgrad beobachtet werden, der in der Staffellung $M^{2+}+MBP > (MBP+M^{2+}) > MBP+M^{2+}$ zunimmt. Ein hoher Ordnungsgrad herrscht, wenn die ursprüngliche Krümmung der Vesikel erhalten bleibt und die Kontaktflächen minimal sind.

Da Kupfer-Ionen zu einem geringeren Anteil (im Vergleich zu Zink-Ionen) im Myelin vorhanden sind, wurden die selben Experimente mit einer verringerten Kupfer-Ionenkonzentration (14 μM , im Folgenden mit Cu^{2+*} abgekürzt) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass alle drei Varianten sich sehr ähnlich sehen und nur minimale Unterschiede aufweisen. Bei allen Proben sind runde Vesikel mit einer leicht angerauten Oberfläche zu beobachten, die sich teilweise punktuell berühren. Die Abstände zwischen den Vesikeln sind unregelmäßig. Die Varianten $MBP+\text{Cu}^{2+*}$ und $(MBP+\text{Cu}^{2+*})$ zeigen zudem langgezogene Vesikel auf, die von einem Vesikel ausgehen und im Gesamtbild eine „Blume“ ergeben (Abb. 37 Pfeil D). Mit einer verminderten Konzentration an Kupfer-Ionen scheint die Reihenfolge der Zugabe das Bindungsverhalten weniger zu beeinflussen. Dies liegt womöglich schlicht an der geringeren Konzentration, da die Aufnahmen eine Mittelung des Verhaltens aus beeinflussten und unbeeinflussten MBP oder Lipiden zeigt. Trotzdem hat die geringere Kupferkonzentration einen Einfluss auf die Rauigkeit der Lipiddoppelschicht und das Bindungsverhalten zwischen MBP und Lipiden. Denn, obwohl die Rauigkeit der Vesikeloberfläche enorm abgenommen hat im Vergleich zu 50 μM Cu^{2+} ist diese nicht verschwunden und durch die Verklebung sind die Vesikel weniger deformiert als ohne Metallionen.

Da sowohl Zink- als auch Kupfer-Ionen einen solch starken Effekt auf die Interaktion von MBP mit den LUVs haben und in der natürlichen Umgebung von MBP auch zusammen existieren, wurde untersucht, wie beide Metallionen simultan wirken. Dazu wurde eine Mischung aus 50 μM Zn^{2+} und 14 μM Cu^{2+} verwendet, um das natürliche Verhältnis widerzuspiegeln. Die Kryo-TEM-Aufnahmen zeigen interessante Resultate (Abbildung 37, siehe Abbildung A21 für vergrößerte Ansicht). In der $M^{2+}+MBP$ -Variante ist deutlich die raue Oberfläche der Vesikel zu beobachten, in den anderen beiden Varianten hingegen nicht. Alle drei Varianten zeigen runde Vesikel, die unterschiedliche Abstände voneinander haben. In Variante $M^{2+}+MBP$ und $MBP+M^{2+}$ sind die Vesikel auch über punktuelle Kontaktflächen verbunden, die mit einer Deformation einhergehen. Die $(MBP+M^{2+})$ -Probe zeigt die höchste Übereinstimmung mit der Probe ohne Metallionen. Im Allgemeinen scheinen alle drei Varianten mit der Kombination aus Zink- und Kupfer-Ionen geordneter zu sein als die restlichen Metallionen-Proben. Die Aufnahmen mit Cu^{2+*} sehen den Aufnahmen von $\text{Zn}^{2+}+\text{Cu}^{2+}$ ähnlicher als die Aufnahmen mit Zn^{2+} . Dies in Kombination mit der teilweise sichtbaren rauen Oberfläche lässt vermuten, dass Kupfer-Ionen die Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen MBP und LUVs dominiert. Dies steht in Übereinstimmung sowohl mit den Ergebnissen von Riccio *et al.* [88], wonach Kupfer-Ionen die Bindung von Zink-Ionen zu hemmen scheint und Berlet *et al.* [91], wonach die Bindungsaffinität zu MBP bei Kupfer größer ist als bei Zink, als auch mit den

Resultaten der vorherigen Zeta-Potential-Analyse in Kapitel 3.2.2.2. Kupfer scheint Zink, im Fall von MBP, mit hoher Effizienz zu ersetzen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Messungen mit MBP und Metallionen zu einer Aggregation der Vesikel führt, aber im Vergleich zu der Messung ohne Metallionen unterschiedliche Verklebungsverhalten zeigen. Zudem zeigen Zink- und Kupfer-Ionen sehr divergierende Ergebnisse. Die Reihenfolge in der die Zugabe von Protein und Ionen erfolgt spielt eine große Rolle. Das Resultat hängt somit davon ab, ob zuerst das Protein oder die Metallionen mit den negativen Lipiden der Vesikel interagieren können oder ob MBP und Metallionen eine fertige Konformation bilden. Ohne Protein sind jedoch keine Unterschiede erkennbar. Dies kann entweder an der Auflösungsgrenze des Mikroskops liegen, da die Veränderungen nur minimal sind oder die Lipiddoppelschicht interagiert mit beiden Ionensorten gleich.

3.2.2.4 Untersuchungen des spinmarkierten PC mittels EPR-Spektroskopie

Für Messungen mittels EPR-Spektroskopie wurde TempoPC (Abbildung 38, auch T-PC genannt) als spinmarkiertes Lipid verwendet. CSOSL wurde für diese Studie nicht weiterverwendet, da die Zugabe von Zinkchlorid keine signifikanten Unterschiede in der Spektrenform induzierte. Es wird vermutet, dass Zink-Ionen nicht spezifisch genug mit Cholesterol interagieren, sondern eher globulär mit der Lipidoberfläche wechselwirken.

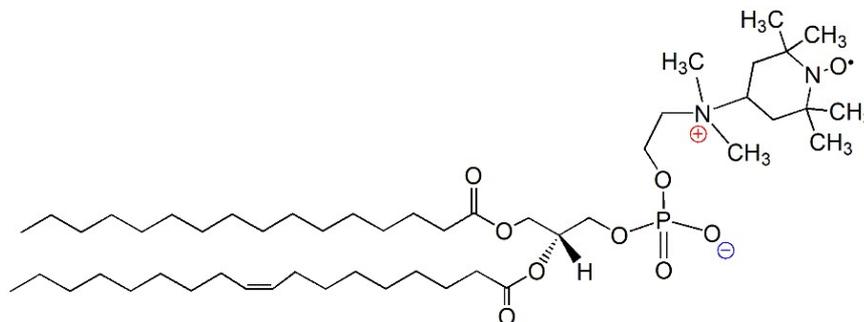


Abbildung 38: Chemische Struktur des spinmarkierten Phosphatidylcholins, TempoPC.

Das TEMPO-Radikal befindet sich an der Kopfgruppe eines 16:0-18:1-PC-Moleküls. Es wurde gewählt, da einerseits ein numerisch häufiges Lipid aus der ungeordneten Phase (außerhalb der Cholesterol-rafts) benötigt wurde und andererseits die beiden Kohlenwasserstoffsegmente die häufigsten in dem kommerziell erworbenen PC waren. Die Kopfgruppenposition der Spinmarkierung sollte eine gute Übersicht über eventuelle Oberflächenveränderungen und Interaktionen mit MBP liefern [36]. Zudem sollte die eigentliche Position in der Lipiddoppelschicht sowie Struktur und Funktion des Lipides nicht beeinflusst werden [257,258]. Alle folgenden EPR-spektroskopischen Experimente wurden bei X-Band-Mikrowellenfrequenzen (9,4 GHz) durchgeführt. In diesem

Messverfahren werden nur Zink-Ionen vermessen, da Kupfer-Ionen paramagnetisch sind und spezifisch die Veränderung am Lipid untersucht werden soll.

3.2.2.4.1 Continuous wave EPR

Mittels *continuous wave* (cw)-EPR-Spektroskopie können Informationen über die Lösungsmittelzugänglichkeit, die Abstände zu anderen paramagnetischen Zentren, die Beweglichkeit des Spinlabels und die Polarität der Mikroumgebung des Spinlabels erhalten werden. Dabei wird bei einer konstanten Mikrowellenfrequenz das äußere Magnetfeld variiert und die Aufzeichnung der reflektierten Mikrowellenleistung als Funktion des Magnetfelds ergibt das cw EPR-Spektrum. Alle Proben enthielten 2,2% TempoPC und der PC-Anteil wurde um die entsprechende spinmarkierte PC-Menge verringert.

Myelinartige LUVs mit und ohne MBP

In Abbildung 39 sind die temperaturabhängigen cw EPR-Spektren von LUVs in Ab- und Anwesenheit von MBP dargestellt. Diese zeigen ein typisches drei-Linien-Muster entsprechend des Nitroxid-Labels und eine eindeutige Inkorporation des PC-Lipids in die Lipiddoppelschicht [259,260] (siehe zum Vergleich Spektrum einer reinen TempoPC-Probe A22a). Beide Proben sehen sich sehr ähnlich, wobei das Signal/Rausch-Verhältnis bei den LUVs mit MBP schlechter ist. Der kleine Peak bei 336,4 mT entsteht nicht durch die Probe, sondern resultiert aus Fehlstellen im Quarz der Probenkapillare. Mit zunehmender Temperatur ändert sich die Linienform (anisotrop, axial).

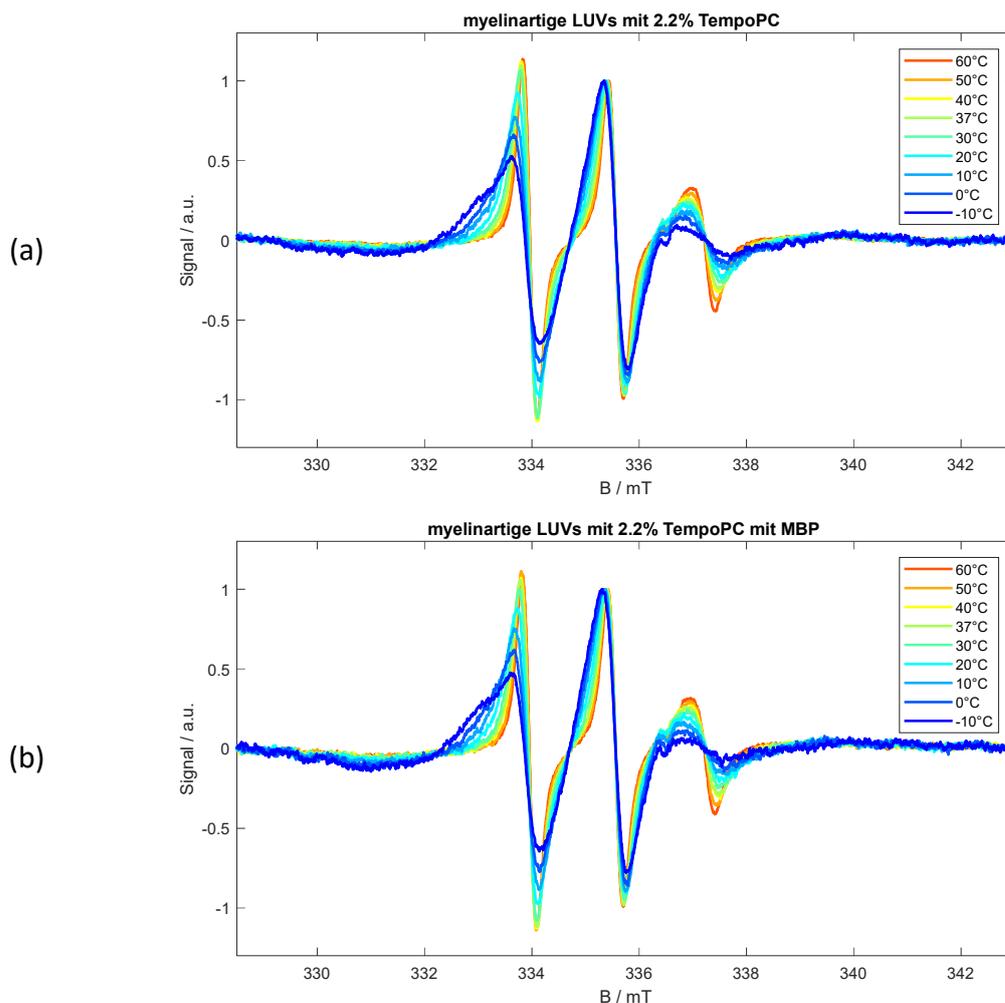


Abbildung 39: Temperaturreihen von X-Band-cw-EPR-Spektren von myelinartigen LUVs mit 2,2% TempoPC normiert auf Mittelfeld-Peak (a) ohne und (b) mit MBP in einem HEPES-NaCl-Puffer (jeweils 8-16 Scans, gemessen bei -10 °C bis 60 °C, MW-Leistung 10 dB, Mittelfeld 336 mT, Scanbreite 15 mT, Modulationsamplitude 0,2 mT). Bei 336,4 mT ist das Signal der Fehlstellen der Quarzkapillare.

Polare Lösungsmittel neigen dazu, die Spindichte auf den Stickstoffkernen zu erhöhen und daher den A_{zz} -Wert (z-Komponente des Hyperfeintensors) zu erhöhen. Die scheinbare, isotrope Hyperfeinkopplungskonstante $a_{iso,app}$ wurde direkt aus den EPR-Spektren entnommen und zeigt ein Abnehmen der Umgebungspolarität mit steigender Temperatur für Proben mit und ohne MBP (Abbildung 40). Eine Abnahme der Hyperfeinaufspaltung kann ein Hinweis auf eine erhöhte Fließfähigkeit der Lipide sein [261], die mit einer ungeordneteren flüssig-kristallinen Phase bei höheren Temperaturen korrelieren würde. Bei tieferen Temperaturen von -10 °C bis 15 °C sind kleinere Unterschiede zu erkennen, die sich mit steigender Temperatur relativieren. Aus dem Temperaturverlauf kann auf keine Phasenumwandlungstemperatur geschlossen werden. Dies ist verblüffend, da bekannt ist, dass Wasser- und Hydratationsprozesse stark mit der Ordnung in den Kopfgruppen zu korrelieren scheinen, wie Elektronenspinresonanz-Experimente bestätigen [262] und im Bereich der Übergangstemperatur die Phospholipide eine

Abnahme der Kopfgruppenordnung und auch in den Kohlenwasserstoffketten eine induzierte Störung erfahren [216].

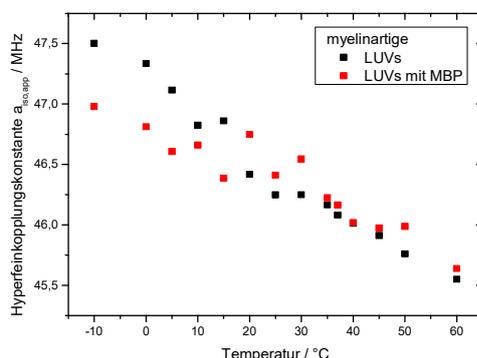


Abbildung 40: Scheinbare isotrope Hyperfeinkopplungskonstante $a_{\text{iso,app}}$ von myelinartigen LUVs, die 2,2% TempoPC enthalten, ohne und mit MBP in Abhängigkeit der Temperatur. Die LUV-Proben wurden bei X-Band-Frequenzen in einem HEPES-NaCl-Puffer und mit einem Lipid/Protein-Verhältnis von 567:1 vermessen.

Bei Mobilitätsbetrachtungen von LUVs mit TempoPC in Gegenwart und Abwesenheit von MBP geht hervor, dass nur sehr geringe Unterschiede zu detektieren sind. Die Mobilität der polaren Kopfgruppen wird durch die Parameter h_0/h_- (Höhenverhältnis des Mittel- zu Hochfeldpeaks) und ΔH_+ (Peak-zu-Peak-Abstand des Tieffeldpeaks) beschrieben (siehe Abbildung 41). Die Verringerung beider Parameter steht für eine Vergrößerung der Bewegungsfreiheit der Kopfgruppe [257–259].

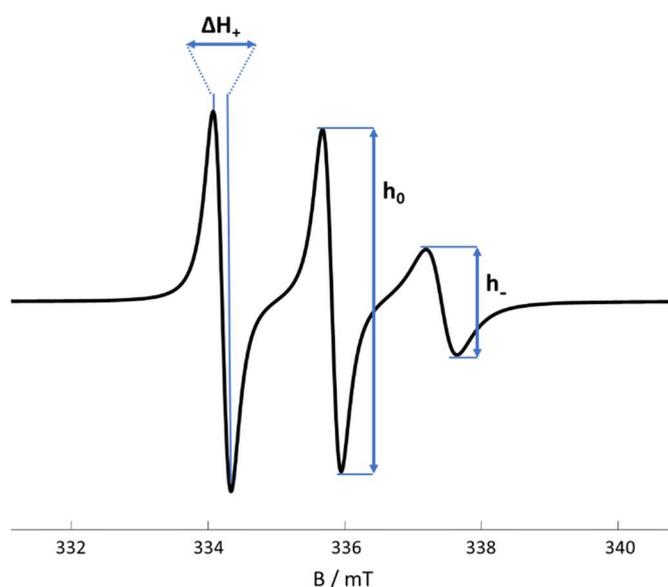


Abbildung 41: EPR-Spektrum (vereinfachte Darstellung) für die Beschreibung der verwendeten Mobilitätsparameter h_0/h_- (Höhenverhältnis des Mittel- zu Hochfeldpeaks) und ΔH_+ (Peak-zu-Peak-Abstand des Tieffeldpeaks).

In Abbildung 42 sind die zwei Parameter für LUVs mit und ohne MBP bei Temperaturen von 20 °C, 37 °C und 50 °C dargestellt. Allgemein sinken die Werte einer Probe mit steigender Temperatur. Beim Vergleich der Proben von LUVs mit und ohne Protein fällt auf, dass die Werte mit MBP erhöht sind. Die Anisotropie der Bewegung der Nitroxideinheit wird vergrößert, dies kann interpretiert werden als Verringerung der Bewegungsfreiheit des TempoPC durch den Einbau von MBP.

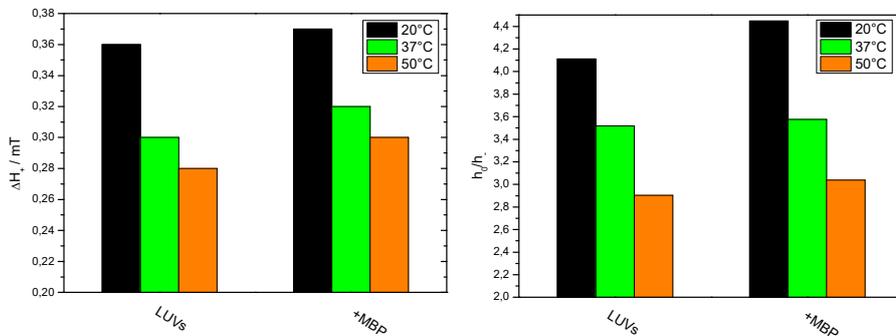


Abbildung 42: EPR-Spektralparameter der TempoPC-Spin-Sonde gemessen für myelinartige LUVs in Gegenwart und Abwesenheit von MBP bei 25 °C, 37 °C und 50 °C. h_0/h_+ ist das Verhältnis der Höhe von Mittel- und Hochfeldpeak und ΔH_+ ist die Peak-zu-Peak-Breite der Tieffeldlinie der cw Spektren.

Aus Simulationen der Spektrenformen mittels dem Softwarepaket EasySpin [231] können die Rotationskorrelationszeit τ_{corr} und der Rotationsdiffusionstensor D der Spinsonde bestimmt werden. Der molekularen Diffusionsrahmen der Nitroxideinheit (siehe Abbildung 13 in Kapitel 2.5.3.1) besteht aus der x-Achse entlang der N-O-Bindung, die z-Achse verläuft parallel zu den $2p_z$ -Orbitalen des Stickstoffs und Sauerstoffs, die das ungepaarte Elektron enthalten und die y-Achse verläuft senkrecht zur xz-Ebene. Alle Spektren wurden unter Verwendung des gleichen g-Tensors simuliert und die Diffusionstensorelemente für die Rotation senkrecht zur Hauptachse sind auf $D_{xx}=1,2 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ und $D_{yy}=1,5 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ festgelegt (für LUVs ohne Zink-Ionen). Generell sind vertikale Vibration parallel zur Membrannormalen, laterale Diffusion in der Ebene und Rotationen der Kopfgruppe als Bewegungen der Lipide im beobachtbaren Zeitfenster (10^{-9} - 10^{-7} s) möglich [233].

Bei den temperaturabhängigen Rotationskorrelationszeiten τ_{corr} in Abbildung 43a sind nur sehr geringe Unterschiede zwischen Proben mit und ohne MBP zu beobachten. MBP scheint eine geringe Behinderung der Mobilität zu verursachen, da die Bewegung etwas langsamer ist, aber der generelle Verlauf von zunehmender Rotation mit steigender Temperatur ist identisch mit Proben ohne Protein. Das PC erfährt somit durch den Einbau von MBP eine Restriktion im Kopfgruppenbereich, jedoch dominiert die Kristallin/Gel-zu-flüssig-Transformation der Lipidphase die temperaturinduzierte Bewegung. Es deutet sich eine maximale τ_{corr} bei 60 °C an. Im Vergleich zu den Korrelationszeiten von CSOSL ist die Mobilität von TempoPC viel größer (8-2 ns vs. 3-0,8 ns). Dies ist durch die Position der Kopfgruppe in der Doppelschicht begründbar (obwohl beide Spinmarkierungen an der

Kopfgruppe sitzen), da die Cholin-Gruppe direkt an der Wassergrenzfläche sitzt im Vergleich zu der Hydroxylgruppe des Cholesterols, welches etwas tiefer Richtung Doppelschichtzentrum (auf Höhe der Phosphat-Gruppe) lokalisiert ist (siehe Abbildung 6). Das Tempo-Molekül am PC befindet sich durchschnittlich 5 Å über der Lipidphosphatkopfgruppe [263]. Die Tempo-Markierung des PC ist somit nur von der umgebenden wässrigen Phase und benachbarten Lipid-Kopfgruppen beeinträchtigt, wohingegen CSOSL durch die Kopfgruppen vom Wasser abgeschirmt wird. Eine direkte Interaktion von MBP mit den PC-Kopfgruppen ist hier unwahrscheinlicher, da ansonsten größere Differenzen sichtbar sein sollten. Zudem haben vorherige Studien mit Vesikeln ebenfalls keine signifikanten Interaktionen gezeigt [264,265].

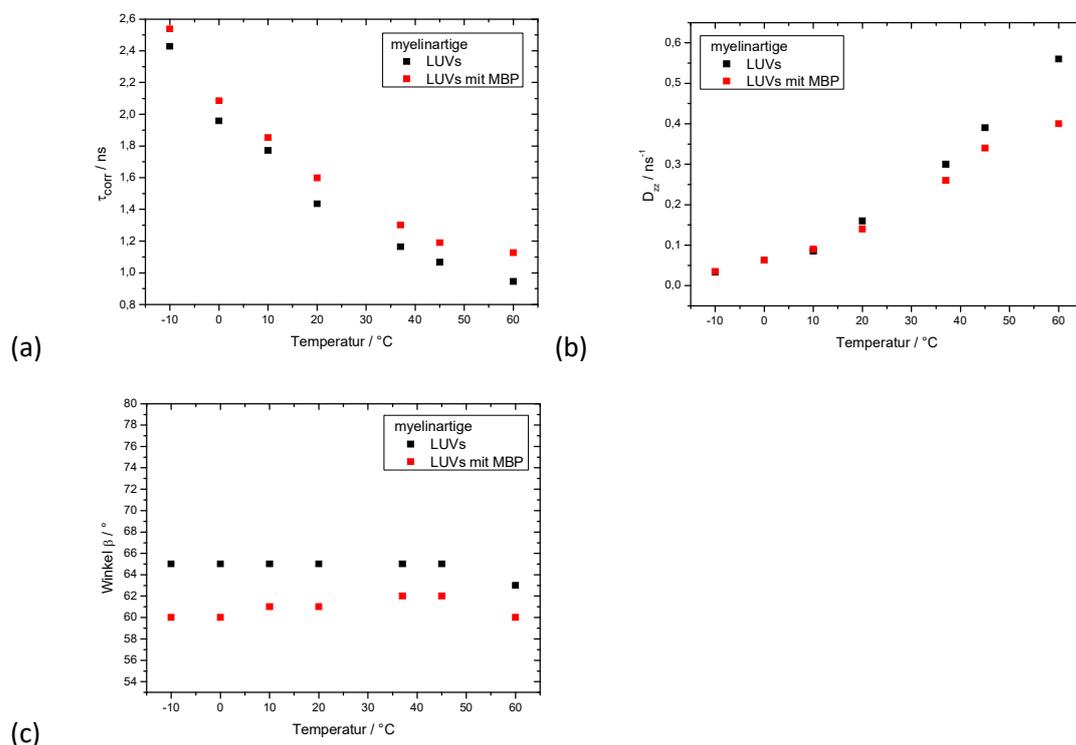


Abbildung 43: Temperaturabhängigkeit von (a) Rotationskorrelationszeit τ_{corr} , (b) Rotationsdiffusionstensorelement D_{zz} und (c) Euler-Winkel β von 2,2% TempoPC in myelinartigen LUVs ohne (schwarz) und mit MBP (rot) in einem HEPES-NaCl-Puffer, erhalten durch Simulation von cw EPR-Spektren.

Die Rotationskorrelationszeit ist abhängig von der Diffusionsrate D und dem Euler-Winkel β . Die Analyse des Diffusionstensorelementes D_{zz} ergab, dass die Rotation entlang der z-Achse mit steigender Temperatur, mit und ohne Protein, zunimmt (Abbildung 43b). Mit zunehmender Temperatur nimmt die Packung der Lipide (wie aus vorherigen Studien mittels des Ordnungsparameters berichtet [260]) ab und die Rotationsfrequenz D_{\perp} nimmt stetig zu, was typisch für Lipide in der flüssig-ungeordneten Phase ist [266]. Mit MBP ist die Frequenz jedoch ab 20 °C geringer als ohne MBP. Unterhalb von 20 °C ist die allgemeine Bewegung der Lipide vermutlich durch die energetisch eingeschränkte Gel-Phase zu stark behindert, als das Unterschiede detektiert werden können [233]. Durch die

Betrachtung des Euler-Winkels β (Diffusionsneigungswinkel, Abbildung 43c) wird deutlich, dass sich die Reorientierungsrate mit der Temperatur nicht stark ändert und ein Maximum bei 37 °C mit MBP erreicht, ohne MBP sind die Werte bis 45 °C konstant (temperaturstabil). Der β -Winkel wird überwiegend für die Betrachtung der Kettensegmente verwendet. Für eine optimierte Anpassung von Simulation und Messung musste dieser Winkel auch für das genutzte TempoPC etabliert werden. Die Unterschiede sind im Vergleich zu Spinmarkierungen an Kettensegmenten [232,257–259] viel geringer, dies könnte daran liegen, dass die *wobbling*-Bewegung von den Ketten ausgelöst wird und die Kopfgruppe nur die Übertragung davon wahrnimmt. Die Veränderung des Winkels (klassisch Kegelstumpf-Winkels) kann auch unabhängig von den Lipidketten sein und nur durch die taumelnde Rotation des Tempo- oder Tempo-Cholin-Restes hervorgerufen werden, welche durch ionische Bindungen restringiert werden kann. Eindeutig ist, dass mit MBP der Winkel kleiner ist im Vergleich zu reinen LUVs und größer wird bis 37 °C, was eine niedrigere Ordnung der Kopfgruppen bei geringeren Temperaturen vermuten lässt. Oberhalb von 45 °C (flüssig-kristallinen Phase) sinken die Winkel-Werte mit und ohne MBP. Beide Parameter τ_{corr} und β zeigen einen leichten Versteifungseffekt von MBP im Kopfgruppenbereich.

Myelinartige LUVs in Kombination mit Zink-Ionen und MBP

Die temperaturabhängigen cw EPR-Spektren der LUVs mit Zink-Ionen (mit und ohne MBP) gleichen in Form und Verhalten den in Abbildung 39 dargestellten Spektren ohne Zink-Ionen (siehe Anhang A22b). Die Zugabe von Zink-Ionen bewirkt zunächst keine offensichtliche Veränderung der Spektren. Im Folgenden werden nun wieder dieselben Parameter ($a_{\text{iso,app}}$, τ_{corr} , D_{zz} , ΔH_+ , h_0/h_- , β) wie zuvor betrachtet.

Vergleicht man zunächst die Zugabe von Zink-Ionen zu LUVs ohne Protein wird ersichtlich, dass die spektralen Parameter ΔH_+ und h_0/h_- alle niedriger sind als die Werte von reinen LUVs (Abbildung 44). Dies würde bedeuten, dass die Bewegungsfreiheit der Nitroxideinheit in Gegenwart von Zink-Ionen zunimmt. Bei Betrachtung der Umgebungspolarität mittels $a_{\text{iso,app}}$ kann jedoch kein Unterschied festgestellt werden (Abbildung 45), obwohl Zink-Ionen die Oberflächen von Vesikeln aus Phospholipiden durch Dehydrierung hydrophober macht [267]. Dies lässt vermuten, dass die divalenten Zink-Ionen mit der Lipiddoppelschicht interagieren (vorzugsweise mit den negativ geladenen Lipiden PS und PI) und daraus eine Veränderung der LUV-Oberfläche resultiert, wobei TempoPC nur indirekt die Auswirkungen spürt und nicht direkt beteiligt ist. Dabei wäre eine mögliche Veränderung die teilweise Reorganisation der Lipide, so dass mehr Platz im Kopfgruppenbereich entsteht durch teilweise Kondensation der Lipide, Verdichtung oder Krümmung der Doppelschicht. Eine teilweise stärkere Krümmung würde zu einer höheren Wasserexposition führen, was hier nicht beobachtet werden konnte aufgrund der gleich bleibenden Hydrophobizität (möglicherweise über höhere

Mikrowellenfrequenzen (34 GHz; Q-Band) ermittelbar). Kondensation oder Verdichtung würde nicht unbedingt die Umgebungspolarität ändern, aber in den nicht-kondensierten Bereichen würde mehr Platz zur Verfügung stehen und somit auch eine größere Bewegungsfreiheit ermöglichen. Dies würde die Vermutungen von Riccio *et al.* [268] unterstützen, Zink-Ionen könnten, wenn MBP nicht vorhanden ist, einige der Restlipide in eine geordnete, kompakte Lamellenphase kondensieren. Auch Garcia-Manyes *et al.* [269] stützen die Beobachtung einer höheren Membranstabilität, die durch kraftspektroskopische Messungen erhalten wurde, auf eine Struktur mit höherer Ordnung, die durch Ionen auf der Doppelschicht gefördert wird und zu einer Verringerung der durchschnittlichen Fläche pro Lipid (höhere Kompaktheit) sowie zu einer steiferen Struktur (niedrigerer Diffusionskoeffizient) führt.

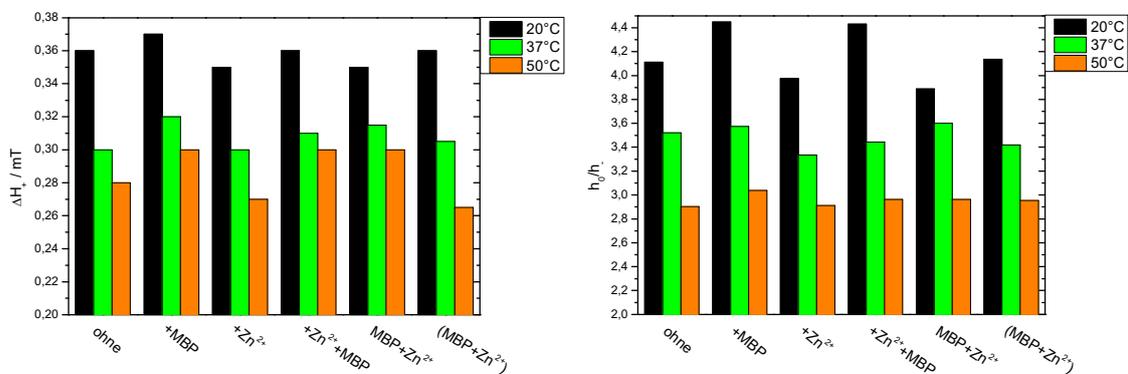


Abbildung 44: EPR-Spektralparameter der TempoPC-Spin-Sonde gemessen für myelinartige LUVs in Gegenwart und Abwesenheit von MBP und Zink-Ionen bei 25 °C, 37 °C und 50 °C. h_0/h_+ ist das Verhältnis der Höhe von Mittel- und Hochfeldpeak und ΔH_+ ist die Peak-zu-Peak-Breite der Tieffeldlinie der cw Spektren.

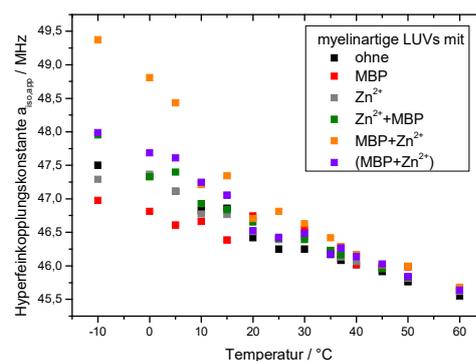


Abbildung 45: Scheinbare isotrope Hyperfeinkopplungskonstante $a_{iso,app}$ von myelinartigen LUVs, die 2,2% TempoPC enthalten, ohne und mit MBP bzw. Zink-Ionen in Abhängigkeit der Temperatur. Die LUV-Proben wurden bei X-Band-Frequenzen in einem HEPES-NaCl-Puffer und mit einem Lipid/Protein-Verhältnis von 567:1 vermessen.

Aus der Rotationskorrelationszeit (Abbildung 46a) der simulierten Spektren ist keine Veränderung zu den reinen LUV-Proben zu erkennen, jedoch zeigt der Euler-Winkel β einen klaren temperaturabhängigen Unterschied (Abbildung 46b). Die Winkel für Proben mit Zink-Ionen sind allgemein größer als bei reinen LUV-Proben. Zudem haben Zn^{2+} einen

größeren Effekt auf β bei niedrigen Temperaturen (Gelphase). Diese Tendenz stimmt mit den Ergebnissen von Gacia-Manyes *et al.* [216] überein, die mittels Rasterkraftmikroskopie einen offensichtlicheren Ionen-induzierten Unterschied in der Gelphase von Phosphatidylcholinen beobachten konnte. Vermutlich ermöglichen die geringeren Abstände in der Gelphase es den Kationen noch mehr laterale Wechselwirkungen zwischen benachbarten Molekülen zu verstärken. Dies bedeutet, dass die freiere Bewegung mit einer anderen Orientierung der Tempo-Markierung, ausgelöst durch Zink-Ionen, zusammenhängt. Außerdem lässt das Abflachen der Winkeldifferenz ab 37 °C auf einen Lipidphasenübergang schließen.

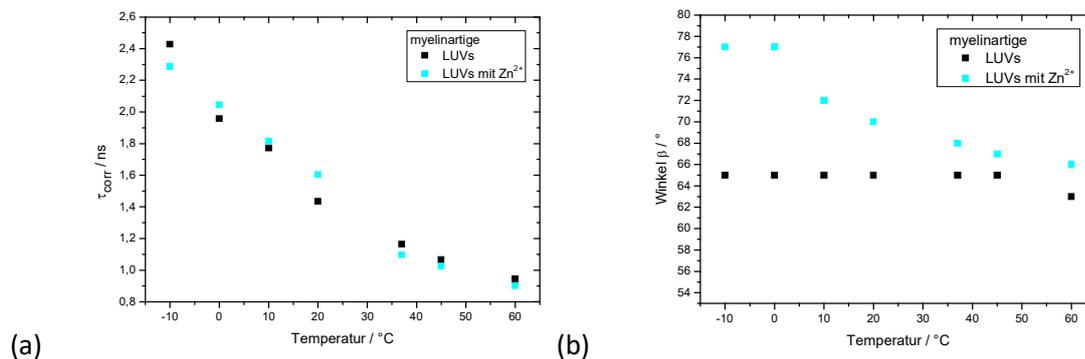


Abbildung 46: Temperaturabhängigkeit von (a) Rotationskorrelationszeit τ_{corr} und (b) Euler-Winkel β von 2,2% TempoPC in myelinartigen LUVs ohne (schwarz) und mit Zink-Ionen (blau) in einem HEPES-NaCl-Puffer, erhalten durch Simulation von cw Spektren.

Bei der Untersuchung der Proben mit MBP und Zink-Ionen mittels cw EPR-Spektroskopie lässt sich feststellen, dass die Reihenfolge der Zugabe der beiden Komponenten eine Rolle spielt. Die Umgebungspolarität des Tempo-Moleküls nimmt bei allen Proben mit steigender Temperatur ab (Abbildung 45) und ab 37 °C sind die Kopplungskonstanten identisch mit allen anderen Proben. Bei niedrigeren Temperaturen (<20 °C) zeigen MBP+ Zn^{2+} und (MBP+ Zn^{2+}) die größten Differenzen zu LUVs mit MBP oder LUVs mit Zn^{2+} auf und deuten auf einer erniedrigte Hydrophobizität hin. In der flüssig-kristallinen Phase scheint somit die Lösungsmittelzugänglichkeit bei allen Proben gleich zu sein, aber in den geordneteren Lipidphasen scheint der Einfluss durch Zink größer zu sein. Die Nitroxideinheit scheint von mehr Wasser umgeben zu sein.

In Abbildung 44 sind die spektralen Mobilitätsparameter vergleichend für alle Proben mit Zink-Ionen bei 20 °C, 37 °C und 50 °C dargestellt. Die Zugabe von Zink-Ionen zu einer LUV-MBP-Probe bewirkt eine Verringerung der Parameter bei 20 °C, bei 37 °C und 50 °C sind die Werte jedoch fast identisch. Dies bedeutet, dass vermutlich eine Phasenumwandlung der Lipide zwischen 20 °C und 37 °C stattfindet und im ungeordneten fluiden Zustand Zink-Ionen die Mobilität nicht beeinflussen, wenn MBP sich zuerst an die Lipiddoppelschicht binden kann. Zusätzlich wird unterhalb der Phasenübergangstemperatur die Mobilität

vergrößert. Es wurde gezeigt, dass Zink-Ionen eine geordnete Sekundärstruktur bei MBP induzieren, wenn dieses membranassoziiert ist [77], deshalb wird vermutet, dass die Zink-Ionen hauptsächlich mit MBP interagieren und Lipidkoordination eine geringere Rolle spielt. Wenn zu einer LUV-Zn²⁺-Probe (mehr Bewegungsfreiheit) MBP hinzugegeben wird und sich MBP in die Lipiddoppelschicht einbaut, sinkt die Bewegungsfreiheit des Tempo-Moleküls, da die Werte für ΔH_+ und h_0/h_- steigen (wie bereits für LUV+MBP beobachtet). Die Werte sind jedoch leicht niedriger als ohne Zink-Ionen. Dies kann zum einen an der beweglicheren Ausgangssituation liegen und MBP baut sich genauso ein wie zuvor, durch die Kondensation/Verdichtung bleibt trotzdem mehr Platz zur Verfügung. Zum anderen könnte sich durch die von Zn²⁺ belegten negativ geladenen Lipide weniger MBP einbauen, weshalb TempoPC mehr Platz zur Verfügung hätte oder MBP wechselwirkt mit den oberflächennahen Zink-Ionen und bildet eine Konformation, die weniger Platz benötigt. Die Inkubation von MBP mit Zink-Ionen resultiert in einer Abnahme der Mobilitätsparameter im Vergleich zu LUV+MBP-Proben. Dies bedeutet, dass die Bewegung der Nitroxideinheit freier ist. Dies ist begründbar durch eine Konformationsordnung des Proteins, die weniger Platz in der Doppelschicht einnimmt. Bei 20 °C ähneln sich Zn²⁺+MBP und (MBP+Zn²⁺) mehr als MBP+Zn²⁺ und spiegeln das Verhalten in den TEM-Aufnahmen (Abbildung 37) wieder, bei denen vorgeschlagen wurde, dass die Lipid-Ionen-Wechselwirkung dominiert. Dazu würden auch die Tendenzen der Bewegungsfreiheiten der Proben passen, da die Zn²⁺+MBP- und (MBP+Zn²⁺)-Varianten eine eingeschränktere Bewegung aufweisen als MBP+Zn²⁺. Ebenso würde die höhere Umgebungspolarität der MBP+Zn²⁺-Probe bei niedrigen Temperaturen eine freiere Bewegung unterstützen.

Durch Simulation der Spektren werden die Rotationskorrelationszeit, das Rotationsdiffusionstensorelement D_{zz} und der Euler-Winkel β bestimmt. Die Analyse der Korrelationszeiten ergab, dass mit steigender Temperatur die Rotation schneller wird und sich ab 37 °C ein Plateau ausbildet (Abbildung 47a), was auf eine Phasenumwandlung hindeutet, wobei die τ_{corr} -Werte von MBP+Zn²⁺ und (MBP+Zn²⁺) unterhalb von LUV+MBP und Zn²⁺+MBP liegen (wie bei $a_{iso,app}$ in Abbildung 45). Ab 37 °C weichen die D_{zz} -Werte aller Proben mit MBP und Zn²⁺ von reinen LUV+MBP-Proben ab (Abbildung 47b) und weisen eine langsamere Rotation entlang der z-Achse auf. Unterhalb von 37 °C sind jedoch keine Unterschiede wahrzunehmen, was an der energetisch eingeschränkteren Gel-Phase liegen könnte. Bei der temperaturabhängigen Betrachtung des Euler-Winkels β (Abbildung 47c) findet sich die erhöhte Bewegungsfreiheit und Umgebungspolarität der Proben mit Zink-Ionen und Protein (aus ΔH_+ und h_0/h_-) in den größeren Winkeln, im Vergleich zu LUV+MBP-Proben, wieder. Außerdem steigt der Winkel mit Temperaturerhöhung in allen MBP/Zn²⁺-Kombinationen an. Die Zugabe von MBP zu einer LUV-Zn²⁺-Probe verschiebt die Winkel bei geringeren Temperaturen (<20 °C) zu kleineren Werten (ähnlich wie bei LUV+MBP) und scheint den Einfluss von Zink-Ionen zu verringern.

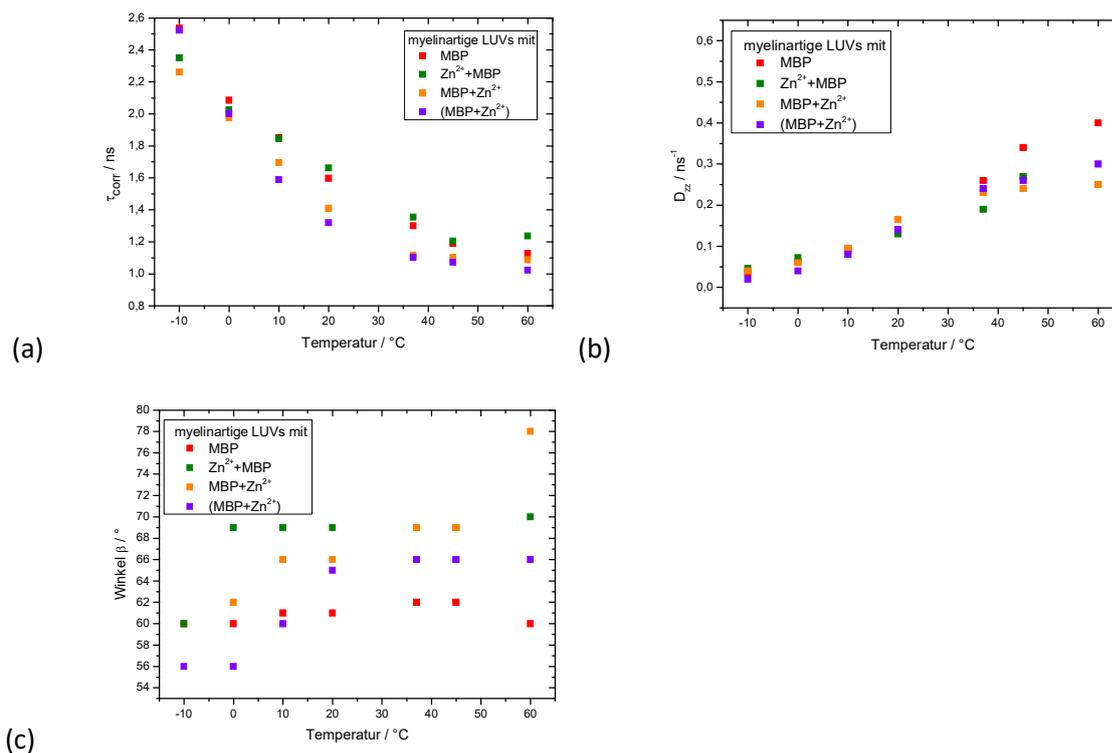


Abbildung 47: Temperaturabhängigkeit von (a) Rotationskorrelationszeit τ_{corr} , (b) Rotationsdiffusionstensorelement D_{zz} und (c) Euler-Winkel β von 2,2% TempoPC in myelinartigen LUVs in Abhängigkeit von MBP- und Zink-Ionen-Gehalt in einem HEPES-NaCl-Puffer, erhalten durch Simulation von cw Spektren.

3.2.2.4.2 DEER-Messungen

Die X-Band Puls EPR-Experimente wurden bei 50 K durchgeführt. Um eine optimale Elektron-Elektron-Doppelresonanz (DEER)-Messung zu erhalten wurde vorher jeweils eine Elektronenspin-Echo (ESE)- und ein T_2 -Messung (transversale Relaxationszeit) durchgeführt, um die Pulse zu positionieren und deren Länge einzustellen. ESE-Spektren dienen der Frequenzfindung und können eventuelle zusätzliche Informationen bezüglich Phasenrelaxation und Atomkern-Modulationen liefern. Jedoch konnten aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses diese nicht weiter verglichen werden (Abbildung A22c). Mittels dem DeerAnalysis2016-Programm von G. Jeschke [270] wurden die DEER-Daten anschließend analysiert (siehe detaillierte Durchführung Kapitel 4.7.2).

Die phasen- und hintergrundkorrigierten Zeitspuren der DEER-Messungen für Experimente mit TempoPC sind in Abbildung 48 dargestellt. Die qualitative Anzahl der Spins innerhalb des zugänglichen Entfernungsbereichs kann aus der Modulationstiefe extrahiert werden [240]. Die Betrachtung der Zeitspuren von reinen LUVs und LUVs mit MBP zeigt, dass die Modulationstiefe durch die Zugabe von MBP größer wird. Die lokale Konzentration der Spins wird somit durch die Präsenz von MBP erhöht. Durch den Einbau von MBP in die ungeordnete Phase werden die spezielle Verteilung und der Abstand zwischen den Spinmarkierungen verbessert aufgrund des reduzierten verfügbaren Platzes

pro Lipid. Dies deckt sich mit dem in Kapitel 3.2.1 vermuteten Verhalten von CSOSL in LUVs mit MBP und den Resultaten der geringeren Bewegungsfreiheit aus vorherigen cw EPR-Messungen des TempoPC.

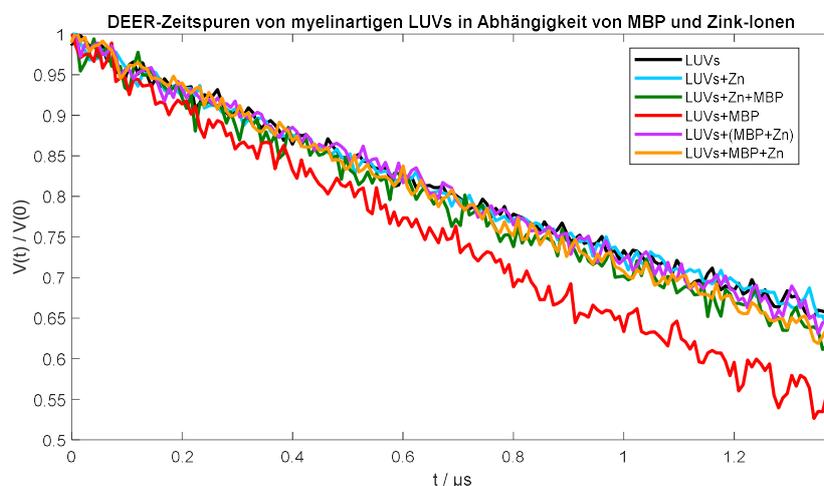


Abbildung 48: Hintergrund- und phasenkorrigierte DEER-Zeitspuren von TempoPC in myelinartigen Vesikeln mit und ohne MBP bei einem Lipid/Protein-Verhältnis von 567:1 in einem HEPES-NaCl-Puffer bei 50 K ($\tau_2=1,5 \mu\text{s}$). Zusätzlich ist die Abhängigkeit von Zink-Ionen ($50 \mu\text{M}$) dargestellt in den drei Pipettier-Reihenfolgen.

Werden Zink-Ionen den LUVs beigemischt ist keine Veränderung in den Zeitspuren erkennbar. Wie aus den cw EPR-Messungen geschlossen, interagiert Zink nicht direkt mit TempoPC und verändert die Positionsverteilung des Lipides nicht, obwohl eine deutliche freiere Bewegung des Spinlabels beobachtet werden konnte. Wird jedoch MBP hinzugefügt ist ein Unterschied im Vergleich zu der LUV-MBP-Probe zu sehen. Alle Zeitspuren von Proben in Anwesenheit von MBP und Zink-Ionen, unabhängig von der Pipettier-Reihenfolge, haben den selben Verlauf wie reine LUVs bzw. LUVs mit Zink-Ionen. Auf den ersten Blick würde man vermuten, dass MBP nicht mehr mit der Lipiddoppelschicht interagiert, aber da aus den vorherigen Lichtstreuungs- und Kryo-TEM-Experimenten bekannt ist, dass MBP definitiv die Vesikel miteinander verklebt, somit mit den Lipidschichten interagiert, ist die geringere Modulationstiefe mit einer Zink-induzierten Veränderung verknüpft. Die Konzentration an Spins im zugänglichen Entfernungsbereichs verändert sich nicht, das bedeutet TempoPC verfügt über den gleichen Platzbedarf und Verteilung wie ohne Zn^{2+} . MBP nimmt somit nicht mehr so viel Platz ein wie zuvor oder Zink-Ionen kondensieren (wie oben diskutiert) die Lipidschicht so stark, sodass die PC-Lipide keine Veränderung wahrnehmen. Die Veränderung des Platzbedarfs von MBP kann durch eine Konformationsänderung durch Zink in eine kompaktere Form geschehen und/oder die Protein-Lipid-Wechselwirkungen verändern sich (schwächer), sodass MBP nicht mehr in die Doppelschicht eindringt, sondern nur noch an den Lipiden haftet. Aus den cw EPR-Messungen konnte eine größere Bewegungsfreiheit der Spinmarkierung für Proben mit MBP und Zn^{2+} im Vergleich zu der LUV+MBP-Probe festgestellt werden. Dies stimmt mit der gleichbleibenden Verteilung

(verfügbaren Platz) aus den Puls-Messungen überein. Feinere Unterschiede sind jedoch aufgrund des Signal/Rausch-Verhältnisses nicht identifizierbar.

Die unveränderte Spinverteilung mit Zink-Ionen, in Kombination mit deutlichen Anzeichen für eine veränderte Orientierung und Beweglichkeit der Spinmarkierung, lässt vermuten, dass die PC-Lipide insgesamt ihre Position nicht verändern und nicht direkt mit Zn^{2+} oder MBP interagieren, jedoch leicht die Orientierung der Kopfgruppe ändern. Es ist zu beachten, dass MBP nicht in die Vesikel diffundiert und somit die innere Lipidschicht einen anderen Platzbedarf pro Lipid aufweist (Krümmungsfolgen vernachlässigt) als die äußere Schicht. Demzufolge stellen die Ergebnisse dieser Arbeit ein gemittelttes Bild verschiedener Orientierungen und Wechselwirkungen dar, die vermutlich eine detailliertere Interpretation feinerer Unterschiede verhindern.

3.2.2.5 Schlussfolgerung

Mittels multidisziplinärer Methoden wurden LUVs mit einer Lipidzusammensetzung ähnlich der zytoplasmatischen Seite der Myelinmembran untersucht, um den Einfluss von divalenten Metallionen und basischem Myelin-Protein näher zu betrachten. Es konnte festgestellt werden, dass die Zugabe von divalenten Metallionen als gelöstes Chloridsalz die Aggregation durch MBP nicht verhindert, unabhängig von der Konzentration und Sorte der Kationen.

Die Lichtstreuungsexperimente deuten eine Veränderung der Vesikeloberfläche an, da der hydrodynamische Durchmesser und das detektierte Zeta-Potential bereits ohne Protein variiert. Jedoch konnten auch die Grenzen dieser Messmethoden aufgewiesen werden, da aufgrund der Inhomogenität der LUV-MBP-Aggregate, die Reproduzierbarkeit nicht gegeben war. Des Weiteren konnte mittels Kryo-TEM die Aggregation der Vesikel visualisiert werden und eine deutliche Abhängigkeit der Pipettier-Reihenfolge und der Kationensorte und -konzentration beobachtet werden. Letzteres äußerte sich zum einen in der rauen Topographie bei Interaktion von MBP mit Kupfer-Ionen, die mit sinkender Konzentration weniger ausgeprägt ist und zum anderen in der Verbildlichung der Bindungsaffinität von $Cu > Zn$ an MBP. Die Reihenfolge der Zugabe zeichnet sich im Ordnungsgrad der Verklebung in der aufsteigenden Staffelung $M^{2+} + MBP > (MBP + M^{2+}) > MBP + M^{2+}$ ab. EPR-Messungen mit TempoPC in LUVs legen nahe, dass die PC-Kopfgruppen nicht direkt mit MBP oder Zink-Ionen interagieren und der Einbau von MBP in die Lipidschicht zu einer geringeren verfügbaren Fläche pro Lipid führt. Außerdem unterstützen die Resultate die Theorie einer teilweisen Lipidkondensation (ohne Protein), hervorgerufen durch Zink-Ionen, da die Bewegungsfreiheit von TempoPC mit Zn^{2+} zunimmt und der Lipidphasenübergang verstärkt wird. In Wechselwirkung mit MBP sind diese Tendenzen auch zu beobachten, jedoch spielt die Pipettier-Reihenfolge ebenfalls eine wichtige Rolle. Dies kann durch eine Zink-induzierte veränderte

Lipidkoordination und/oder Zink-induzierte veränderte MBP-Konformation hervorgerufen werden.

Die Vermessung von myelinartigen unilamellaren Vesikeln in Abhängigkeit von MBP- und Metallionengehalt mittels unterschiedlicher Messtechniken hat gezeigt, dass die Vesikel temperaturstabil sind und in allen Kombinationen Aggregate bilden. Des Weiteren ist, neben der Metallionenkonzentration und -sorte, die Interaktionsreihenfolge der Metallionen und des Proteins entscheidend für die resultierende Verklebung der Vesikel. Die alleinige Wechselwirkung von MBP mit den Lipiden führt zu einer Verringerung des verfügbaren Platzes. Divalente Metallionen (Zink, Kupfer) erhöhen den verfügbaren Platz für PC-Kopfgruppen durch teilweise Kondensation der Lipidschicht und Wechselwirkungen mit dem basischen Myelin-Protein. Jedoch interagieren weder MBP noch Zink-Ionen direkt mit der PC-Kopfgruppe. Kleine lokale Veränderungen des Zink-Gehaltes (ausgelöst durch falsche Pipettier-Reihenfolge) in der Myelinmembranumgebung können somit drastische Veränderungen für die kompakte Stapelung des Myelins haben und zu enormen Schwächen in der Signalübertragung führen, die bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, die Ursache sein könnten.

Diese Ergebnisse zeigen auch, dass Kupfer-Ionen nicht ohne Bedenken Zink-Ionen ersetzen können. In EPR-Studien werden oftmals diamagnetische Ionen durch paramagnetische ersetzt, da nur paramagnetische Substanzen EPR-aktiv sind, in der Annahme, dass sich die Eigenschaften der Ionen nicht stark unterscheiden.

In der Zukunft sollten die bisherigen Ergebnisse durch weitere EPR-Messungen mit Kupfer-Ionen ergänzt werden, um die hier aufgezeigten Unterschiede zu Zink-Ionen im Hinblick auf Umgebungspolarität und Bewegungsfreiheit zu untersuchen. Ebenso die Kombination aus beiden Kationen scheint sehr vielversprechend in Bezug auf eine gute Stapelung der Myelinmembran, wobei die zeit- und konzentrationsabhängige Verdrängung von Zink durch Kupfer (oder auch umgekehrt) einbezogen werden sollte. Um die präferierten Interaktionspartner der Metallionen in myelinartigen LUVs zu erforschen wäre außerdem die systematische Variation von spinmarkierten Kopfgruppen von Interesse.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

Bovines basisches Myelin-Protein 18,5 kDa (MBP) wurde von der Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Eine Pufferlösung von *N*-(2-Hydroxyethyl)piperazin-*N'*-ethansulfonsäure (HEPES) und Natriumchlorid (beide von Merck KGaA) wurde mit hochreinem Wasser aus einem Milli-Q Advantage A10 (Millipore SAS, Molsheim Cédex, Frankreich), mit einer Leitfähigkeit von weniger als 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, hergestellt und mit Natriumhydroxid (Fisher Scientific, Leicestershire, UK) auf pH 7,4 eingestellt. MBP wurde in HEPES-NaCl-Puffer (20 mM HEPES, 10 mM NaCl, pH 7,4) gelöst, was zu einer Stammkonzentration von 100 oder 300 μM führte, und bei 4 °C gelagert. Die Lipide Schweinehirnextrakt L- α -Phosphatidylcholin (>99%, PC), Schweinehirnextrakt L- α -Phosphatidylserin (>99%, PS), Schweinehirnextrakt L- α -Phosphatidylethanolamin (>99%, PE), Schweinehirnextrakt Sphingomyelin (>99%, SM), Rinderleberextrakt L- α -Phosphatidylinositol (>99%, PI) und Cholesterol (Schafwolleextrakt, >98%) wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) gekauft. Das verwendete Chloroform und Methanol hatte HPLC-Qualität und wurde von der Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Alle oben genannten Substanzen wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Projekt-spezifische Materialien

1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin-*N*-(lissamin-rhodamin-B-sulfonyl) (Rh-DHPE, Life Technologies GmbH, Darmstadt) und TopFluor® Cholesterol (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) wurden als Fluorophore für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen verwendet. Dabei wurde dem jeweiligen Lipidgemisch je 0,05 mol-% Rh-DHPE oder 1 mol-% TopFluor® Cholesterol beigemischt.

Das Carboxy-TEMPO-spinmarkierte Cholesterol (CSOSL) wurde von T. Hauenschild *et al.* [25] bereitgestellt, in Chloroform gelöst und bei -30 °C gelagert.

Für Puls EPR-Messungen wurden 20 Vol.-% Glycerin (87 Gew.-% in Wasser, ACROS Organics, Belgien) der Probe beigemischt, um Kristallbildung zu verringern.

In Kapitel 3.2.2 wurden Zinkchlorid (99,99%, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) und Kupfer(II)-chlorid-dihydrat ($\geq 99\%$, Merck KGaA, Darmstadt) als divalente Metallionen verwendet. TempoPC (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho(2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl)cholin) wurde von Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) in Chloroform gelöst erworben und bei -30 °C gelagert.

4.2 Filmwaagen-Messungen

Das natürliche Lipidgemisch hatte eine ähnliche Zusammensetzung wie die zytoplasmatische Monoschicht von Myelin (Schweinehirn-L- α -Phosphatidylcholin (PC), Schweinehirn-L- α -Phosphatidylserin (PS), Schweinehirn-L- α -Phosphatidylethanolamin (PE), Schweinehirn-Sphingomyelin (SM) und Rinderleber-L- α -phosphatidylinositol (PI) mit einem Molverhältnis von 11:13:27:3:2 [68]. Cholesterol und alle anderen Lipide wurden in Chloroform (HPLC-Qualität) gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Es wurden Lipidmischungen mit einem Cholesterolgehalt von 0%, 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 44%, 50%, 60% und 100% hergestellt, siehe Tabelle 2. Die verbleibenden Lipide wurden immer auf das gleiche Molverhältnis eingestellt, und die endgültigen Gesamtlipidkonzentrationen der Spreitlösungen variierten von 0,6 bis 1,4 mM. Basisches Myelin-Protein (18,5 kDa, bovin) wurde in HEPES-NaCl-Puffer (20 mM HEPES, 10 mM NaCl, pH 7,4) gelöst, mit einer Stammkonzentration von 100 μM und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tabelle 2: Zusammensetzungen von gemessenen Lipidmischungen mit variierendem Cholesterolgehalt.

Lipid	mol-%								
PC	19.6	17.7	15.7	13.8	12.8	11.8	11	9.8	7.8
PS	23.2	20.9	18.6	16.3	15.1	13.9	13	11.6	9.3
PE	48.2	43.5	38.6	33.8	31.3	29	27	24.1	19.3
SM	5.4	4.7	4.3	3.8	3.5	3.2	3	2.7	2.1
PI	3.6	3.2	2.8	2.5	2.3	2.1	2	1.8	1.4
Ch	0	10	20	30	35	40	44	50	60

4.2.1 Kompressionsexperimente

Für die Messungen der Oberflächendruck/Fläche-Kompressionsisothermen von Lipidmonoschichten mit oder ohne Protein wurde die Lipidmischung auf einer Puffer-Subphase gespreitet. Verwendet wurde ein Langmuir-Trog (Teflon beschichtet, $266\times 99\times 3\text{ mm}^3$) und die Monoschicht wurde mit einer Hamilton-Spritze tropfenweise gespreitet. Nach dem Spreiten wurde eine Wartezeit von 20 min für die Chloroformverdampfung eingehalten. Der Trog war mit einer Wilhelmy-Waage (Riegler & Kirstein GmbH, Potsdam, Deutschland) mit Filterpapier und zwei symmetrisch beweglichen Barrieren ausgestattet, die den Film mit $2\text{ \AA}^2/(\text{Molekül}\cdot\text{min})$ komprimierten. Vor den Messungen musste der Trog mit Hellmanex und hochreinem Wasser gereinigt werden. Alle Experimente wurden bei $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Der molare Gesamtlipidgehalt wurde konstant bei 27,9 nmol gehalten, um in allen Experimenten in der Gasphase der Isotherme zu beginnen. Für die Experimente mit Protein wurde eine MBP-Stammlösung mittels einer Spritze durch die äquilibrierte Lipidmonoschicht an fünf

verschiedenen Positionen injiziert, um ihre Verteilung in der Puffer-Subphase zu fördern. Verwendet wurde eine endgültige Trogkonzentration von 100 nM MBP, wie bei Widder *et al.* [37]. Die Kompression des Films mit MBP wurde gestartet, sobald der Oberflächendruck konstant war. Bei Messungen mit MBP musste zusätzlich jedes Mal ein neues Filterpapier eingesetzt werden, da sich das Protein aufgrund seiner hohen Oberflächenaktivität am Filterpapier festsetzen könnte und bei nachfolgenden Messungen die tatsächliche Protein-Konzentration unbestimmt erhöhen würde bzw. die Oberflächenspannung verfälschen könnte. Die Isothermen wurden mit der Software OriginPro analysiert und dargestellt.

4.3 Fluoreszenzmessungen

Aufnahmen von fluoreszierenden Monoschichten an der Luft/Wasser-Grenzfläche wurden mit einem Axio Scope A1 Vario-Epifluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Deutschland) aufgenommen, während gleichzeitig die Kompression der Monoschicht aufgezeichnet wurde. Die Filmwaage (siehe oben) wurde unter dem Mikroskop auf einem x-y-z-Tisch (Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland) montiert, der durch ein MAC5000-System (Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY, USA) in seinen Bewegungen gesteuert wurde. Um eine staubfreie Umgebung zu gewährleisten und die Verdunstung von Wasser zu minimieren, wurde der Trog von einer selbstgebauten Plexiglashaube umschlossen. Das Mikroskop war mit einer Kompaktlichtquelle HXP 120 C (Quecksilber-Kurzbogenreflektorlampe), einem Objektiv mit großem Arbeitsabstand (LD EC Epiplan-NEOFLUAR 50×) und einer für den Fluoreszenzfarbstoff geeigneten Filter/Strahlenteiler-Kombination ausgestattet, alle bezogen von Carl Zeiss MicroImaging (Jena, Deutschland). Die Bilddaten wurden mit einer EMCCD-Kamera (ImageEM C9100-13, Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) aufgezeichnet und von der Software AxioVision (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Deutschland) erfasst. Alle dargestellten Aufnahmen zeigen Bereiche mit individuell kontrastangepassten Rohdaten. Jede Lipidmischung wurde mit 0,05 mol-% Rh-DHPE (Verringerung der Menge an PE um 0,05 mol-%) und einmal mit 1 mol-% TopFluor® Cholesterin dotiert. Die Monoschichten wurden, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, gespreitet und das Protein injiziert.

4.4 Präparation der Vesikel

Große unilamellare Vesikel (LUVs) wurden hergestellt, indem zunächst alle in Chloroform gelösten Lipide (bei -30 °C gelagert) in einem Glasfläschchen gemischt wurden. Die Zusammensetzung ist dabei ähnlich der zytoplasmatischen Membran von Myelin (L- α -Phosphatidylcholin (PC), L- α -Phosphatidylserin (PS), L- α -Phosphatidylethanolamin (PE), Sphingomyelin (SM), L- α -Phosphatidylinositol (PI) mit einem Molverhältnis von

11:13:27:3:2) [68,169,208]. Der Cholesterolgehalt wurde um folgende Prozentsätze variiert: 0%, 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 44%, 50%, 60%, wobei die verbleibenden Lipide immer auf das gleiche Molverhältnis eingestellt waren (siehe Tabelle 2). Danach wurde das Chloroform unter einem Stickstoffstrom verdampft, dies führte zu einem trockenen Lipidfilm. Der Lipidfilm wurde dann bei -30 °C eingefroren und bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Zum Quellen der Vesikel wurde der trockene Lipidfilm je nach Messmethode und damit erforderlicher Konzentration mit einer definierten Menge Puffer (20 mM HEPES, 10 mM NaCl, pH 7,4) überschichtet. Das Glasfläschchen mit Lipidfilm und Puffer wurde dann zweimal 10 Minuten lang in ein Wasserbad (45 °C) mit Ultraschall gestellt. Zwischen und nach dem Quellvorgang wurde die Vesikel-Suspension mit einem Vortexer durchmischt, um die Vesikel vom Boden des Gläschens zu lösen und zu verkleinern. Als letzter Schritt zur Erzielung einer homogenen Größe von 100 nm Durchmesser und Unilamillarität wurde die Vesikel-Suspension 31-mal bei 45 °C extrudiert (Avanti-Lipidextruder, ausgestattet mit einer Polymermembran (100 nm Porengröße)) und über Nacht bei 4 °C gelagert. Alle Vesikel-Suspensionen wurden erst am nächsten Tag und bis zu 3 Tagen verwendet.

Bei Messungen mit divalenten Metallionen (Tabelle 3) wurden immer 44% cholesterolhaltige LUVs verwendet und drei verschiedene Pipettier-Reihenfolgen durchgeführt: 1. LUVs+MBP+Metallionen, 2. LUVs+Metallionen+MBP und 3. LUVs+(MBP+Metallionen-Inkubation).

Tabelle 3: Verwendete Konzentrationen der divalenten Metallionen Zn²⁺ und Cu²⁺. Die Mischung aus Zn²⁺ und Cu²⁺ besteht aus 50 µM Zn²⁺ und 14 µM Cu²⁺. Kursiv sind die Konzentrationen, auf welche das Hauptaugenmerk gelegt wird und weiterführend mittels TEM und EPR-Spektroskopie (nur Zn²⁺) untersucht wurden.

Metallion	Konzentration				
Zn ²⁺	-	20 µM	40 µM	<i>50 µM</i>	-
Cu ²⁺	<i>14 µM</i>	20 µM	40 µM	<i>50 µM</i>	-
Zn ²⁺ +Cu ²⁺	-	-	-	-	<i>64 µM</i>

4.5 Dynamische Lichtstreuung

Instrumentation und Messeinstellungen

Dynamische Lichtstreuungsmessungen wurden mit einem Litesizer 500-Gerät (Anton Paar GmbH, Graz, Österreich) durchgeführt. Die wässrigen Suspensionen von LUVs (1,1 mM) in HEPES-NaCl-Puffer (20 mM HEPES, 10 mM NaCl, pH 7,4) wurden in eine Quarzzone (Hellma Analytics, Müllheim, Deutschland) gegossen. Alle Proben wurden bei verschiedenen Temperaturen (0-60 °C) gemessen, die in einem Detektionswinkel von 90° (Seitstreuung) relativ zum einfallenden monochromatischen Licht aufgezeichnet wurden (He-Ne-Laser $\lambda = 658$ nm). Zusätzlich wurde bei 20 °C ein Detektionswinkel von 175°

(Rückstreuung) aufgezeichnet. Bei jeder Temperatur wurden 6 Durchläufe a 30 s mit einer Equilibrierungszeit von 9 min und eine automatische Fokussierung durchgeführt. Die Eingabe in der Software für die Datenanalyse war ein allgemeines Analysemodell, ein Cumulant Modell und Wasser als Lösungsmittel (Brechungsindex $n_{\text{H}_2\text{O}}=1,33$; Viskosität $\eta=1,0019 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$). Die hydrodynamischen Durchmesser wurden mit der von Anton Paar bereitgestellten Kalliope-Software berechnet und zusätzlich die Autokorrelationsfunktionen mit dem ALV-5000/E/EPP analysiert.

Die Inkubationszeit für MBP mit den LUVs betrug 15 min, bevor mit dem gleichen Aufbau wie für die LUV-Suspension gemessen wurde. Das Molverhältnis von Lipiden zu Protein betrug 567:1. Die Messungen mit divalenten Metallionen wurden analog zu denen mit verschiedenem Cholesterolgehalt durchgeführt. Dabei wurden mit Hilfe einer Stammlösung Metallionen-Konzentrationen von 14-64 μM in der Vesikel-Suspension eingestellt, entsprechend der Versuchsreihe (siehe Tabelle 3 und Kapitel 3.2.2 für mehr Informationen).

Datenanalyse

DLS-Daten von reinen Vesikelproben wurde mit dem Cumulant Fit analysiert. Dies war möglich, weil die Annahme, dass nur eine Partikelpopulation mit einer Gaußschen Verteilung vorliegt, erfüllt war (siehe Abbildungen A14 bzw. A18). Um den Teilchenradius R zu erhalten, muss der Diffusionskoeffizient D bestimmt werden. Die Stokes-Einstein-Gleichung [117] definiert den Diffusionskoeffizienten:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (\text{G23})$$

mit der Boltzmann-Konstante k_B , der Temperatur T und der Lösungsmittelviskosität η . Wenn sich streuende Partikel in verdünnter Lösung wie harte Kugeln verhalten und die Rayleigh-Debye-Theorie gültig ist. Daher muss die Intensitätskorrelationsfunktion analysiert werden. Bei der Cumulant-Methode wird dies erreicht, indem ein Polynom dritten Grades an den Logarithmus der Intensitätskorrelationsfunktion angepasst wird und die Abklingrate Γ erhalten wird:

$$\Gamma = Dq^2 \quad (\text{G24})$$

mit dem Streuvektor $q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$, einschließlich des Lösungsmittelbrechungsindex n und der Laserwellenlänge λ . Die Kalliope-Software verwendet eine Anpassungsroutine für „nicht negative kleinste Quadrate“ mit Tikhonov-Regularisierung [271] mit der Option zwischen „allgemein“ und „eng“. Letzteres wurde wegen der engen Partikelgrößenverteilung für Proben ohne Protein ausgewählt. Für Proben mit Protein wurde „allgemein“ gewählt, da die Verteilungen meist bimodal und breit sind.

Mit der Cumulant-Anpassung können nur monomodale Verteilungen analysiert werden und da größere Partikel relativ höher gewichtet sind als kleine Partikel, wurden die Intensitätszeitkorrelationsfunktionen auch mit einem nichtlinearen Modell mit der ALV-Software (5000/E/EPP) angepasst. Dieses Modell basiert auf denselben Grundprinzipien für den Diffusionskoeffizienten D , verwendet jedoch das flexiblere CONTIN-Modell, um die Korrelationsfunktionen anzupassen. Die Mathematik kann im Programm CONIN 2DP von Provencher [272,273] nachgeschlagen werden. Gleichung G25 zeigt das nichtlineare ALV-Anpassungsmodell für die Intensitätszeitkorrelationsfunktion $g_2(\tau)$:

$$g_2(\tau) - 1 = \left(\int_{\Gamma_{min}}^{\Gamma_{max}} e^{-\Gamma\pi} G(\Gamma) d\Gamma \right)^2 \quad (\text{G25})$$

mit der Verteilungsfunktion der Abklingrate $G(\Gamma)$. Die resultierende anzahlgewichtete Partikelradiusverteilung wird durch Einstellen der Amplituden der Abklingrate erhalten, um große, nicht physikalische Beiträge bei kleinen Partikelradien herauszuschneiden.

4.6 Elektrophoretische Lichtstreuung

Instrumentation und Messeinstellungen

Die Probenvorbereitung für cmPALS-Messungen war dieselbe wie für DLS-Messungen. Das Litesizer 500-Gerät war mit einer Univette-Küvette (Anton Paar GmbH, Graz, Österreich) ausgestattet, die elektrische Feldgradienten an der Messposition verhindert. Unter Verwendung der LASER-Doppler-Velocimetrie (LDV)-Technik in einem elektrophoretischen Lichtstreuungsaufbau (ELS) wurden die Zeta-Potentiale durch Messen der elektrophoretischen Mobilität bei 20 °C erhalten. Eine konstante Spannung von 11 V wurde angelegt. Die Ionenstärke für den HEPES-NaCl-Puffer bei pH 7,4 betrug $I=0,018$ M und wurde für die Messungen mit Metallionen entsprechend angepasst. Die Henry-Funktion wurde über die Software mit dem hydrodynamischen Radius aus DLS-Messungen berechnet. Die Datenanalyse wurde mit der kontinuierlich überwachten Phasenanalyse-Lichtstreutechnologie (cmPALS) durchgeführt, welche im Softwarepaket Kalliope 10.02.2002 enthalten ist.

Datenanalyse

Die cmPALS-Methode hat den Vorteil, empfindliche Proben mit kurzer Messzeit und geringen elektrischen Feldern messen zu können. Das Hinzufügen eines Modulatormonitors im Vergleich zur PALS-Technik ermöglicht die Kompensation jedweder Nichtlinearität des Modulators, und das Ergebnis wird nicht durch eine längerfristige Verschlechterung der Leistung des Modulators beeinflusst. [114,274]

Das Zeta-Potential ζ steht in Verbindung mit der elektrophoretischen Mobilität nach der Henry-Gleichung [124]:

$$U_E = \frac{2 * \varepsilon * \zeta * F(\kappa * a)}{3 * \eta} \quad (G10)$$

wobei U_E die elektrophoretische Mobilität, ε die Permittivität, ζ das Zeta-Potential, η die Viskosität und $F(\kappa * a)$ die Henry-Funktion mit κ^{-1} = Debye-Länge und a = Teilchenradius ist. Hier wurde die Henry-Funktion mit dem hydrodynamischen Durchmesser aus DLS-Messungen berechnet. Neben der Partikelgröße und dem Lösungsmittel ist ζ von der Temperatur und der Ionenstärke der Probe abhängig. Die Ionenstärke kann mit

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2 \quad (G26)$$

in Abhängigkeit von der Konzentration c_i und der Ladung z_i , der enthaltenen ionischen Baueinheiten, bestimmt werden.

4.7 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

4.7.1 Continuous wave EPR

Instrumentation und Messeinstellungen

Für cw EPR-Messungen, wurden Stammlösungen mit 1,1 mM LUVs, die 0%, 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 44%, 50% und 60% Cholesterol enthielten, in HEPES-NaCl-Puffer hergestellt. In jeder Probe waren entweder 4,4% aller Lipide (50 μ M) Carboxy-TEMPO-spinmarkiertes Cholesterol (CSOSL) oder 2,2% (25 μ M) TempoPC. Die entsprechende Menge an Cholesterol/PC wurde dann verringert, sodass die Gesamtkonzentration an Cholesterol/PC-artigen Molekülen dem gewünschten Verhältnis gleich. Die bovine MBP-Stammlösung hatte eine Konzentration von 100 μ M. Für Experimente mit Protein wurde eine Inkubationszeit von 15 min eingehalten und ein Molverhältnis von Lipid zu MBP von 567:1 verwendet. Für Messungen mit Zink-Ionen wurde, entsprechend der Versuchsreihe, das Chloridsalz beigemischt und 15 min abgewartet. Etwa 15 μ l Probe wurden in eine Quarzkapillare (BLAUBRAND IntraMARK) mit etwa 1 mm Außendurchmesser gefüllt. Das X-Band-Miniscope-Tischspektrometer MS400 (Magnettech GmbH, Berlin, Deutschland) wurde bei Mikrowellenfrequenzen von etwa 9,4 GHz verwendet, ausgestattet mit einem Frequenzzähler (RACAL DANA, Modell 2101) und einem Temperaturregler H03 (Magnettech GmbH, Berlin, Deutschland). Für alle Proben wurde eine Temperaturreihe im Bereich von -10 °C bis 60 °C mit 8 bis 16 Durchläufen a 60 s unter Verwendung von Modulationsamplituden von 0,2 bis 0,1 mT, Scanbreiten von 15 mT und Mikrowellenleistungen von 5-10 dB durchgeführt.

Datenanalyse

Die mittlere scheinbare isotrope Hyperfeinkopplungskonstante $a_{iso,app}$ wurde durch Auslesen der Nulldurchgänge der Spektren und Berechnung nach Gleichung G27 bestimmt.

$$a_{iso,app} = (B_{high\ field} - B_{low\ field})/2 \quad (G27)$$

Die Spektralsimulationen basieren auf der von Schneider und Freed [275] entwickelten Zeitlupentheorie und wurden mit selbst geschriebenen Matlab-Skripten (R2017a) unter Verwendung des EasySpin-Pakets [231] durchgeführt. Ausgangsparameter für den g -Tensor und Hyperfeinkopplung-Tensor A wurden aus Literaturdaten [224,276] ähnlicher spinmarkierter Cholesterole in wässrigen Medien entnommen. Folgende Parameter wurden verwendet:

- g -Tensor: $g_{xx}=2,0093$, $g_{yy}=2,0062$, $g_{zz}=2,0022$
- A -Tensor: $A_{xx}=18,5$ MHz, $A_{yy}=17,63$ MHz, $A_{zz}=100$ MHz

Für TempoPC wurden folgende Parametersätze verwendet: [276]

- g -Tensor: $g_{xx}=2,0099$, $g_{yy}=2,0061$, $g_{zz}=2,0024$
- A -Tensor: $A_{xx}=14,84$ MHz, $A_{yy}=19,63$ MHz, $A_{zz}=100$ MHz

Beide Parametersätze wurden für Proben mit und ohne MBP verwendet und bei jeder Simulation wurde nur A_{zz} angepasst. In der Simulation wurden die heterogene Linienverbreiterung und der Rotationsdiffusionskoeffizient impliziert und nach Bedarf angepasst. Der isotrope Wert a_{iso} wurde aus den simulierten Tensorwerten berechnet, wie in Gleichung G18 definiert.

$$a_{iso} = (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})/3 \quad (G18)$$

Die Rotationskorrelationszeit τ_{corr} wurde gemäß Gleichung G21 durch ein Modell der Brownschen Diffusion basierend auf dem Rotationsdiffusionstensor $D = [D_{xx} \ D_{yy} \ D_{zz}]$ berechnet. [277,278]

$$\tau_{corr} = \frac{1}{6^3 \sqrt{D_{xx} D_{yy} D_{zz}}} \quad (G21)$$

Es wurde getestet, ob eine Simulation mit mehr als einer Komponente erforderlich war. Da die zweite Spinspezies jedoch nur 1% des Spektralanteils betragen hätte, wurde mit einer Einkomponentensimulation fortgesetzt. Zusätzlich mussten die Euler-Winkel α , β und γ für die Simulation impliziert werden. Für Nitroxid-Spinmarkierungen wurde hauptsächlich der Winkel β eingestellt, beginnend mit einem Satz von $\alpha = 0^\circ$, $\beta = 66^\circ$ und $\gamma = 0^\circ$.

4.7.2 Puls EPR

Instrumentation und Messeinstellungen

Alle 4-Puls-DEER-Experimente wurden bei X-Band-Frequenzen von 9,3-9,6 GHz und 50 K durchgeführt. Ein BRUKER Elexsys E580-Spektrometer, das mit einem BRUKER Flexline Splitring-Resonator ER4118X-MS3 ausgestattet war und den Resonator auf $Q < 200$ überkoppelte. Die Kühlung wurde durch einen Kryostaten mit geschlossenem Kreislauf (ARS AF204, kundenspezifisch) erreicht. Das Maximum jedes Elektronenspin-Echo (ESE)-detektierten Spektrums wurde als Pumpfrequenz ν_{pump} verwendet. Die Beobachterfrequenz ν_{obs} wurde auf $\nu_{\text{pump}} + \Delta\nu$ eingestellt, wobei $\Delta\nu$ im Bereich von 70 MHz liegt und daher mit dem lokalen Niederfeldmaximum des Nitroxid-ESE-Spektrums übereinstimmt. Die Proben wurden in 3 mm Quarzröhrchen (100-150 μl) gemessen und vorher mit unterkühltem 2-Methylbutan schockgefroren. Die Konzentration des Radikals war sowohl bei CSOSL als auch bei TempoPC 100 μM . Die entsprechende Menge an Cholesterol/PC wurde dann verringert, sodass die Gesamtkonzentration an Cholesterol/PC-artigen Molekülen dem gewünschten Verhältnis glich.

Datenanalyse

Elektronenspin-Echo (ESE) mit Feldabhängigkeit

Elektronenspin-Echo (ESE)-detektierte EPR-Messungen in Anhängigkeit des Magnetfeldes wurden unter Verwendung der Hahn-Echosequenz [279] $\pi/2$ - τ - π - τ -Echo und eines 200-G-Felddurchlaufs durchgeführt. Es wurden Impulslängen von 16 ns und 32 ns für den $\pi/2$ - bzw. π -Puls verwendet und die Verzögerungszeit τ zwischen den Impulsen betrug 176 ns. Das Integrationsfenster wurde auf das Echo-Maximum zentriert und seine Breite wurde auf 100 ns eingestellt, um das volle Echo aufzuzeichnen.

Double electron-electron resonance (DEER)

Um dipolare Zeitentwicklungsdaten zu erhalten, wurde Elektron-Elektron-Doppelresonanz (DEER)-EPR-Spektroskopie mit einer 4-Puls-Sequenz, $\pi/2(\nu_{\text{obs}})$ - τ_1 - $\pi(\nu_{\text{obs}})$ - t' - $\pi(\nu_{\text{pump}})$ - $(\tau_1 + \tau_2 - t')$ - $\pi(\nu_{\text{obs}})$ - τ_2 -Echo, durchgeführt. Das Maximum jedes Elektronenspin-Echo (ESE)-detektierten Spektrums wurde als Pumpfrequenz ν_{pump} verwendet. Die Beobachterfrequenz ν_{obs} wurde auf $\nu_{\text{pump}} + \Delta\nu$ eingestellt (siehe Abbildung 49), wobei $\Delta\nu$ im Bereich von 70 MHz liegt und daher mit dem lokalen Niederfeldmaximum des Nitroxid-ESE-Spektrums übereinstimmt. Die Beobachterpulslängen betragen 32 ns, sowohl für den $\pi/2$ - als auch für den π -Puls. Der Pumpimpuls hatte eine Länge von 12 ns. Die Pumpimpulszeit t' wurde in Schritten von 8 ns erhöht. Das τ_1 begann mit $\tau_1 = 180$ ns und die 8 τ_1 -Werte, die jeweils um 8 ns gegenüber dem Vorherigen erhöht wurden, wurden gemittelt, um

Protonenmodulationen zu unterdrücken. DEER-Zeitspuren wurden mit $\tau_2 = 1,5 \mu\text{s}$ aufgezeichnet.

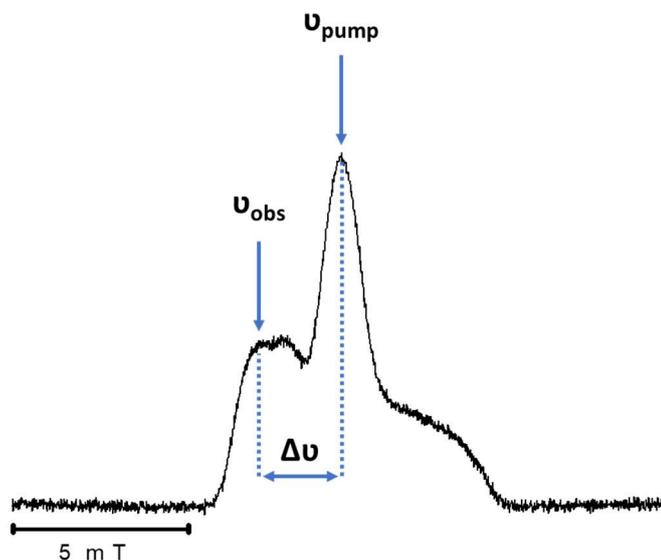


Abbildung 49: Echodetektierendes EPR-Spektrum mit eingezeichneten Positionen der Beobachter (ν_{obs})- und Pumpfrequenzen (ν_{pump}).

Die DEER-Zeitspuren wurden mit dem Matlab-basierten Programm DeerAnalysis (Version 2016) von Jeschke [270] analysiert. Die Daten wurden phasenkorrigiert und die Startzeit auf einen Wert von 130 ns eingestellt. Der Hintergrund wurde an die dipolare Evolutionszeit angepasst, wobei eine dreidimensionale homogene Verteilung der Spins angenommen wurde. Es wurde auch mit einer zweidimensionalen Verteilung getestet, diese zeigte jedoch keine Änderung der Ergebnisse und anfängliche dimensionale Anpassungen bei Hintergrundanpassungen bei $t = 0$ zeigten eine Tendenz zur dreidimensionalen Verteilung. Die Analyse der Abstandsverteilung unter Verwendung der Tikhonov-Regularisierung wurde vernachlässigt, da sich alle Abstände im als unsicher vorhergesagten Bereich von 4 nm befanden.

4.8 Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie

Für Kryo-TEM wurden LUVs mit einem Cholesterolgehalt von 20%, 44% und 60% hergestellt. Die wässrigen Proben mit einer Lipidkonzentration von 1 bis 1,5 mg/mL wurden auf ein löchriges Kohlenstoff-EM-Gitter (C-flatTM, Protochips Inc., Raleigh, NC, USA) aufgebracht und dann mit einem Filterpapier geblottet, um einen dünnen Film zu erhalten, der die Löcher überspannt. Zur Vitrifikation der Proben wurden die Gitter mit einem Leica Grid Plunger GP1 (Wetzlar, Deutschland) in flüssiges Ethan getaucht. Die Vitrifikation wurde in einer Kammer mit kontrollierter Temperatur und Feuchtigkeit

durchgeführt. Die Proben wurden zur Lagerung und während der Messung bei 77 K aufbewahrt. Die Messungen wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop LIBRA 120 plus (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland; 120 kV) durchgeführt, welches mit einem Gatan 626-Kryotransfersystem ausgestattet ist. Mit der iTEM-Software Olympus SIS (Münster, Deutschland) wurden mikroskopische Aufnahmen mit einer SSCCD-Kamera mit doppelter Geschwindigkeit auf der Achse (BM-2 k-120; TRS, Moorenweis, Deutschland) gemacht. Für Experimente mit Protein wurde ein Lipid/MBP-Molverhältnis von 567:1 verwendet. Bei Messungen mit divalenten Metallionen wurden immer 44% cholesterolhaltige LUVs verwendet und drei verschiedene Pipettier-Reihenfolgen durchgeführt: 1. LUVs+MBP+Metallionen, 2. LUVs+Metallionen+MBP und 3. LUVs+(MBP+Metallionen-Inkubation). Nach jeder Zugabe von MBP oder Metallionen wurde 15 min gewartet. Die Vitrifikation der Proben wurde von PD Dr. Annette Meister und die Messungen am Mikroskop von Dr. Gerd Hause durchgeführt.

5 Zusammenfassung

Multiple Sklerose gehört zu den neurodegenerativen Erkrankungen die zur Demyelinisierung der Myelinmembran führt. Obwohl die weltweit verbreitete Krankheit schon intensiv erforscht wurde ist noch kein verifizierter pathologischer Mechanismus bekannt.

In der Verdichtung und Stabilität der Myelinmembran um das Axon spielt das intrinsisch ungeordnete, basische Myelin-Protein (MBP) eine wichtige Rolle. Dabei hat man herausgefunden, dass das Gleichgewicht zwischen sowohl verschiedenen MBP-Varianten als auch die Wechselwirkungen zwischen Protein und Lipiden der Membran in erheblichem Maß dazu beitragen. Modifikationen des Proteins und minimale lokale Veränderungen dieser Interaktionen führen zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes und resultieren in enormen Unterschieden in der Myelinmembran. Eine Vielzahl an Parametern kann eine Gleichgewichtsverschiebung auslösen. Deshalb wurden in dieser Arbeit mittels multidisziplinärer Messmethoden einige ausgewählte Parameter untersucht, die Auswirkungen auf das Bindungsverhalten von MBP mit verschiedenen Modellmembranen haben.

Zunächst wurde die Wirkung des Cholesterol- und MBP-Gehalts auf Lipidmonoschichten, die die zytoplasmatische Membran des Myelins nachahmen, untersucht. Dazu wurden Monoschichten an der Luft/Wasser-Grenzfläche mit variierendem Cholesterolgehalt (0-100%) hergestellt und das isotherme Kompressionsverhalten mittels Langmuir-Filmwaagen und Epi-Fluoreszenzmikroskopie in Ab- und Anwesenheit von MBP betrachtet. Es zeigte sich, dass 44% Cholesterol (natürlicher Gehalt) in der Monoschicht den höchsten Kondensationseffekt (vermutlich korrelierend mit einer guten Verdichtung und Stabilität der Lipidmonoschicht) und eine optimale Proteinwechselwirkung kombiniert. Außerdem kann eine oberflächendruckabhängige Interaktion des Proteins mit der Lipidmonoschicht beobachtet werden, die vermuten lässt, dass MBP seine Bindungsart/-modus bei hohem Druck ändert. Darüber hinaus scheint das Lipidsystem ein minimalistisches System und in bestimmten Aspekten eine robuste Nachahmung des gesamten Myelins zu sein. Ferner wird klar, dass die Zusammensetzung der Monoschicht sehr wichtig ist und die Änderung nur eines Lipids das Verhalten der Lipidmonoschicht und die Wechselwirkung mit MBP beeinflusst.

In Kapitel 3.2.1 und 3.2.2 wurden große unilamellare Vesikel (LUVs) mit eine Lipidzusammensetzung ähnlich der zytoplasmatischen Seite der Myelinmembran als Membranmodell verwendet. Diese wurden mittels verschiedener Techniken untersucht, um das globalere und lokale Verhalten zu beobachten, wie in Abbildung 50 dargestellt. Dazu wurde Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) für eine umfassendere Übersicht, dynamische Lichtstreuung (DLS) und kontinuierlich überwachte Phasenanalyse der Lichtstreuung (cmPALS) für die nähere Umgebung und Elektronenspinresonanz (EPR)-

Spektroskopie für das lokale Verhalten von Vesikel und Protein in wässriger Lösung verwendet.

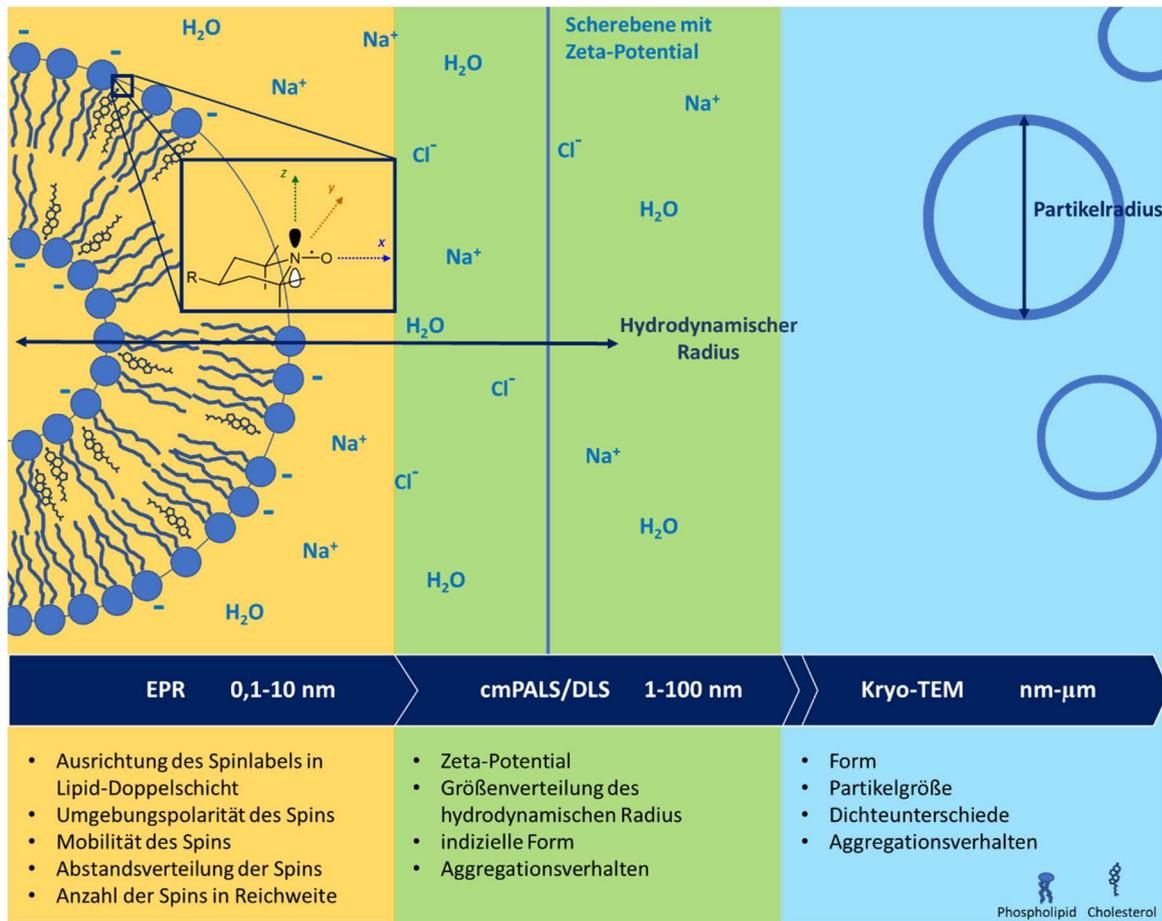


Abbildung 50: Übersicht der genutzten Methoden zur Charakterisierung der Interaktion von LUVs mit MBP und die Informationen, die von ihnen extrahiert werden können: Elektronenspinresonanz (EPR)-Spektroskopie, dynamische Lichtstreuung (DLS), kontinuierlich überwachte Phasenanalyse der Lichtstreuung (cmPALS) und Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).

Weiterführend zum vorherigen Kapitel wurde die Variation des Cholesterolgehaltes in der Lipidkomposition in Lipiddoppelschichten und dessen Auswirkungen auf die Lipid-MBP-Wechselwirkung untersucht. Dabei wurde der Cholesterolgehalt von 0-60% divergiert und in Präsenz und Abwesenheit von MBP vermessen. Wie zuvor beobachtet, ist die Zusammensetzung der Lipidschichten relevant für die Interaktion mit MBP. Nicht nur sind die Größe, die Form und das Aggregationsverhalten abhängig vom Cholesterolgehalt, sondern auch die Bewegungsfreiheit, die Umgebungspolarität und die Verteilung des spinmarkierten Cholesterols. Außerdem konnten durch die Messmethoden die Übergangstemperaturen der Lipidphasen mit der menschlichen Körpertemperatur von 37 °C korreliert werden. Die geordnete Adhäsion der Vesikel mit 44% Cholesterolgehalt stimmt überein mit der vorherigen Vermutung aus Kapitel 3.1., dass eine thermodynamische Stabilität mit einer optimalen Proteinwechselwirkung vereint wird. Woraus sich schließen lässt, dass die notwendige homogene Schichtung der

Myelinscheide für ein gesundes Gehirngewebe, durch die Regelmäßigkeit in Form und Abstand begünstigt wird.

Während in den vorangegangenen Kapiteln die Abhängigkeit von Cholesterol auf die Interaktion von MBP und Lipiden untersucht wurde, beschäftigt sich Kapitel 3.2.2 mit dem Einfluss von divalenten Metallionen auf das Modellsystem. Unter Verwendung der in Abbildung 50 dargestellten Methoden wurde der Einfluss von divalenten Zink- und Kupfer-Ionen auf LUVs mit einer Zusammensetzung ähnlich der zytoplasmatischen Seite der Myelinmembran beobachtet und die Veränderung der Lipid-MBP-Wechselwirkung analysiert. Hierbei stellte sich heraus, dass neben der Art und Konzentration des Metallions, die Reihenfolge der Interaktionspartner entscheidend ist für das Resultat der Aggregation. Die Konkurrenz um gleiche Interaktionspartner, wie negativ geladene Lipide oder positive Ladungen des Metallions bzw. MBP, eröffnet ein komplexes Wechselwirkungsnetzwerk, das einer intensiveren Untersuchung bedarf. Über die Spinmarkierung der Kopfgruppe von Phosphatidylcholin konnte außerdem die geringe Präferenz des PC-Lipides als Interaktionspartner aufgezeigt werden. Minimale Variationen des Metallionengehalts in der Umgebung einer myelinartigen Lipiddoppelschicht und MBP kann zu erheblichen Veränderungen im Wechselspiel zwischen Lipiden, Metallionen und MBP führen und somit eine homogene Stapelung der Myelinmembran behindern.

Die zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellt sich wie folgt dar:

- 1.) die Bedeutsamkeit eines exakten Cholesterolgehaltes in der gesunden Myelinmembran, der als Grundlage für eine stabile und optimale Proteinwechselwirkung dient,
- 2.) die starke Beeinflussung des Phasen- und Interaktionsverhalten der Lipide und MBP, die von divalente Metallionen (Zink und Kupfer) ausgeht,
- 3.) die Relevanz der Reihenfolge der Interaktionspartner und
- 4.) eine Summe an offenen Fragen, die in der zukünftigen Forschung angegangen werden sollten.

6 Ausblick

Diese Arbeit bildet die Grundlage für weiterführende Untersuchungen, in denen sowohl die Cholesterol- als auch die Metallionenabhängigkeit weiter thematisiert werden sollten.

Die nächsten Schritte für die Forschung zur Abhängigkeit des Cholesterolgehalts könnten die Verwendung von reinen Rekombinanten und fluoreszenzmarkiertem MBP in Monoschichten an der Luft/Wasser-Grenzfläche sein. Da das verwendete bovine basische Myelin-Protein in Bezug auf Ladung und Länge keine reine Proteinprobe ist, könnte man versuchen, reine rekombinante Formen zu integrieren, die die unmodifizierten und deiminierten Formen von MBP darstellen (wie es bereits für die Wechselwirkung mit SM getan wurde) [65], um die Einflüsse von Cholesterol auf das gesunde und erkrankte MBP in den Monoschichten zu untersuchen. Zusätzlich könnte man das Protein anstatt der Lipide fluoreszenzmarkieren, um die Position in der Monoschicht deutlicher zu bestimmen. Jedoch darf hierfür der Fluoreszenzfarbstoff das Faltungsverhalten des Proteins bzw. die Interaktion mit den Lipiden nicht behindern.

Weiterführend würde der Ansatz der Verwendung von reinen MBP-Varianten auch auf das Membranmodell der Vesikel Anwendung finden. Hierbei wäre besonders bezüglich der EPR-Studien interessant die Kombination aus einem spinmarkiertem Lipid und einer ortsgerichteten Spinmarkierung am Protein. Dadurch könnten spezifische positionsabhängige Interaktionen untersucht werden, die einen Einblick z. B. in den α -helikalen Bereich des MBP im membranassoziierten Zustand geben könnten.

In Bezug auf die Auswirkungen von divalenten Metallionen auf die MBP-Lipid-Interaktion wäre fortsetzend besonders die Wechselwirkung von Kupfer mit der Vesikeloberfläche und MBP von Interesse, da Kryo-TEM-Aufnahmen eine deutliche Veränderung der Oberflächentopographie zeigten, die mit Zink-Ionen nicht beobachtet werden konnte. Dazu könnten Rasterkraftmikroskopie- oder EPR-Spektroskopie-Messungen durchgeführt werden. Aufbauend auf den bisherigen EPR-Experimenten sollten sowohl die Kombination aus Zink- und Kupfer-Ionen als auch die Beeinflussung durch die Präsenz von Eisen-Ionen untersucht werden. Eisen spielt eine wichtige Rolle bei der Synthese von Neurotransmittern oder DNA und ist essenziell bei der Bildung von Myelin und bei der Reifung von Oligodendrozyten. Es wurden abnormale Fe^{2+} -Ansammlungen bei MS-Patienten in Oligodendrozyten, Makrophagen und Mikrogliazellen um entzündete Bereiche, in Verbindung mit Adern, gefunden, die offensichtlich eine Folge der Erkrankung sind [280]. Man vermutet, dass durch Extravasation von Erythrozyten und Freisetzung von extrazellulärem Hämoglobin oxidative Schäden an Lipiden und Proteinen entstehen, die wiederum zu einer Entzündung führen [281,282]. In Bezug auf entstehende oxidierte Lipide wäre die Folge dieser Veränderung und mögliche Gegenmaßnahmen zu erforschen, da unter anderem schon aufgezeigt wurde, dass oxidierte PC-Lipide die Neurodegeneration bei MS-Patienten verstärkt [283]. Die Untersuchung der

systematischen Variation von spinmarkierten Kopfgruppen wäre ebenso aufschlussreich, um die präferierten Interaktionspartner der Metallionen in myelinartigen LUVs zu erforschen.

Die Erforschung der Zusammensetzung des erkrankten Myelins ist ebenso wichtig wie die des gesunden. In mehreren Studien wurde bereits mit der Zusammensetzung des Tiermodells EAE (experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis), spezifisch für MS, die Interaktion mit MBP untersucht [44,66,67,284–286]. In Kapitel 2.2.2 wurde bereits die abweichende Komposition der Lipide für EAE erwähnt. Darauf aufbauend wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Sebastian Michler [287] Monoschicht-Untersuchungen von Lipidkompositionen der erkrankten, zytoplasmatischen Myelin-Membran vorgenommen. Dabei wurden drei unterschiedliche Zusammensetzungen näher untersucht: ladungsausgeglichene EAE-Monoschichten mit dem gesunden PS-Gehalt von 12,5 mol-% (EAE-PS) nach Min *et al.* [67], alternative ladungsausgeglichene EAE-Monoschichten mit Zusatz des gesunden PI-Gehaltes von 2 mol-%, wobei der PS-Gehalt um den gleichen Wert reduziert wurde (EAE-PI), sowie EAE-Monoschichten ohne Ladungsausgleich nach Ohler *et al.* [66]. In Tabelle 4 sind die molaren Verhältnisse der Mischungen aufgeführt.

Tabelle 4: Stöchiometrie der variierten Lipidzusammensetzungen der erkrankten zytoplasmatischen Myelinmembran im ZNS in mol-% und maximaler Insertionsdruck (MIP) in mN/m. [287]

	PC	PS	PE	SM	PI	Chol	MIP
EAE, nicht ladungsausgeglich	6,9	25,1	24,7	0,8	0	42,5	-
EAE, ladungsausgeglich	8,1	12,5	28,9	1	0	49,6	60,7 ± 1,3
EAE, ladungsausgeglich mit PI	8,1	10,5	28,9	1	2	49,6	45,7 ± 1,4

Adsorptions- und Kompressionsisothermen der Monoschichten wurden aufgenommen und letztere zusätzlich fluoreszenzmikroskopisch beobachtet. Die Analyse der maximalen Insertionsdrücke (MIPs) und der Domänenbildung ergab, dass der Zusatz von PI scheinbar das Adsorptionsverhalten von MBP an der EAE-Monoschicht wieder näher zum Verhalten der gesunden Monoschicht verschiebt. PI könnte dabei eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Oberflächendruckes spielen. Auch die generelle Ladung der Monoschicht ist von Bedeutung, da ohne Ladungsausgleich festgestellt wurde, dass die Lipidschichten eher instabil werden und nicht reproduzierbar waren. Weiterführend könnten hier die drei Lipidzusammensetzungen in Doppelschicht-Modelle (Vesikel, *supported bilayers*) übertragen werden und um weitere Kompositionsvarianten ergänzt werden.

Die Erforschung demyelinisierender Krankheiten, wie Multiple Sklerose, sollte weiter intensiviert werden, um langfristig ein Verständnis für die Ursachen dieser Krankheiten zu erlangen und damit weitere Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Buehler, L. K. *Cell Membranes*; Garland Science, Taylor & Francis Group: New York, 2016.
- (2) van der Lee, R.; Buljan, M.; Lang, B.; Weatheritt, R. J.; Daughdrill, G. W.; Dunker, A. K.; Fuxreiter, M.; Gough, J.; Gsponer, J.; Jones, D. T.; et al. Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (13), 6589–6631. <https://doi.org/10.1021/cr400525m>.
- (3) Uversky, V. N. Intrinsically Disordered Proteins from A to Z. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2011**, *43* (8), 1090–1103. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.04.001>.
- (4) Dunker, A. K.; Lawson, J. D.; Brown, C. J.; Williams, R. M.; Romero, P.; Oh, J. S.; Oldfield, C. J.; Campen, A. M.; Ratliff, C. M.; Hipps, K. W.; et al. Intrinsically Disordered Protein. *J. Mol. Graph. Model.* **2001**, *19* (1), 26–59. [https://doi.org/10.1016/S1093-3263\(00\)00138-8](https://doi.org/10.1016/S1093-3263(00)00138-8).
- (5) Tompa, P. Intrinsically Unstructured Proteins. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27* (10), 527–533. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02169-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02169-2).
- (6) Uversky, V. N.; Gillespie, J. R.; Fink, A. L. Why Are “Natively Unfolded” Proteins Unstructured under Physiologic Conditions? *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2000**, *41* (3), 415–427. [https://doi.org/10.1002/1097-0134\(20001115\)41:3<415::AID-PROT130>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0134(20001115)41:3<415::AID-PROT130>3.0.CO;2-7).
- (7) Wright, P. E.; Dyson, H. J. Intrinsically Unstructured Proteins: Re-Assessing the Protein Structure-Function Paradigm. *J. Mol. Biol.* **1999**, *293* (2), 321–331. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3110>.
- (8) Forman-Kay, J. D.; Mittag, T. From Sequence and Forces to Structure, Function, and Evolution of Intrinsically Disordered Proteins. *Structure* **2013**, *21* (9), 1492–1499. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.08.001>.
- (9) Dunker, A. K.; Oldfield, C. J.; Meng, J.; Romero, P.; Yang, J. Y.; Chen, J.; Vacic, V.; Obradovic, Z.; Uversky, V. N. The Unfoldomics Decade: An Update on Intrinsically Disordered Proteins. *BMC Genomics* **2008**, *9* (Suppl 2), S1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-S2-S1>.
- (10) Ward, J. J.; Sodhi, J. S.; McGuffin, L. J.; Buxton, B. F.; Jones, D. T. Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life. *J. Mol. Biol.* **2004**, *337* (3), 635–645. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.002>.
- (11) Iakoucheva, L. M.; Brown, C. J.; Lawson, J. D.; Obradović, Z.; Dunker, A. K. Intrinsic Disorder in Cell-Signaling and Cancer-Associated Proteins. *J. Mol. Biol.* **2002**, *323* (3), 573–584. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00969-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00969-5).
- (12) Tompa, P.; Csermely, P. The Role of Structural Disorder in the Function of RNA and Protein Chaperones. *FASEB J.* **2004**, *18* (11), 1169–1175. <https://doi.org/10.1096/fj.04-1584rev>.
- (13) Tompa, P.; Fuxreiter, M. Fuzzy Complexes: Polymorphism and Structural Disorder in Protein–Protein Interactions. *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33* (1), 2–8. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.10.003>.
- (14) Harauz, G.; Boggs, J. M. Myelin Management by the 18.5-KDa and 21.5-KDa Classic Myelin Basic Protein Isoforms. *J. Neurochem.* **2013**, *125* (3), 334–361. <https://doi.org/10.1111/jnc.12195>.

- (15) Cumberworth, A.; Lamour, G.; Babu, M. M.; Gsponer, J. Promiscuity as a Functional Trait: Intrinsically Disordered Regions as Central Players of Interactomes. *Biochem. J.* **2013**, *454* (3), 361–369. <https://doi.org/10.1042/BJ20130545>.
- (16) Tompa, P.; Szász, C.; Buday, L. Structural Disorder Throws New Light on Moonlighting. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30* (9), 484–489. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.07.008>.
- (17) Uversky, V. N.; Davé, V.; Iakoucheva, L. M.; Malaney, P.; Metallo, S. J.; Pathak, R. R.; Joerger, A. C. Pathological Unfoldomics of Uncontrolled Chaos: Intrinsically Disordered Proteins and Human Diseases. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (13), 6844–6879. <https://doi.org/10.1021/cr400713r>.
- (18) Uversky, Vladimir, N. Intrinsic Disorder in Proteins Associated with Neurodegenerative Diseases. *Front. Biosci.* **2009**, *14* (1), 5188. <https://doi.org/10.2741/3594>.
- (19) Weil, M.-T.; Möbius, W.; Winkler, A.; Ruhwedel, T.; Wrzos, C.; Romanelli, E.; Bennett, J. L.; Enz, L.; Goebels, N.; Nave, K.-A.; et al. Loss of Myelin Basic Protein Function Triggers Myelin Breakdown in Models of Demyelinating Diseases. *Cell Rep.* **2016**, *16* (2), 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.008>.
- (20) Wender, M. Acute Disseminated Encephalomyelitis (ADEM). *J. Neuroimmunol.* **2011**, *231* (1–2), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.09.019>.
- (21) Vassall, K. A.; Bamm, V. V.; Harauz, G. MyelStones: The Executive Roles of Myelin Basic Protein in Myelin Assembly and Destabilization in Multiple Sclerosis. *Biochem. J.* **2015**, *472* (1), 17–32. <https://doi.org/10.1042/BJ20150710>.
- (22) Raasakka, A.; Ruskamo, S.; Kowal, J.; Barker, R.; Baumann, A.; Martel, A.; Tuusa, J.; Myllykoski, M.; Bürck, J.; Ulrich, A. S.; et al. Membrane Association Landscape of Myelin Basic Protein Portrays Formation of the Myelin Major Dense Line. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05364-3>.
- (23) Welsch, U.; Deller, T. *Sobotta Lehrbuch Histologie*, 3rd ed.; Urban & Fischer in Elsevier: München, 2010.
- (24) Baumann, N.; Pham-Dinh, D. Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiol. Rev.* **2001**, *81* (2), 871–927. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.871>.
- (25) Harauz, G.; Ishiyama, N.; Hill, C. M. ; Bates, I. R.; Libich, D. S.; Farès, C. Myelin Basic Protein—Diverse Conformational States of an Intrinsically Unstructured Protein and Its Roles in Myelin Assembly and Multiple Sclerosis. *Micron* **2004**, *35* (7), 503–542. <https://doi.org/10.1016/J.MICRON.2004.04.005>.
- (26) Dunker, A. K.; Silman, I.; Uversky, V. N.; Sussman, J. L. Function and Structure of Inherently Disordered Proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18* (6), 756–764. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2008.10.002>.
- (27) R. Winter, F. Noll, C. C. *Methoden Der Biophysikalischen Chemie*, 2.; Vieweg und Teubner Verlag: Wiesbaden, 2011.
- (28) W. Graumann, D. S. *Compact Lehrbuch Anatomie*, 1. Volume.; Schattauer: New York, 2004.
- (29) Tompa, P.; Fersht, A. *Structure and Function of Intrinsically Disordered Proteins*, 1st ed.; Chapman and Hall/CRC: New York, 2009. <https://doi.org/10.1201/9781420078930>.

- (30) Kurzbach, D.; Platzer, G.; Schwarz, T. C.; Henen, M. A.; Konrat, R.; Hinderberger, D. Cooperative Unfolding of Compact Conformations of the Intrinsically Disordered Protein Osteopontin. *Biochemistry* **2013**, *52* (31), 5167–5175. <https://doi.org/10.1021/bi400502c>.
- (31) Kurzbach, D.; Schwarz, T. C.; Platzer, G.; Höfler, S.; Hinderberger, D.; Konrat, R. Compensatory Adaptations of Structural Dynamics in an Intrinsically Disordered Protein Complex. *Angew. Chemie* **2014**, *126* (15), 3919–3922. <https://doi.org/10.1002/ange.201308389>.
- (32) Bund, T.; Boggs, J. M.; Harauz, G.; Hellmann, N.; Hinderberger, D. Copper Uptake Induces Self-Assembly of 18.5 kDa Myelin Basic Protein (MBP). *Biophys. J.* **2010**, *99* (9), 3020–3028. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.08.022>.
- (33) Haas, H.; Oliveira, C. L. P.; Torriani, I. L.; Polverini, E.; Fasano, A.; Carlone, G.; Cavatorta, P.; Riccio, P. Small Angle X-Ray Scattering from Lipid-Bound Myelin Basic Protein in Solution. *Biophys. J.* **2004**, *86* (1), 455–460. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74122-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74122-3).
- (34) Raasakka, A.; Kursula, P. Flexible Players within the Sheaths: The Intrinsically Disordered Proteins of Myelin in Health and Disease. *Cells* **2020**, *9* (2), 470. <https://doi.org/10.3390/cells9020470>.
- (35) Harauz, G.; Ladizhansky, V.; Boggs, J. M. Structural Polymorphism and Multifunctionality of Myelin Basic Protein. *Biochemistry* **2009**, *48* (34), 8094–8104. <https://doi.org/10.1021/bi901005f>.
- (36) Bates, I. R.; Boggs, J. M.; Feix, J. B.; Harauz, G. Membrane-Anchoring and Charge Effects in the Interaction of Myelin Basic Protein with Lipid Bilayers Studied by Site-Directed Spin Labeling. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (31), 29041–29047. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302766200>.
- (37) 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*, 6095–6108. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00321>.
- (38) Kim, J. K.; Mastronardi, F. G.; Wood, D. D.; Lubman, D. M.; Zand, R.; Moscarello, M. A. Multiple Sclerosis. *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, *2* (7), 453–462. <https://doi.org/10.1074/mcp.M200050-MCP200>.
- (39) Moscarello, M. A. Myelin Basic Protein, the “Executive” Molecule of the Myelin Membrane. In *Cell Biology and Pathology of Myelin*; Springer US: Boston, MA, 1997; pp 13–25. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5949-8_2.
- (40) Harauz, G.; Musse, A. A. A Tale of Two Citrullines - Structural and Functional Aspects of Myelin Basic Protein Deimination in Health and Disease. *Neurochem. Res.* **2007**, *32* (2), 137–158. <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9108-9>.
- (41) Hafler, D. A. Multiple Sclerosis. *J. Clin. Invest.* **2004**, *113* (6), 788–794. <https://doi.org/10.1172/JCI21357>.
- (42) Moscarello, M. A.; Wood, D. D.; Ackerley, C.; Boulias, C. Myelin in Multiple Sclerosis Is Developmentally Immature. *J. Clin. Invest.* **1994**, *94* (1), 146–154. <https://doi.org/10.1172/JCI117300>.
- (43) Tranquill, L. R.; Cao, L.; Ling, N. C.; Kalbacher, H.; Martin, R. M.; Whitaker, J. N. Enhanced T Cell Responsiveness to Citrulline-Containing Myelin Basic Protein in Multiple Sclerosis Patients. *Mult. Scler.* **2000**, *6* (4), 220–225.

- (44) Shaharabani, R.; Ram-On, M.; Avinery, R.; Aharoni, R.; Arnon, R.; Talmon, Y.; Beck, R. Structural Transition in Myelin Membrane as Initiator of Multiple Sclerosis. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (37), 12159–12165. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b04826>.
- (45) Shaharabani, R.; Ram-On, M.; Talmon, Y.; Beck, R. Pathological Transitions in Myelin Membranes Driven by Environmental and Multiple Sclerosis Conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115* (44), 11156–11161. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804275115>.
- (46) Singer, S. J.; Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science (80-.)*. **1972**, *175* (4023), 720–731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>.
- (47) Yèagle, P. L. Lipid Regulation of Cell Membrane Structure and Function. *FASEB J.* **1989**, *3* (7), 1833–1842. <https://doi.org/10.1096/fasebj.3.7.2469614>.
- (48) Vereb, G.; Szöllősi, J.; Matkó, J.; Nagy, P.; Farkas, T.; Vígh, L.; Mátyus, L.; Waldmann, T. A.; Damjanovich, S. Dynamic, yet Structured: The Cell Membrane Three Decades after the Singer–Nicolson Model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (14), 8053–8058. <https://doi.org/10.1073/pnas.1332550100>.
- (49) Heimburg, T. *Thermal Biophysics of Membranes*; Wiley, 2007. <https://doi.org/10.1002/9783527611591>.
- (50) Tanford, C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*; John Wiley and Sons: New York, 1980.
- (51) Maibaum, L.; Dinner, A. R.; Chandler, D. Micelle Formation and the Hydrophobic Effect. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (21), 6778–6781. <https://doi.org/10.1021/jp037487t>.
- (52) Janiak, M. J.; Small, D. M.; Shipley, G. G. Temperature and Compositional Dependence of the Structure of Hydrated Dimyristoyl Lecithin. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254* (13), 6068–6078. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)50520-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)50520-2).
- (53) Heimburg, T. A Model for the Lipid Pretransition: Coupling of Ripple Formation with the Chain-Melting Transition. *Biophys. J.* **2000**, *78* (3), 1154–1165. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76673-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76673-2).
- (54) Blume, A. A Comparative Study of the Phase Transitions of Phospholipid Bilayers and Monolayers. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1979**, *557* (1), 32–44. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(79\)90087-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(79)90087-7).
- (55) Seddon, J. M. Structure of the Inverted Hexagonal (HII) Phase, and Non-Lamellar Phase Transitions of Lipids. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **1990**, *1031* (1), 1–69. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(90\)90002-T](https://doi.org/10.1016/0304-4157(90)90002-T).
- (56) Israelachvili, J. N. *Intermolecular and Surface Forces*, 3rd ed.; Elsevier Inc., 2011.
- (57) Sackmann, E. Membrane Bending Energy Concept of Vesicle- and Cell-Shapes and Shape-Transitions. *FEBS Lett.* **1994**, *346* (1), 3–16. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00484-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00484-6).
- (58) Radhakrishnan, A.; Anderson, T. G.; McConnell, H. M. Condensed Complexes, Rafts, and the Chemical Activity of Cholesterol in Membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97* (23), 12422–12427. <https://doi.org/10.1073/pnas.220418097>.
- (59) Silvius, J. R. Role of Cholesterol in Lipid Raft Formation: Lessons from Lipid Model Systems. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2003**, *1610* (2), 174–183. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00016-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00016-6).

- (60) Franks N. P. Structural Analysis of Hydrated Egg Lecithin and Cholesterol Bilayers I. X-Ray Diffraction. *J. Mol. Biol.* **1976**, *100*, 345–358.
- (61) Worcester, D. L.; Franks, N. P. Structural Analysis of Hydrated Egg Lecithin and Cholesterol Bilayers II. Neutron Diffraction. *J. Mol. Biol.* **1976**, *100* (3), 359–378. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(76\)80068-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(76)80068-X).
- (62) Subczynski, W. K.; Pasenkiewicz-Gierula, M.; Widomska, J.; Mainali, L.; Raguz, M. High Cholesterol/Low Cholesterol: Effects in Biological Membranes: A Review. *Cell Biochem. Biophys.* **2017**, *75* (3–4), 369–385. <https://doi.org/10.1007/s12013-017-0792-7>.
- (63) Yeagle, P. L.; Hutton, W. C.; Huang, C. H.; Martin, R. B. Phospholipid Head-Group Conformations; Intermolecular Interactions and Cholesterol Effects. *Biochemistry* **1977**, *16* (20), 4344–4349. <https://doi.org/10.1021/bi00639a003>.
- (64) Chen, Z.; Rand, R. P. The Influence of Cholesterol on Phospholipid Membrane Curvature and Bending Elasticity. *Biophys. J.* **1997**, *73* (1), 267–276. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78067-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78067-6).
- (65) 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. <https://doi.org/10.1016/j.BBAMEM.2019.183077>.
- (66) Ohler, B.; Graf, K.; Bragg, R.; Lemons, T.; Coe, R.; Genain, C.; Israelachvili, J.; Husted, C. Role of Lipid Interactions in Autoimmune Demyelination. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2004**, *1688* (1), 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2003.10.001>.
- (67) Min, Y.; Kristiansen, K.; Boggs, J. M.; Husted, C.; Zasadzinski, J. A.; Israelachvili, J. Interaction Forces and Adhesion of Supported Myelin Lipid Bilayers Modulated by Myelin Basic Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (9), 3154–3159. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813110106>.
- (68) Inouye, H.; Kirschner, D. A. Membrane Interactions in Nerve Myelin: II. Determination of Surface Charge from Biochemical Data. *Biophys. J.* **1988**, *53* (2), 247–260. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(88\)83086-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(88)83086-8).
- (69) Hu, Y.; Doudevski, I.; Wood, D.; Moscarello, M.; Husted, C.; Genain, C.; Zasadzinski, J. A.; Israelachvili, J. Synergistic Interactions of Lipids and Myelin Basic Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (37), 13466–13471. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405665101>.
- (70) Kozlov, M. M.; Leikin, S.; Rand, R. P. Bending, Hydration and Interstitial Energies Quantitatively Account for the Hexagonal-Lamellar-Hexagonal Reentrant Phase Transition in Dioleoylphosphatidylethanolamine. *Biophys. J.* **1994**, *67* (4), 1603–1611. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(94\)80633-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(94)80633-2).
- (71) Szekely, P.; Asor, R.; Dvir, T.; Szekely, O.; Raviv, U. Effect of Temperature on the Interactions between Dipolar Membranes. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (11), 3519–3524. <https://doi.org/10.1021/jp209157y>.
- (72) Tate, M. W.; Gruner, S. M. Temperature Dependence of the Structural Dimensions of the Inverted Hexagonal (HII) Phase of Phosphatidylethanolamine-Containing Membranes. *Biochemistry* **1989**, *28* (10), 4245–4253. <https://doi.org/10.1021/bi00436a019>.
- (73) Menon, N. K.; Williams, R. E.; Kampf, K.; Campagnoni, A. T. An Analysis of the Regions of the Myelin Basic Protein That Bind to Phosphatidylcholine. *Neurochem. Res.* **1990**, *15* (8), 777–783. <https://doi.org/10.1007/BF00968554>.

- (74) Baran, C.; Smith, G. S. T.; Bamm, V. V.; Harauz, G.; Lee, J. S. Divalent Cations Induce a Compaction of Intrinsically Disordered Myelin Basic Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *391* (1), 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.036>.
- (75) Riccio, P.; Giovannelli, S.; Bobba, A.; Romito, E.; Fasano, A.; Bleve-Zacheo, T.; Favilla, R.; Quagliariello, E.; Cavatorta, P. Specificity of Zinc Binding to Myelin Basic Protein. *Neurochem. Res.* **1995**, *20* (9), 1107–1113. <https://doi.org/10.1007/BF00995566>.
- (76) Tsang, D.; Tsang, Y. S.; Ho, W. K. . Myelin Basic Protein Is a Zinc-Binding Protein in Brain: Possible Role in Myelin Compaction. *Neurochem Res* **1997**, *22*, 811–819. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1022031825923>.
- (77) Smith, G. S. T.; Chen, L.; Bamm, V. V.; Dutcher, J. R.; Harauz, G. The Interaction of Zinc with Membrane-Associated 18.5 KDa Myelin Basic Protein: An Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopic Study. *Amino Acids* **2010**, *39* (3), 739–750. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0513-7>.
- (78) Earl, C.; Chantry, A.; Mohammad, N.; Glynn, P. Zinc Ions Stabilise the Association of Basic Protein with Brain Myelin Membranes. *J. Neurochem.* **1988**, *51* (3), 718–724. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1988.tb01803.x>.
- (79) Choi, B.; Jung, J.; Suh, S. The Emerging Role of Zinc in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (10), 2070. <https://doi.org/10.3390/ijms18102070>.
- (80) Bonaventura, P.; Benedetti, G.; Albarède, F.; Miossec, P. Zinc and Its Role in Immunity and Inflammation. *Autoimmun. Rev.* **2015**, *14* (4), 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.11.008>.
- (81) Jansen, S. Dissertation, Untersuchungen Zur Zink-Modulierten Signaltransduktion in Säugerzellen : Die Auswirkungen von Signalwegen Auf Die Zinkhomöostase. **2004**.
- (82) Ahmed, M. A. M.; Bamm, V. V.; Harauz, G.; Ladizhansky, V. Solid-State NMR Spectroscopy of Membrane-Associated Myelin Basic Protein—Conformation and Dynamics of an Immunodominant Epitope. *Biophys. J.* **2010**, *99* (4), 1247–1255. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.06.022>.
- (83) Flach, C. R.; Brauner, J. W.; Mendelsohn, R. Calcium Ion Interactions with Insoluble Phospholipid Monolayer Films at the A/W Interface. External Reflection-Absorption IR Studies. *Biophys. J.* **1993**, *65* (5), 1994–2001. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81276-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81276-1).
- (84) Casal, H. L.; Mantsch, H. H.; Hauser, H. Infrared Studies of Fully Hydrated Saturated Phosphatidylserine Bilayers. Effect of Lithium and Calcium. *Biochemistry* **1987**, *26* (14), 4408–4416. <https://doi.org/10.1021/bi00388a033>.
- (85) Andelman, D. Electrostatic Properties of Membranes: The Poisson-Boltzmann Theory; 1995; pp 603–642. [https://doi.org/10.1016/S1383-8121\(06\)80005-9](https://doi.org/10.1016/S1383-8121(06)80005-9).
- (86) Rouzina, I.; Bloomfield, V. A. Macroion Attraction Due to Electrostatic Correlation between Screening Counterions. 1. Mobile Surface-Adsorbed Ions and Diffuse Ion Cloud. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (23), 9977–9989. <https://doi.org/10.1021/jp960458g>.
- (87) Marcelja, S. Electrostatics of Membrane Adhesion. *Biophys. J.* **1992**, *61* (5), 1117–1121. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(92\)81921-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(92)81921-5).

- (88) Riccio, P.; Giovannelli, S.; Bobba, A.; Romito, E.; Fasano, A.; Bleve-Zacheo, T.; Favilla, R.; Quagliariello, E.; Cavatorta, P. Specificity of Zinc Binding to Myelin Basic Protein. *Neurochem. Res.* **1995**, *20* (9), 1107–1113. <https://doi.org/10.1007/BF00995566>.
- (89) Hrabcová, D.; Pásek, M.; Šimurda, J.; Christé, G. Effect of Ion Concentration Changes in the Limited Extracellular Spaces on Sarcolemmal Ion Transport and Ca²⁺ Turnover in a Model of Human Ventricular Cardiomyocyte. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (12), 24271–24292. <https://doi.org/10.3390/ijms141224271>.
- (90) Vitvitsky, V. M.; Garg, S. K.; Keep, R. F.; Albin, R. L.; Banerjee, R. Na⁺ and K⁺ Ion Imbalances in Alzheimer's Disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2012**, *1822* (11), 1671–1681. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.07.004>.
- (91) Berlet, H. H.; Bischoff, H.; Weinhardt, F. Divalent Metals of Myelin and Their Differential Binding by Myelin Basic Protein of Bovine Central Nervous System. *Neurosci. Lett.* **1994**, *179* (1–2), 75–78. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90938-5](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90938-5).
- (92) Saboury, A. ; Sarri-Sarraf, N.; Saidian, S. Thermodynamics of Binding Copper Ion by Myelin Basic Protein. *Thermochim. Acta* **2002**, *381* (2), 147–151. [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(01\)00654-2](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(01)00654-2).
- (93) Howard, B. Lipid Monolayers: Why Use Half a Membrane to Characterize Protein Membrane Interactions? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 438–443.
- (94) 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. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00203-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00203-5).
- (95) Dörfler, H.-D. *Grenzflächen Und Kolloid-Disperse Systeme*; Springer: Berlin, Heidelberg, 2002.
- (96) Butt, H.; Graf, K.; Kappl, M. *Physics and Chemistry of Interfaces*, 3rd ed.; John Wiley & Sons: Weinheim, 2013.
- (97) Caseli, L.; Nobre, T. M.; Ramos, A. P.; Monteiro, D. S.; Zaniquelli, M. E. D. The Role of Langmuir Monolayers to Understand Biological Events. *ACS Symp. Ser.* **2015**, *1215*, 65–88. <https://doi.org/10.1021/bk-2015-1215.ch004>.
- (98) Kerth, A. M. *Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie an Lipid-, Peptid- Und Flüssigkristall-Filmen an Der Luft / Wasser-Grenzfläche*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2003.
- (99) van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. Membrane Lipids: Where They Are and How They Behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9* (2), 112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>.
- (100) Berring, E. E.; Borrenpohl, K.; Fliesler, S. J.; Serfis, A. B. A Comparison of the Behavior of Cholesterol and Selected Derivatives in Mixed Sterol-Phospholipid Langmuir Monolayers: A Fluorescence Microscopy Study. *Chem. Phys. Lipids* **2005**, *136* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2005.03.004>.
- (101) Blume, A. Lipids at the Air–Water Interface. *ChemTexts* **2018**, *4* (1), 1–25. <https://doi.org/10.1007/s40828-018-0058-z>.

- (102) Alsina, M. A.; Mestres, C.; García Antón, J. M.; Espina, M.; Haro, I.; Reig, F. Interaction Energies of Cholesterol, Phosphatidylserine, and Phosphatidylcholine in Spread Mixed Monolayers at the Air-Water Interface. *Langmuir* **1991**, *7* (5), 975–977. <https://doi.org/10.1021/la00053a026>.
- (103) Gaines, G. L. Thermodynamic Relationships for Mixed Insoluble Monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* **1966**, *21* (3), 315–319. [https://doi.org/10.1016/0095-8522\(66\)90015-8](https://doi.org/10.1016/0095-8522(66)90015-8).
- (104) Adamson A.W.; A.P., G. *Physical Chemistry of Surfaces*, 6th ed.; Wiley: New York, 1997.
- (105) Rivas, A. A.; Castro, R. M. Interaction of Bovine Myelin Basic Protein with Triphosphoinositide. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *256* (2), 290–296. <https://doi.org/10.1006/jcis.2002.8689>.
- (106) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2.; Kluwer Academic/Plenum Publisher: New York, 1999.
- (107) Wollschläger, N. Festkörperunterstützte Lipiddoppelschichten Auf Silicium-Nanodrähten, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2012.
- (108) Masters, B. R. Imaging: A Laboratory Manual, by Rafael Yuste, Editor. *J. Biomed. Opt.* **2011**, *16* (3), 039901. <https://doi.org/10.1117/1.3562205>.
- (109) 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. <https://doi.org/10.1002/bbpc.19830871004>.
- (110) Dyck, M.; Kerth, A.; Blume, A.; Lo, M. Interaction of the Neurotransmitter, Neuropeptide Y, with Phospholipid Membranes: Infrared Spectroscopic Characterization at the Air/Water Interface. **2006**, 22152–22159.
- (111) McConnell, H. M.; Radhakrishnan, A. Condensed Complexes of Cholesterol and Phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2003**, *1610* (2), 159–173. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00015-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00015-4).
- (112) McConnell, H. M. Structures and Transitions in Lipid Monolayers at the Air-Water Interface. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1991**, *42* (1), 171–195. <https://doi.org/10.1146/annurev.pc.42.100191.001131>.
- (113) Stetefeld, J.; McKenna, S. A.; Patel, T. R. Dynamic Light Scattering: A Practical Guide and Applications in Biomedical Sciences. *Biophys. Rev.* **2016**, *8* (4), 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.
- (114) Bellmann, C.; Caspari, A.; Moitzi, C.; Babick, F. *Dynamische Und Elektrophoretische Lichtstreuung*; Anton Paar, 2018.
- (115) Pecora, R. Dynamic Light Scattering Measurements of Nanometer Particles in Liquids. *J. Nanoparticle Res.* **2000**, *2*, 123–131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1010067107182>.
- (116) Carpenter, D. K. Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology, and Physics (Berne, Bruce J.; Pecora, Robert). *J. Chem. Educ.* **1977**, *54* (10), A430. <https://doi.org/10.1021/ed054pA430.1>.
- (117) Einstein, A. *Investigations on the Theory of the Brownian Movement*; Dover Publication: New York, 1956.

- (118) Koppel, D. E. Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants. *J. Chem. Phys.* **1972**, *57* (11), 4814–4820. <https://doi.org/10.1063/1.1678153>.
- (119) Montes Ruiz-Cabello, F. J.; Trefalt, G.; Maroni, P.; Borkovec, M. Electric Double-Layer Potentials and Surface Regulation Properties Measured by Colloidal-Probe Atomic Force Microscopy. *Phys. Rev. E* **2014**, *90* (1), 012301. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.90.012301>.
- (120) Holoubek, J. Some Applications of Light Scattering in Materials Science. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* **2007**, *106* (1–3), 104–121. <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2007.01.013>.
- (121) Kaszuba, M.; Corbett, J.; Watson, F. M.; 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. <https://doi.org/10.1098/rsta.2010.0175>.
- (122) Chen, Z.; Wei, Z.; Chen, Y.; Dames, C. Anisotropic Debye Model for the Thermal Boundary Conductance. *Phys. Rev. B* **2013**, *87* (12), 125426. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.87.125426>.
- (123) Fritsch, R. J.; Krause, I. ELECTROPHORESIS. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*; Elsevier, 2003; pp 2055–2062. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01409-7>.
- (124) Delgado, A. V.; González-Caballero, F.; Hunter, R. J.; Koopal, L. K.; Lyklema, J. Measurement and Interpretation of Electrokinetic Phenomena. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *309* (2), 194–224. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.12.075>.
- (125) Bhattacharjee, S. DLS and Zeta Potential - What They Are and What They Are Not? *J. Control. Release* **2016**, *235*, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
- (126) Miller, J. F.; 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. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(91\)90286-H](https://doi.org/10.1016/0021-9797(91)90286-H).
- (127) Freire, J. M.; Domingues, M. M.; Matos, J.; Melo, M. N.; Veiga, A. S.; Santos, N. C.; Castanho, M. A. R. B. Using Zeta-Potential Measurements to Quantify Peptide Partition to Lipid Membranes. *Eur. Biophys. J.* **2011**, *40* (4), 481–487. <https://doi.org/10.1007/s00249-010-0661-4>.
- (128) Bordignon, E. *EPR Spectroscopy: Applications in Chemistry and Biology*; Drescher, M., Jeschke, G., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2012.
- (129) Chechik, V.; Carter, E.; Murphy, D. *Electron Paramagnetic Resonance*; Oxford University Press: New York, 2016.
- (130) Jeschke, G. Kurze Einführung in Die Elektronenparamagnetische Resonanzspektroskopie. *Skript Uni Konstanz* **2008**, 16.
- (131) Atherton, N. M. *Principles of Electron Spin Resonance*; Ellis Horwood: New York, 1993.
- (132) Abragam, A.; Pryce, M. H. L. 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. <https://doi.org/10.1098/rspa.1951.0022>.
- (133) Jeschke, G. Einführung in Die ESR-Spektroskopie. *Vor. Johannes-Gutenberg-Universität Mainz* **1998**.

- (134) Kirmse, R.; Stach, J. *ESR-Spektroskopie: Anwendungen in Der Chemie*; Akademie-Verlag: Berlin, 1985.
- (135) Molin, Y. N.; Salikhov, K. M.; Zamaraev, K. I. *Exchange - Principles and Applications in Chemistry and Biology*, 8th ed.; Springer Verlag: Berlin, 1980.
- (136) Slichter, C. P. *Principles of Magnetic Resonance*; Springer Series in Solid-State Sciences; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1990; Vol. 1. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-09441-9>.
- (137) J.N.Junk, M. *Assessing the Functional Structure of Molecular Transporters by EPR Spectroscopy*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2012. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-25135-1>.
- (138) Weickert, S.; Cattani, J.; Drescher, M. *Intrinsically Disordered Proteins (IDPs) Studied by EPR and in-Cell EPR*; 2019; Vol. 26. <https://doi.org/10.1039/9781788013888-00001>.
- (139) Julia Holterhues. *Analyse Der Signalweiterleitung Im Spinmarkierten Sensorischen Rhodopsin/Transducer-Komplex Mittels Zeitaufgelöster ESR-Spektroskopie*, Universität Osnabrück, 2009.
- (140) Hahn, E. L. Spin Echoes. *Phys. Rev.* **1950**, *80* (4), 580–594. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.80.580>.
- (141) Dzuba, S. A. Librational Motion of Guest Spin Probe Molecules in Glassy Media. *Phys. Lett. A* **1996**, *213* (1–2), 77–84. [https://doi.org/10.1016/0375-9601\(96\)00081-3](https://doi.org/10.1016/0375-9601(96)00081-3).
- (142) Mims, W. B. Envelope Modulation in Spin-Echo Experiments. *Phys. Rev. B* **1972**, *5* (7), 2409–2419. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.5.2409>.
- (143) Jeschke, G. DEER Distance Measurements on Proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012**, *63* (1), 419–446. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-032511-143716>.
- (144) Pannier, M.; Veit, S.; Godt, A.; Jeschke, G.; Spiess, H. W. Dead-Time Free Measurement of Dipole–Dipole Interactions between Electron Spins. *J. Magn. Reson.* **2011**, *213* (2), 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2011.08.035>.
- (145) Jeschke, G.; Polyhach, Y. Distance Measurements on Spin-Labelled Biomacromolecules by Pulsed Electron Paramagnetic Resonance. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9* (16), 1895–1910. <https://doi.org/10.1039/b614920k>.
- (146) Flegler, S. L.; Heckman, J. W.; Klomparens, K. L. *Elektronenmikroskopie: Grundlagen, Methoden, Anwendungen*; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin, Oxford, 1995.
- (147) Rutherford, E. LXXIX. The Scattering of α and β Particles by Matter and the Structure of the Atom. *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **1911**, *21* (125), 669–688. <https://doi.org/10.1080/14786440508637080>.
- (148) Robin Harris, J.; Horne, R. W. Negative Staining: A Brief Assessment of Current Technical Benefits, Limitations and Future Possibilities. *Micron* **1994**, *25* (1), 5–13. [https://doi.org/10.1016/0968-4328\(94\)90051-5](https://doi.org/10.1016/0968-4328(94)90051-5).
- (149) Harris, J. R. Negative Staining and Cryoelectron Microscopy. *Micros. Today* **1997**, *5* (1), 18–18. <https://doi.org/10.1017/S1551929500060016>.
- (150) Senthil Kumar, P.; Grace Pavithra, K.; Naushad, M. *Characterization Techniques for Nanomaterials*; Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813337-8.00004-7>.

- (151) Barna, Á.; Pécz, B.; Menyhard, M. TEM Sample Preparation by Ion Milling/Amorphization. *Micron* **1999**, *30* (3), 267–276. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(99\)00011-6](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(99)00011-6).
- (152) Lotnyk, A.; Poppitz, D.; Ross, U.; Gerlach, J. W.; Frost, F.; Bernütz, S.; Thelander, E.; Rauschenbach, B. Focused High- and Low-Energy Ion Milling for TEM Specimen Preparation. *Microelectron. Reliab.* **2015**, *55* (9–10), 2119–2125. <https://doi.org/10.1016/j.microrel.2015.07.005>.
- (153) Sridhara Rao, D. V.; Muraleedharan, K.; Humphreys, C. J. TEM Specimen Preparation Techniques. In *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*; Méndez-Vilas, A., Díaz, J., Eds.; Formatex Research Center, 2010; pp 1232–1244.
- (154) Wright, R. Transmission Electron Microscopy of Yeast. *Microsc. Res. Tech.* **2000**, *51* (6), 496–510. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20001215\)51:6<496::AID-JEMT2>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20001215)51:6<496::AID-JEMT2>3.0.CO;2-9).
- (155) Collins, V. P.; Arborgh, B.; Brunk, U. A Comparison of the Effects of Three Widely Used Glutaraldehyde Fixatives on Cellular Volume and Structure. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A Pathol.* **2009**, *85A* (2), 157–168. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1977.tb00413.x>.
- (156) De Carlo, S.; Harris, J. R. Negative Staining and Cryo-Negative Staining of Macromolecules and Viruses for TEM. *Micron* **2011**, *42* (2), 117–131. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.06.003>.
- (157) Bellare, J. R.; Davis, H. T.; Scriven, L. E.; Talmon, Y. Controlled Environment Vitrification System: An Improved Sample Preparation Technique. *J. Electron Microsc. Tech.* **1988**, *10* (1), 87–111. <https://doi.org/10.1002/jemt.1060100111>.
- (158) Danino, D. Cryo-TEM of Soft Molecular Assemblies. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2012**, *17* (6), 316–329. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.10.003>.
- (159) Oliveira, R. G.; Maggio, B. Compositional Domain Immiscibility in Whole Myelin Monolayers at the Air-Water Interface and Langmuir-Blodgett Films. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2002**, *1561* (2), 238–250. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00350-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00350-4).
- (160) Oliveira, R. G.; Calderón, R. O.; Maggio, B. Surface Behavior of Myelin Monolayers. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1998**, *1370* (1), 127–137. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(97\)00254-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(97)00254-X).
- (161) Oliveira, R. G.; Maggio, B. Epifluorescence Microscopy of Surface Domain Microheterogeneity in Myelin Monolayers at the Air-Water Interface. *Neurochem. Res.* **2000**, *25* (1), 77–86. <https://doi.org/10.1023/A:1007591516539>.
- (162) Surewicz, W. K.; Epand, R. M.; Epand, R. F.; Hallett, F. R.; Moscarello, M. A. Modulation of Myelin Basic Protein-Induced Aggregation and Fusion of Liposomes by Cholesterol, Aliphatic Aldehydes and Alkanes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1986**, *863* (1), 45–52. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(86\)90385-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(86)90385-8).
- (163) Boggs, J. M.; Chia, L.; Rangaraj, G.; Moscarello, M. A. Interaction of Myelin Basic Protein with Different Ionization States of Phosphatidic Acid and Phosphatidylserin. *Chem. Phys. Lipids* **1986**, *39*, 165–184.
- (164) Rispoli, P.; Carzino, R.; Svaldo-Lanero, T.; Relini, A.; Cavalleri, O.; Fasano, A.; Liuzzi, G. M.; Carlone, G.; Riccio, P.; Gliozzi, A.; et al. A Thermodynamic and Structural Study of Myelin Basic Protein in Lipid Membrane Models. *Biophys. J.* **2007**, *93* (6), 1999–2010. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.103820>.

- (165) Harauz, G.; Ladizhansky, V.; Boggs, J. M. Structural Polymorphism and Multifunctionality of Myelin Basic Protein. *Biochemistry* **2009**, *48* (34), 8094–8104. <https://doi.org/10.1021/bi901005f>.
- (166) McHenry, A. J.; Sciacca, M. F. M.; Brender, J. R.; Ramamoorthy, A. Does Cholesterol Suppress the Antimicrobial Peptide Induced Disruption of Lipid Raft Containing Membranes? *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2012**, *1818* (12), 3019–3024. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.07.021>.
- (167) Khondker, A.; Alsop, R. J.; Dhaliwal, A.; Saem, S.; Moran-Mirabal, J. M.; Rheinstädter, M. C. Membrane Cholesterol Reduces Polymyxin B Nephrotoxicity in Renal Membrane Analogs. *Biophys. J.* **2017**, *113* (9), 2016–2028. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.09.013>.
- (168) Matsuzaki, K.; Sugishita, K.; Fujii, N.; Miyajima, K. Molecular Basis for Membrane Selectivity of an Antimicrobial Peptide, Magainin 2. *Biochemistry* **1995**, *34* (10), 3423–3429. <https://doi.org/10.1021/bi00010a034>.
- (169) Bamm, V. V.; Lanthier, D. K.; Stephenson, E. L.; Smith, G. S. T.; Harauz, G. In Vitro Study of the Direct Effect of Extracellular Hemoglobin on Myelin Components. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2015**, *1852* (1), 92–103. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.10.009>.
- (170) MacRitchie, F. Air/Water Interface Studies of Proteins. *Anal. Chim. Acta* **1991**, *249*, 241–245.
- (171) Giehl, A.; Lemm, T.; Bartelsen, O.; Sandhoff, K.; Blume, A. Interaction of the GM2-Activator Protein with Phospholipid-Ganglioside Bilayer Membranes and with Monolayers at the Air-Water Interface. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *261* (3), 650–658. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00302.x>.
- (172) Calvez, P.; Demers, E.; Boisselier, E.; Salesse, C. Analysis of the Contribution of Saturated and Polyunsaturated Phospholipid Monolayers to the Binding of Proteins. *Langmuir* **2011**, *27* (4), 1373–1379. <https://doi.org/10.1021/la104097n>.
- (173) Demel, R. A. The Function of Sterol in Membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *457*, 109–132.
- (174) Fidalgo Rodriguez, J. L.; Caseli, L.; Minones Conde, J.; Dynarowicz-Latka, P. New Look for an Old Molecule – Solid/Solid Phase Transition in Cholesterol Monolayers. *Chem. Phys. Lipids* **2019**, *225*, 104819. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMPHYSLIP.2019.104819>.
- (175) Smaby, J. M.; Momsen, M. M.; Brockman, H. L.; Brown, R. E. Phosphatidylcholine Acyl Unsaturation Modulates the Decrease in Interfacial Elasticity Induced by Cholesterol. *Biophys. J.* **1997**, *73* (3), 1492–1505. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78181-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78181-5).
- (176) Kim, K.; Kim, C.; Byun, Y. Preparation of a Dipalmitoylphosphatidylcholine/Cholesterol Langmuir-Blodgett Monolayer That Suppresses Protein Adsorption. *Langmuir* **2001**, *17* (16), 5066–5070. <https://doi.org/10.1021/la0102096>.
- (177) Kodama, M.; Shibata, O.; Nakamura, S.; Lee, S.; Sugihara, G. A Monolayer Study on Three Binary Mixed Systems of Dipalmitoyl Phosphatidyl Choline with Cholesterol, Cholestanol and Stigmasterol. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2004**, *33* (3–4), 211–226. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.10.008>.
- (178) Blume, A.; Kerth, A. Peptide and Protein Binding to Lipid Monolayers Studied by FT-IRRA Spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2013**, *1828* (10), 2294–2305. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.014>.

- (179) Sankaram, M. B.; Brophy, P. J.; Marsh, D. Spin-Label ESR Studies on the Interaction of Bovine Spinal Cord Myelin Basic Protein with Dimyristoylphosphatidylglycerol Dispersions. *Biochemistry* **1989**, *28* (25), 9685–9691. <https://doi.org/10.1021/bi00451a022>.
- (180) MacNaughtan, W.; Snook, K. A.; Caspi, E.; Franks, N. P. An X-Ray Diffraction Analysis of Oriented Lipid Multilayers Containing Basic Proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1985**, *818* (2), 132–148. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90556-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90556-5).
- (181) Boggs J. M., Moscarello M. A., Papahadjopoulos D. *Lipid-Protein Interactions*, Volume 2.; Jost, P., Griffith, O. H., Eds.; Wiley: New York, 1982.
- (182) Rosetti, C. M.; Maggio, B. Protein-Induced Surface Structuring in Myelin Membrane Monolayers. *Biophys. J.* **2007**, *93* (12), 4254–4267. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.112441>.
- (183) Leathes, J. B. Croonian Lectures On The Role Of Fats In Vital Phenomena. *Lancet* **1925**, *205* (5306), 957–962. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)22402-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)22402-7).
- (184) Rosetti, C. M.; Maggio, B.; Oliveira, R. G. 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. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.02.007>.
- (185) Demel R. A., Bruckdorfer K. R., van D. L. L. Structural Requirements of Sterols for the Interaction with Lecithin at the Air Water Interface. *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *255* (1), 311–320.
- (186) McConnell, H. M.; Tamm, L. K.; Weis, R. M. Periodic Structures in Lipid Monolayer Phase Transitions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1984**, *81* (10), 3249–3253. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.10.3249>.
- (187) Silvius, J. R. Partitioning of Membrane Molecules between Raft and Non-Raft Domains: Insights from Model-Membrane Studies. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2005**, *1746* (3), 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.09.003>.
- (188) García-Sáez, A. J.; Chiantia, S.; Schwille, P. Effect of Line Tension on the Lateral Organization of Lipid Membranes. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (46), 33537–33544. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706162200>.
- (189) Rosetti, C. M.; Montich, G. G.; Pastorino, C. Molecular Insight into the Line Tension of Bilayer Membranes Containing Hybrid Polyunsaturated Lipids. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121* (7), 1587–1600. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b10836>.
- (190) Slotte, J. P. Lateral Domain Formation in Mixed Monolayers Containing Cholesterol and Dipalmitoylphosphatidylcholine or N-Palmitoylsphingomyelin. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1995**, *1235* (2), 419–427. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)80031-A](https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)80031-A).
- (191) Worthman, L. A. D.; Nag, K.; Davis, P. J.; Keough, K. M. W. Cholesterol in Condensed and Fluid Phosphatidylcholine Monolayers Studied by Epifluorescence Microscopy. *Biophys. J.* **1997**, *72* (6), 2569–2580. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78900-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78900-8).
- (192) Slotte, J. P.; Mattjus, P. Visualization of Lateral Phases in Cholesterol and Phosphatidylcholine Monolayers at the Air/Water Interface - a Comparative Study with Two Different Reporter Molecules. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1995**, *1254* (1), 22–29. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(94\)00159-V](https://doi.org/10.1016/0005-2760(94)00159-V).

- (193) Keller, S. L.; Mc Connell, H. M. Stripe Phases in Lipid Monolayers near a Miscibility Critical Point. *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *82* (7), 1602–1605. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.82.1602>.
- (194) Stottrup, B. L.; Stevens, D. S.; Keller, S. L. Miscibility of Ternary Mixtures of Phospholipids and Cholesterol in Monolayers, and Application to Bilayer Systems. *Biophys. J.* **2005**, *88* (1), 269–276. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.048439>.
- (195) Stottrup, B. L.; Keller, S. L. Phase Behavior of Lipid Monolayers Containing DPPC and Cholesterol Analogs. *Biophys. J.* **2006**, *90* (9), 3176–3183. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.072959>.
- (196) Yeagle, P. L. Cholesterol and Related Sterols. In *The Membranes of Cells*; Elsevier, 2016; pp 189–218. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800047-2.00009-7>.
- (197) Sakanishi, A.; Mitaku, S.; Ikegami, A. Stabilizing Effect of Cholesterol on Phosphatidylcholine Vesicles Observed by Ultrasonic Velocity Measurement. *Biochemistry* **1979**, *18* (12), 2636–2642. <https://doi.org/10.1021/bi00579a032>.
- (198) Polverini, E.; Arisi, S.; Cavatorta, P.; Berzina, T.; Cristofolini, L.; Fasano, A.; Riccio, P.; Fontana, M. P. Interaction of Myelin Basic Protein with Phospholipid Monolayers: Mechanism of Protein Penetration. *Langmuir* **2003**, *19* (3), 872–877. <https://doi.org/10.1021/la020801a>.
- (199) Boggs, J. M.; Wood, D. D.; Moscarello, M. A. Hydrophobic and Electrostatic Interactions of Myelin Basic Protein with Lipid. Participation of N-Terminal and C-Terminal Portions. *Biochemistry* **1981**, *20* (5), 1065–1073. <https://doi.org/10.1021/bi00508a004>.
- (200) Cristofolini, L.; Fontana, M. P.; Serra, F.; Fasano, A.; Riccio, P.; Konovalov, O. Microstructural Analysis of the Effects of Incorporation of Myelin Basic Protein in Phospholipid Layers. *Eur. Biophys. J.* **2005**, *34* (8), 1041–1048. <https://doi.org/10.1007/s00249-005-0489-5>.
- (201) Ballanyi, K.; Kettenmann, H. Intracellular Na⁺ Activity in Cultured Mouse Oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.* **1990**, *26* (4), 455–460. <https://doi.org/10.1002/jnr.490260408>.
- (202) Kettenmann, H. K⁺ and Cl⁻ Uptake by Cultured Oligodendrocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1987**, *65* (5), 1033–1037. <https://doi.org/10.1139/y87-163>.
- (203) Bates, I. R.; Matharu, P.; Ishiyama, N.; Rochon, D.; Wood, D. D.; Polverini, E.; Moscarello, M. A.; Viner, N. J.; Harauz, G. Characterization of a Recombinant Murine 18.5-KDa Myelin Basic Protein. *Protein Expr. Purif.* **2000**, *20* (2), 285–299. <https://doi.org/10.1006/prev.2000.1307>.
- (204) Pointer-Keenan, C. D.; Lee, D.-K.; Hallok, K.; Tan, A.; Zand, R.; Ramamoorthy, A. Investigation of the Interaction of Myelin Basic Protein with Phospholipid Bilayers Using Solid-State NMR Spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids* **2004**, *132* (1), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2004.09.004>.
- (205) Boggs, J. M.; Rangaraj, G.; Koshy, K. M.; Ackerley, C.; Wood, D. D.; Moscarello, M. A. Highly Deiminated Isoform of Myelin Basic Protein from Multiple Sclerosis Brain Causes Fragmentation of Lipid Vesicles. *J. Neurosci. Res.* **1999**, *57* (4), 529–535. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990815\)57:4<529::AID-JNR12>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990815)57:4<529::AID-JNR12>3.0.CO;2-O).
- (206) Meller, K. Cryo-Electron Microscopy of Vitriified Nerve Myelin. *Cell Tissue Res.* **1990**, *262* (1), 59–66. <https://doi.org/10.1007/BF00327746>.

- (207) Bayburt, T. H.; Sligar, S. G. Membrane Protein Assembly into Nanodiscs. *FEBS Lett.* **2010**, *584* (9), 1721–1727. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.024>.
- (208) 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. <https://doi.org/10.3390/cells9030529>.
- (209) Waisman, D.; Danino, D.; Weintraub, Z.; Schmidt, J.; Talmon, Y. Nanostructure of the Aqueous Form of Lung Surfactant of Different Species Visualized by Cryo-Transmission Electron Microscopy. *Clin. Physiol. Funct. Imaging* **2007**, *27* (6), 375–380. <https://doi.org/10.1111/j.1475-097X.2007.00763.x>.
- (210) Jo, E.; Boggs, J. M. Aggregation of Acidic Lipid Vesicles by Myelin Basic Protein: Dependence on Potassium Concentration. *Biochemistry* **1995**, *34* (41), 13705–13716. <https://doi.org/10.1021/bi00041a053>.
- (211) Scherfeld, D.; Kahya, N.; Schwille, P. Lipid Dynamics and Domain Formation in Model Membranes Composed of Ternary Mixtures of Unsaturated and Saturated Phosphatidylcholines and Cholesterol. *Biophys. J.* **2003**, *85* (6), 3758–3768. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74791-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74791-2).
- (212) Raguz, M.; Kumar, S. N.; Zareba, M.; Ilic, N.; Mainali, L.; Subczynski, W. K. Confocal Microscopy Confirmed That in Phosphatidylcholine Giant Unilamellar Vesicles with Very High Cholesterol Content Pure Cholesterol Bilayer Domains Form. *Cell Biochem. Biophys.* **2019**, *77* (4), 309–317. <https://doi.org/10.1007/s12013-019-00889-y>.
- (213) Subczynski, W. K.; Kusumi, A. Dynamics of Raft Molecules in the Cell and Artificial Membranes: Approaches by Pulse EPR Spin Labeling and Single Molecule Optical Microscopy. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2003**, *1610* (2), 231–243. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00021-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00021-X).
- (214) Subczynski, W. K.; Wisniewska, A.; Subczynski, W. K.; Wisniewska, A.; Yin, J. J.; Hyde, J. S.; Kusumi, A. Hydrophobic Barriers of Lipid Bilayer Membranes Formed by Reduction of Water Penetration by Alkyl Chain Unsaturation and Cholesterol. *Biochemistry* **1994**, *33* (24), 7670–7681. <https://doi.org/10.1021/bi00190a022>.
- (215) Heimburg, T. *Thermal Biophysics of Membranes, Tutorials in Biophysics*; John Wiley & Sons, 2008.
- (216) Garcia-Manyes, S.; Oncins, G.; Sanz, F. Effect of Temperature on the Nanomechanics of Lipid Bilayers Studied by Force Spectroscopy. *Biophys. J.* **2005**, *89* (6), 4261–4274. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.065581>.
- (217) Kirby, B. J.; Hasselbrink, E. F. Zeta Potential of Microfluidic Substrates: 1. Theory, Experimental Techniques, and Effects on Separations. *Electrophoresis* **2004**, *25* (2), 187–202. <https://doi.org/10.1002/elps.200305754>.
- (218) Le Breton, N.; Martinho, M.; Mileo, E.; Etienne, E.; Gerbaud, G.; Guigliarelli, B.; Belle, V. Exploring Intrinsically Disordered Proteins Using Site-Directed Spin Labeling Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Front. Mol. Biosci.* **2015**, *2*. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2015.00021>.
- (219) Hubbell, W. L.; López, C. J.; Altenbach, C.; Yang, Z. Technological Advances in Site-Directed Spin Labeling of Proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, *23* (5), 725–733. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.06.008>.

- (220) Fanucci, G.; Cafiso, D. Recent Advances and Applications of Site-Directed Spin Labeling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16* (5), 644–653. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.08.008>.
- (221) Hauenschild, T.; Reichenwallner, J.; Enkelmann, V.; Hinderberger, D. Characterizing Active Pharmaceutical Ingredient Binding to Human Serum Albumin by Spin-Labeling and EPR Spectroscopy. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22* (36), 12825–12838. <https://doi.org/10.1002/chem.201601810>.
- (222) Eaton, G. R.; Eaton, S. S.; Barr, D. P.; Weber, R. T. *Quantitative EPR*; Springer Science & Business Media: Wien, New York, 2010.
- (223) Raguz, M.; Mainali, L.; Widomska, J.; Subczynski, W. K. Using Spin-Label Electron Paramagnetic Resonance (EPR) to Discriminate and Characterize the Cholesterol Bilayer Domain. *Chem. Phys. Lipids* **2011**, *164* (8), 819–829. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.08.001>.
- (224) Berliner, L. J. *SpinLabeling I, Theory and Applications*; Horecker, B., Kaplan, N., Marmur, J., Scheraga, H., Eds.; Academic Press: New York, 1976.
- (225) Israelachvili, J.; Sjösten, J.; Eriksson, L. E. G.; Ehrström, M.; Gräslund, A.; Ehrenberg, A. ESR Spectral Analysis of the Molecular Motion of Spin Labels in Lipid Bilayers and Membranes Based on a Model in Terms of Two Angular Motional Parameters and Rotational Correlation Times. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1975**, *382* (2), 125–141. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(75\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(75)90171-6).
- (226) Subczynski, W. K.; Widomska, J.; Feix, J. B. Their Influence on Chemical Reactions in a Membrane Environment. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *46* (6), 707–718. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.024>.
- (227) Fretten, P.; Morris, S. J.; Watts, A.; Marsh, D. Lipid-Lipid and Lipid-Protein Interactions in Chromaffin Granule Membranes. A Spin Label ESR Study. *BBA - Biomembr.* **1980**, *598* (2), 247–259. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(80\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(80)90003-6).
- (228) W.I., C.; Shipley, G. G. Sphingomyelin-Lecithin Bilayers and Their Interaction with Cholesterol. *Biochemistry* **1979**, *18* (9), 1717–1722.
- (229) Simunovic, M.; Voth, G. A.; Callan-Jones, A.; Bassereau, P. When Physics Takes Over: BAR Proteins and Membrane Curvature. *Trends Cell Biol.* **2015**, *25* (12), 780–792. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.09.005>.
- (230) Sorre, B.; Callan-Jones, A.; Manneville, J.-B.; Nassoy, P.; Joanny, J.-F.; Prost, J.; Goud, B.; Bassereau, P. Curvature-Driven Lipid Sorting Needs Proximity to a Demixing Point and Is Aided by Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (14), 5622–5626. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811243106>.
- (231) Stoll, S.; Schweiger, A. EasySpin, a Comprehensive Software Package for Spectral Simulation and Analysis in EPR. *J. Magn. Reson.* **2006**, *178* (1), 42–55. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2005.08.013>.
- (232) Marsh, D. Distinct Populations in Spin-Label EPR Spectra from Nitroxides. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122* (23), 6129–6133. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.7b11294>.
- (233) Natali, F.; Relini, A.; Gliozzi, A.; Rolandi, R.; Cavatorta, P.; Deriu, A.; Fasano, A.; Riccio, P. Protein–Membrane Interaction: Effect of Myelin Basic Protein on the Dynamics of Oriented Lipids. *Chem. Phys.* **2003**, *292* (2–3), 455–464. [https://doi.org/10.1016/S0301-0104\(03\)00255-6](https://doi.org/10.1016/S0301-0104(03)00255-6).

- (234) Knoll, W.; Peters, J.; Kursula, P.; Gerelli, Y.; Ollivier, J.; Demé, B.; Telling, M.; Kemner, E.; Natali, F. Structural and Dynamical Properties of Reconstituted Myelin Sheaths in the Presence of Myelin Proteins MBP and P2 Studied by Neutron Scattering. *Soft Matter* **2014**, *10* (3), 519–529. <https://doi.org/10.1039/C3SM51393A>.
- (235) Kusumi, A.; Pasenkiewicz-gierula, M. Rotational Diffusion of a Steroid Molecule in Phosphatidylcholine Membranes: Effects of Alkyl Chain Length, Unsaturation, and Cholesterol As Studied by a Spin-Label Method. *Biochemistry* **1988**, *27* (12), 4407–4415. <https://doi.org/10.1021/bi00412a030>.
- (236) Persaud, R.; Boggs, J. M.; Wood, D. D.; Moscarello, M. A. Interaction of Glycosylated Human Myelin Basic Protein with Lipid Bilayers. *Biochem. (John Wiley Sons)* **1989**, *28* (10), 4209–4216. <https://doi.org/10.1021/bi00436a013>.
- (237) Kučerka, N.; Pencer, J.; Nieh, M.-P.; Katsaras, J. Influence of Cholesterol on the Bilayer Properties of Monounsaturated Phosphatidylcholine Unilamellar Vesicles. *Eur. Phys. J. E* **2007**, *23* (3), 247–254. <https://doi.org/10.1140/epje/i2007-10202-8>.
- (238) Milov, A. D.; Ponomarev, A. B.; Tsvetkov, Y. D. Electron-Electron Double Resonance in Electron Spin Echo: Model Biradical Systems and the Sensitized Photolysis of Decalin. *Chem. Phys. Lett.* **1984**, *110* (1), 67–72. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(84\)80148-7](https://doi.org/10.1016/0009-2614(84)80148-7).
- (239) Kattinig, D. R.; Bund, T.; Boggs, J. M.; Harauz, G.; Hinderberger, D. Lateral Self-Assembly of 18.5-KDa Myelin Basic Protein (MBP) Charge Component-C1 on Membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2012**, *1818* (11), 2636–2647. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.06.010>.
- (240) Jeschke, G.; Panek, G.; Godt, A.; Bender, A.; Paulsen, H. Data Analysis Procedures for Pulse ELDOR Measurements of Broad Distance Distributions. *Appl. Magn. Reson.* **2004**, *26* (1–2), 223–244. <https://doi.org/10.1007/BF03166574>.
- (241) Róg, T.; Pasenkiewicz-Gierula, M. Cholesterol Effects on a Mixed-Chain Phosphatidylcholine Bilayer: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Biochimie* **2006**, *88* (5), 449–460. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.10.005>.
- (242) Bourre, J. M.; Cloez, I.; Galliot, M.; Buisine, A.; Dumont, O.; Piciotti, M.; Prouillet, F.; Bourdon, R. Occurrence of Manganese, Copper and Zinc in Myelin. Alterations in the Peripheral Nervous System of Dysmyelinating Trembler Mutant Are at Variance with Brain Mutants (Quaking and Shiverer). *Neurochem. Int.* **1987**, *10* (3), 281–286. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(87\)90101-X](https://doi.org/10.1016/0197-0186(87)90101-X).
- (243) Nuzzo, S.; Meneghini, C.; Mobilio, S.; Haas, H.; Riccio, P.; Fasano, A.; Cavatorta, P.; Morante, S. An X-Ray Absorption Spectroscopy Study of the Zinc Environment in Langmuir-Blodgett Phospholipid Multilayers. *Biophys. J.* **2002**, *83* (6), 3507–3512. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75350-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75350-2).
- (244) Benfatto, M.; Della Longa, S.; Qin, Y.; Li, Q.; Pan, G.; Wu, Z.; Morante, S. The Role of Zn in the Interplay among Langmuir-Blodgett Multilayer and Myelin Basic Protein: A Quantitative Analysis of XANES Spectra. *Biophys. Chem.* **2004**, *110* (1–2), 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2004.02.003>.
- (245) Keen, C. L.; Taubeneck, M. W.; Daston, G. P.; Rogers, J. M.; Gershwin, M. E. Primary and Secondary Zinc Deficiency as Factors Underlying Abnormal CNS Development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, *678* (1 Maternal Nutr), 37–47. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb26108.x>.

- (246) Koh, J.-Y. Zinc and Disease of the Brain. *Mol. Neurobiol.* **2001**, *24* (1–3), 099–106. <https://doi.org/10.1385/MN:24:1-3:099>.
- (247) Ünal, B.; Tan, H.; Orbak, Z.; Kiki, İ.; Bilici, M.; Bilici, N.; Aslan, H.; Kaplan, S. Morphological Alterations Produced by Zinc Deficiency in Rat Sciatic Nerve: A Histological, Electron Microscopic, and Stereological Study. *Brain Res.* **2005**, *1048* (1–2), 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.05.001>.
- (248) Mo, Z.-Y.; Zhu, Y.-Z.; Zhu, H.-L.; Fan, J.-B.; Chen, J.; Liang, Y. Low Micromolar Zinc Accelerates the Fibrillization of Human Tau via Bridging of Cys-291 and Cys-322. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (50), 34648–34657. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.058883>.
- (249) Böckmann, R. A.; Grubmüller, H. Multistep Binding of Divalent Cations to Phospholipid Bilayers: A Molecular Dynamics Study. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2004**, *43* (8), 1021–1024. <https://doi.org/10.1002/anie.200352784>.
- (250) Akutsu, H.; Nagamori, T. Conformational Analysis of the Polar Head Group in Phosphatidylcholine Bilayers: A Structural Change Induced by Cations. *Biochemistry* **1991**, *30* (18), 4510–4516. <https://doi.org/10.1021/bi00232a020>.
- (251) Sachs, J. N.; Nanda, H.; Petrache, H. I.; Woolf, T. B. Changes in Phosphatidylcholine Headgroup Tilt and Water Order Induced by Monovalent Salts: Molecular Dynamics Simulations. *Biophys. J.* **2004**, *86* (6), 3772–3782. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.035816>.
- (252) Müller, E.; Giehl, A.; Schwarzmann, G.; Sandhoff, K.; Blume, A. Oriented 1,2-Dimyristoyl-Sn-Glycero-3-Phosphorylcholine/Ganglioside Membranes: A Fourier Transform Infrared Attenuated Total Reflection Spectroscopic Study. Band Assignments; Orientational, Hydrational, and Phase Behavior; and Effects of Ca²⁺ Binding. *Biophys. J.* **1996**, *71* (3), 1400–1421. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79342-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79342-6).
- (253) Janiak, C.; Meyer, H.-J.; Gudat, D.; Kurz, P. *Riedel Moderne Anorganische Chemie*, 5.; De Gruyter: Berlin/Boston, 2018.
- (254) Lehrmann, R.; Seelig, J. Adsorption of Ca²⁺ and La³⁺ to Bilayer Membranes: Measurement of the Adsorption Enthalpy and Binding Constant with Titration Calorimetry. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1994**, *1189* (1), 89–95. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90284-4](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90284-4).
- (255) Garidel, P.; Blume, A.; Hübner, W. A Fourier Transform Infrared Spectroscopic Study of the Interaction of Alkaline Earth Cations with the Negatively Charged Phospholipid 1,2-Dimyristoyl-Sn-Glycero-3-Phosphoglycerol. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2000**, *1466* (1–2), 245–259. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00166-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00166-8).
- (256) Ho, S.-Y.; Catalanotto, F. A.; Lisak, R. P.; Dore-Duffy, P. Zinc in Multiple Sclerosis. II: Correlation with Disease Activity and Elevated Plasma Membrane-Bound Zinc in Erythrocytes from Patients with Multiple Sclerosis. *Ann. Neurol.* **1986**, *20* (6), 712–715. <https://doi.org/10.1002/ana.410200610>.
- (257) Subczynski, W. K.; Markowska, E.; Gruszecki, W. I.; Sielewiesiuk, J. Effects of Polar Carotenoids on Dimyristoylphosphatidylcholine Membranes: A Spin-Label Study. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1992**, *1105* (1), 97–108. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(92\)90167-K](https://doi.org/10.1016/0005-2736(92)90167-K).

- (258) Stepien, P.; Polit, A.; Wisniewska-Becker, A. Comparative EPR Studies on Lipid Bilayer Properties in Nanodiscs and Liposomes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2015**, *1848* (1), 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.004>.
- (259) Duda, M.; Cygan, K.; Wisniewska-Becker, A. Effects of Curcumin on Lipid Membranes: An EPR Spin-Label Study. *Cell Biochem. Biophys.* **2020**, *78* (2), 139–147. <https://doi.org/10.1007/s12013-020-00906-5>.
- (260) Subczynski, W. K.; Widomska, J.; Feix, J. B. Physical Properties of Lipid Bilayers from EPR Spin Labeling and Their Influence on Chemical Reactions in a Membrane Environment. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46* (6), 707–718. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.024>.
- (261) Marsh, D. Electron Spin Resonance: Spin Labels; 1981; pp 51–142. https://doi.org/10.1007/978-3-642-81537-9_2.
- (262) Ge, M.; Freed, J. H. Hydration, Structure, and Molecular Interactions in the Headgroup Region of Dioleoylphosphatidylcholine Bilayers: An Electron Spin Resonance Study. *Biophys. J.* **2003**, *85* (6), 4023–4040. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74816-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74816-4).
- (263) Schrader, A. M.; Han, S. Location of the TEMPO Moiety of TEMPO-PC in Lipid Bilayers. *Biophys. J.* **2017**, *113* (4), 966–969. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.04.057>.
- (264) ter Beest, M. B. A.; Hoekstra, D. Interaction of Myelin Basic Protein with Artificial Membranes: Parameters Governing Binding, Aggregation and Dissociation. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *211* (3), 689–696. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17597.x>.
- (265) Keniry, M. A.; Smith, R. Circular Dichroic Analysis of the Secondary Structure of Myelin Basic Protein and Derived Peptides Bound to Detergents and to Lipid Vesicles. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct.* **1979**, *578* (2), 381–391. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(79\)90169-7](https://doi.org/10.1016/0005-2795(79)90169-7).
- (266) Stepien, P.; Augustyn, B.; Poojari, C.; Galan, W.; Polit, A.; Vattulainen, I.; Wisniewska-Becker, A.; Rog, T. Complexity of Seemingly Simple Lipid Nanodiscs. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2020**, *1862* (11), 183420. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183420>.
- (267) Binder, H.; Arnold, K.; Ulrich, A. S.; Zschörnig, O. Interaction of Zn²⁺ with Phospholipid Membranes. *Biophys. Chem.* **2001**, *90* (1), 57–74. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(01\)00130-2](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(01)00130-2).
- (268) Riccio, P.; Fasano, A.; Borenshtein, N.; Blevé-Zacheo, T.; Kirschner, D. A. Multilamellar Packing of Myelin Modeled by Lipid-Bound MBP. *J. Neurosci. Res.* **2000**, *59* (4), 513–521. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(20000215\)59:4<513::AID-JNR6>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(20000215)59:4<513::AID-JNR6>3.0.CO;2-M).
- (269) Garcia-Manyes, S.; Oncins, G.; Sanz, F. Effect of Ion-Binding and Chemical Phospholipid Structure on the Nanomechanics of Lipid Bilayers Studied by Force Spectroscopy. *Biophys. J.* **2005**, *89* (3), 1812–1826. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.064030>.
- (270) Jeschke, G.; Chechik, V.; Ionita, P.; Godt, A.; Zimmermann, H.; Banham, J.; Timmel, C. R.; Hilger, D.; Jung, H. DeerAnalysis2006—a Comprehensive Software Package for Analyzing Pulsed ELDOR Data. *Appl. Magn. Reson.* **2006**, *30*, 473–498.
- (271) Su, M.; Xu, F.; Cai, X.; Ren, K.; Shen, J. Optimization of Regularization Parameter of Inversion in Particle Sizing Using Light Extinction Method. *China Particuology* **2007**, *5* (4), 295–299. <https://doi.org/10.1016/j.cpart.2007.04.005>.

- (272) Provencher, S. W. CONTIN: A General Purpose Constrained Regularization Program for Inverting Noisy Linear Algebraic and Integral Equations. *Comput. Phys. Commun.* **1982**, *27*, 229–242.
- (273) Provencher, S. W. A Constrained Regularization Method for Inverting Data Represented by Linear Algebraic or Integral Equations. *Comput. Phys. Commun.* **1982**, *27* (3), 213–227. [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(82\)90173-4](https://doi.org/10.1016/0010-4655(82)90173-4).
- (274) Moitzi, C.; Petrillo, B. Faster, More Sensitive Zeta-Potential Measurements with CmPALS and the Litesizer 500. Anton paar application report d51/a021 technical report, 2016.
- (275) Schneider, D. J.; Freed, J. H. Calculating Slow Motion Magnetic Resonance Spectra. In *Biological Magnetic Resonance*; Berliner, L. J., Reuben, J., Eds.; Plenum Press: New York, 1989; pp 1–76.
- (276) Timofeev, V. P.; Misharin, A. Y.; 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. <https://doi.org/10.1134/S0006350911030274>.
- (277) Hinderberger, D.; Jeschke, G. Site-Specific Characterization of Structure and Dynamics of Complex Materials by EPR Spin Probes. *Mod. Magn. Reson.* **2008**, 1529–1537. https://doi.org/10.1007/1-4020-3910-7_170.
- (278) Budil, D. E.; Earle, K. A.; Freed, J. H. Full Determination of the Rotational Diffusion Tensor by Electron Paramagnetic Resonance at 250 GHz. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97* (7), 1294–1303. <https://doi.org/10.1021/j100109a009>.
- (279) Blume, R. J. Electron Spin Relaxation Times in Sodium-Ammonia Solutions. *Phys. Rev.* **1958**, *109* (6), 1867–1873. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.109.1867>.
- (280) Habib, C. A.; Liu, M.; Bawany, N.; Garbern, J.; Krumbein, I.; Mentzel, H.-J.; Reichenbach, J.; Magnano, C.; Zivadinov, R.; Haacke, E. M. Assessing Abnormal Iron Content in the Deep Gray Matter of Patients with Multiple Sclerosis versus Healthy Controls. *Am. J. Neuroradiol.* **2012**, *33* (2), 252–258. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A2773>.
- (281) Bamm, V. V.; Harauz, G. “Back to the Future” or Iron in the MS Brain – Commentary on “Perivascular Iron Deposits Are Associated with Protein Nitration in Cerebral Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Neurosci. Lett.* **2014**, *582*, 130–132. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.05.052>.
- (282) Bamm, V. V.; Henein, M. E. L.; Sproul, S. L. J.; Lanthier, D. K.; Harauz, G. Potential Role of Ferric Hemoglobin in MS Pathogenesis: Effects of Oxidative Stress and Extracellular Methemoglobin or Its Degradation Products on Myelin Components. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *112* (August), 494–503. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.022>.
- (283) Dong, Y.; D’Mello, C.; Pinsky, W.; Lozinski, B. M.; Kaushik, D. K.; Ghorbani, S.; Moezzi, D.; Brown, D.; Melo, F. C.; Zandee, S.; et al. Oxidized Phosphatidylcholines Found in Multiple Sclerosis Lesions Mediate Neurodegeneration and Are Neutralized by Microglia. *Nat. Neurosci.* **2021**, *24* (4), 489–503. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00801-z>.
- (284) Lee, D. W.; Min, Y.; Dhar, P.; Ramachandran, A.; Israelachvili, J. N.; Zasadzinski, J. A. Relating Domain Size Distribution to Line Tension and Molecular Dipole Density in Model Cytoplasmic Myelin Lipid Monolayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (23), 9425–9430. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106368108>.

- (285) Min, Y.; Alig, T. F.; Lee, D. W.; Boggs, J. M.; Israelachvili, J. N.; Zasadzinski, J. A. Critical and Off-Critical Miscibility Transitions in Model Extracellular and Cytoplasmic Myelin Lipid Monolayers. *Biophys. J.* **2011**, *100* (6), 1490–1498. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.02.009>.
- (286) Lee, D. W.; Banquy, X.; Kristiansen, K.; Kaufman, Y.; Boggs, J. M.; Israelachvili, J. N. Lipid Domains Control Myelin Basic Protein Adsorption and Membrane Interactions between Model Myelin Lipid Bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (8). <https://doi.org/10.1073/pnas.1401165111>.
- (287) Sebastian Michler. Untersuchungen von Lipid-Monoschichten Mit Der Zusammensetzung Der Erkrankten, Cytoplasmischen Myelin-Membran, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2020.

8 Anhang

A 1. Zusammensetzungen der Lipid-Stammlösungen

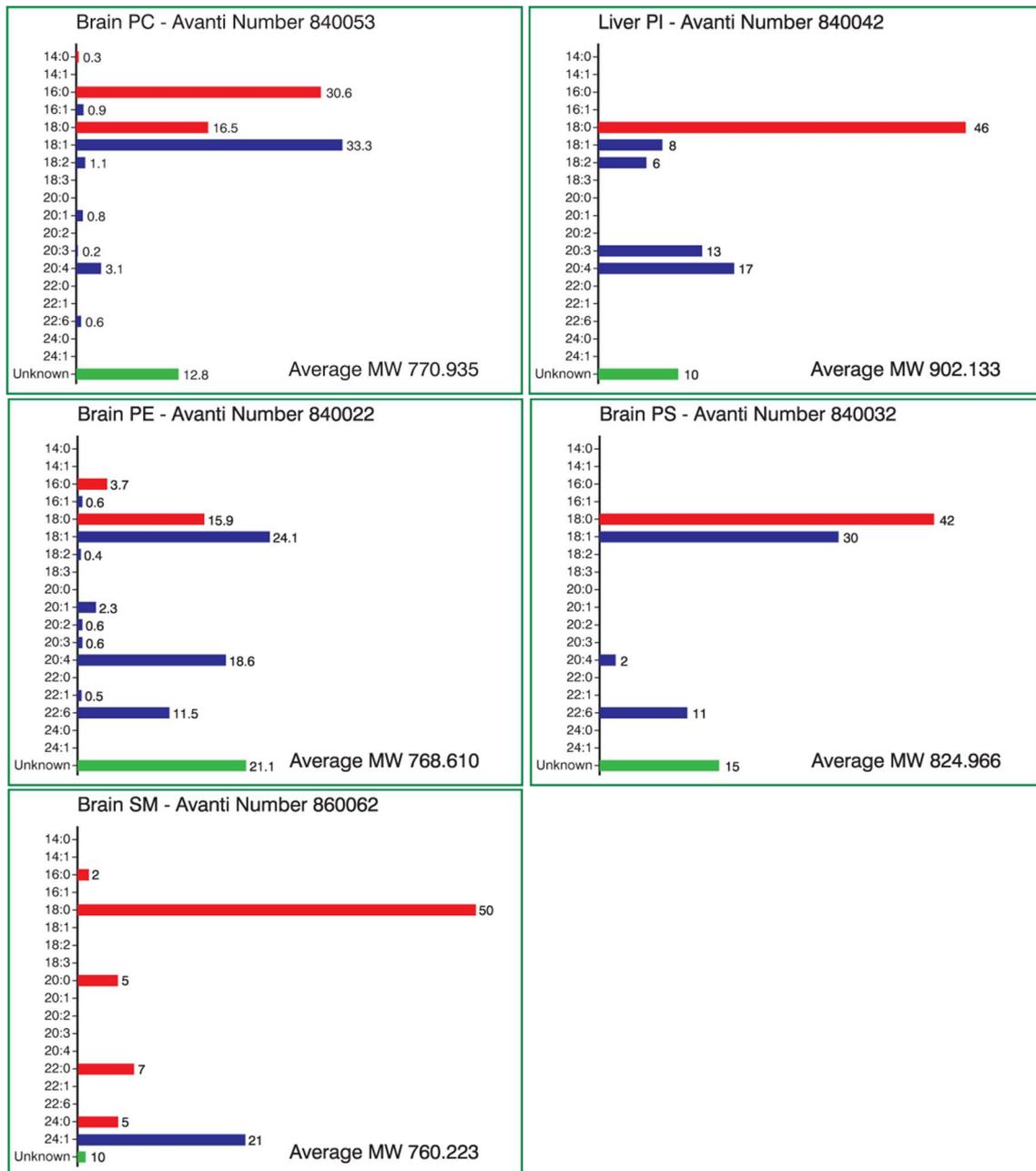


Abbildung A1: Fettsäureverteilungen der verwendeten Lipidextrakte.

8.1 Anhang zu Kapitel 3.1

A 2. Kalkulierte ideale Oberfläche von Lipidmischungen

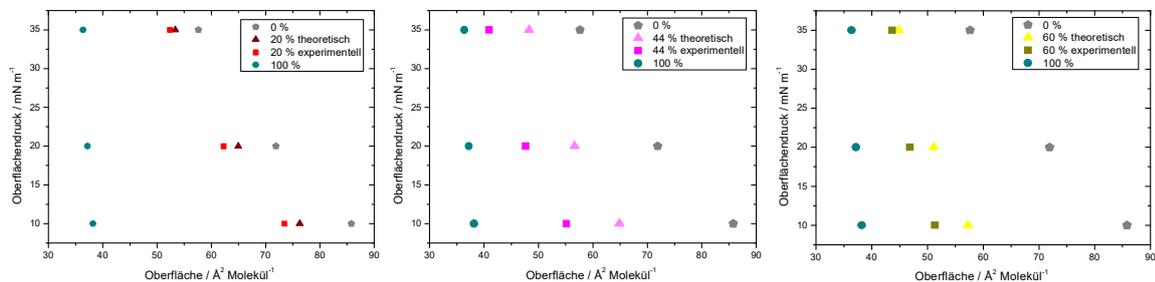


Abbildung A2: Experimentelle Oberflächendruck/-Flächenwerte bei 10 mN/m, 20 mN/m und 35 mN/m mit berechneten idealen Oberflächen von Lipidmischungen mit einem Cholesterolgehalt von 20% (links), 44% (Mitte) und 60% (rechts) auf einer Subphase von HEPES-NaCl-Puffer (20 °C).

Die experimentellen Daten für den Oberflächendruck und die Oberfläche wurden aus den Kompressionsisothermen bei spezifischen Druckpunkten von 10 mN/m, 20 mN/m und 30 mN/m entnommen. Um die theoretischen Werte bei den drei Oberflächendrücken für die Lipidmischungen mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt in der Monoschicht zu berechnen, wurden die Isothermen von nur Lipiden (0% Cholesterol) und reinem Cholesterol (100%) verwendet. Nach $\bar{A} = x_{chol} * A_{chol} + x_{lipids} * A_{lipids}$ (G2) wurden diese bestimmt, wobei \bar{A} die durchschnittliche Molekülfläche der Monoschicht ist, A_{chol} und A_{lipids} sind die Oberflächen der reinen Cholesterol- bzw. reinen Lipidisotheime. x_{chol} ist das Molverhältnis von Cholesterol in der Mischung und x_{lipids} für die Lipidmischung ohne Cholesterol. Die berechneten durchschnittlichen Oberflächen aller drei Cholesterolgehalte liegen im Vergleich zu den experimentellen Werten bei höheren Oberflächen. Dies zeigt die kondensierende Wirkung von Cholesterol in der Monoschicht von Lipidmischungen.

A 3. Berechnung der überschüssigen freien Mischungsenergie

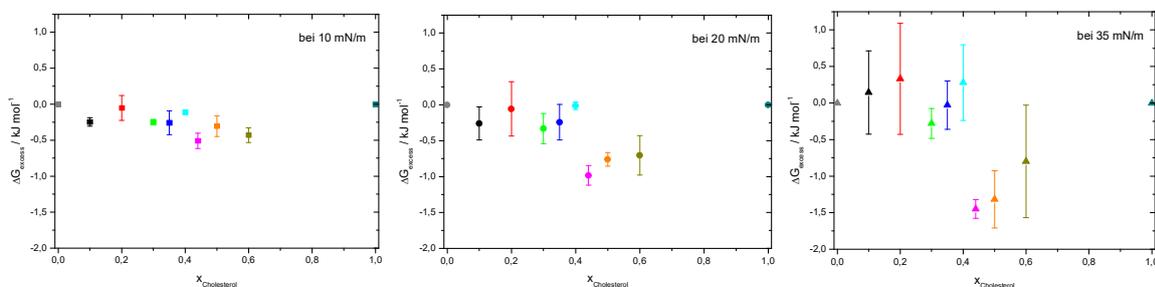


Abbildung A3: Berechnete überschüssige freie Mischungsenergien ΔG_{excess} als Funktion des Molenbruchs von Cholesterol $x_{Cholesterol}$ von Monoschichten mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt auf einer Subphase von HEPES-NaCl-Puffer (20 °C) bei Oberflächendrücken von 10 mN/m (links), 20 mN/m (Mitte) und 35 mN/m (rechts).

Die überschüssige freie Mischungsenergie wird berechnet durch $\Delta G_{excess} = \int_0^\pi A_{mix} - (x_{chol}A_{chol} + x_{lipids}A_{lipids})d\pi$ (G3) für nicht ideales Mischen. Wobei x_{chol} das Molverhältnis von Cholesterol in der Mischung und x_{lipids} für die Lipidmischung ohne Cholesterol ist. A_{mix} ist die Oberfläche der gemischten Monoschicht, A_{chol} und A_{lipids} sind die Oberflächen des reinen Cholesterols bzw. der reinen Lipidisotheime. ΔG_{excess} wurde für drei verschiedene Oberflächendrücke berechnet: 10 mN/m, 20 mN/m und 35 mN/m. Alle Werte für die überschüssige freie Mischungsenergie zeigen eine Tendenz negativ zu sein oder ungefähr 0 kJ/mol. ΔG_{excess} -Werte sind negativ, wenn die Monoschicht kondensiert, was auf Anziehungskräfte zwischen verschiedenen Molekülen zurückzuführen ist und daher wird der Mischungsprozess thermodynamisch bevorzugt. Hohe positive Werte des ΔG_{excess} legen die Entmischung des Monoschichtgemisches mit einer möglichen Phasentrennung nahe. Die überschüssige freie Mischungsenergie von Monoschichten mit MBP wurde nicht berechnet, da die Kompressionsisothermen bei höheren Oberflächendrücken beginnen, die für Berechnungen nicht geeignet sind.

A 4. Vergleich verschiedener Injektionsdrücke für MBP

Zunächst wurden Versuche mit MBP bei einem Oberflächendruck von 20 mN/m (flüssig-expandierte Phase) durchgeführt. Die Monoschicht wurde auf 20 mN/m komprimiert und anschließend MBP injiziert (Abbildung A4a grün). Dies wurde durchgeführt, um den Membrandruck von 30–35 mN/m zu beobachten, bei dem die physikalischen Eigenschaften der Monoschicht der entsprechenden Doppelschicht ähnlich sind [54]. Nach der Injektion des Proteins unter die Lipidmonoschicht stieg der Oberflächendruck allmählich auf 27 mN/m an (Abbildung A4a rechts). Zum Vergleich wurde MBP auch bei 0 mN/m (Gasphase) injiziert, um die Lipid/Protein-Wechselwirkung über den gesamten Kompressionsbereich zu untersuchen (Abbildung 18 bzw. A4a rot). Es ist offensichtlich, dass die Isothermen beider Injektionsexperimente unterschiedlich aussehen. Da die Fluoreszenzaufnahmen bei 25 mN/m jedoch dieselben Merkmale aufweisen, weist dies auf vergleichbare Ergebnisse dieser unterschiedlichen Verfahren hin (siehe Abbildung A4b). Darüber hinaus ist der Versuchsaufbau nicht für Messungen geeignet, die länger als 4 Stunden dauern, da keine Höhenpegelsteuerung der Subphase erfolgt. Diese Dauer wurde bei Injektionsexperimenten von MBP bei 20 mN/m überschritten. Das Volumen der Subphase nimmt mit der Zeit durch Verdunstung ab und ist nach ungefähr 4 Stunden in diesem Aufbau nicht vernachlässigbar. Daher wurde für alle anstehenden Experimente die Injektion von MBP in die gasanaloge Phase zur weiteren Bewertung ausgewählt.

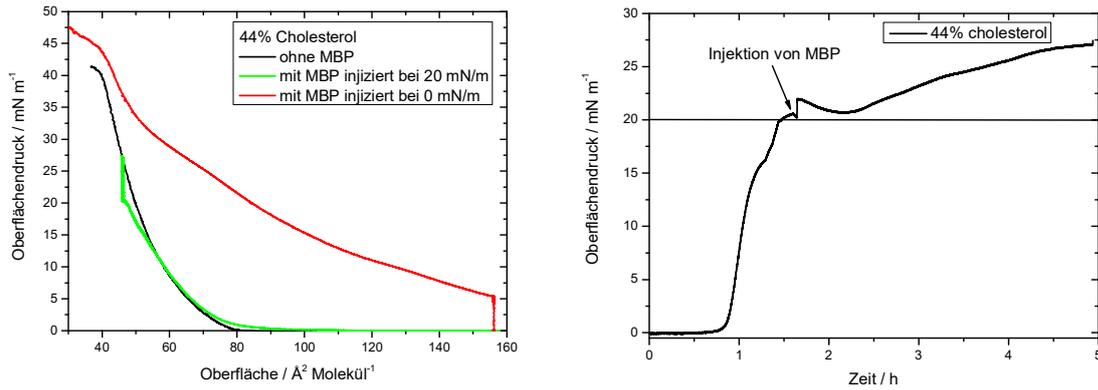


Abbildung A4a: Kompressionsisothermen von Monoschichten mit 44% Cholesterol und Injektion von MBP bei verschiedenen Oberflächendrücken (links) und zeitabhängige Oberflächendruckkurve mit Injektion von MBP bei 20 mN/m (rechts) (Subphase von HEPES-NaCl-Puffer, 20 °C).

Der schnelle Anstieg des Oberflächendrucks, gefolgt von einer langsameren Druckrelaxation direkt nach der MBP-Injektion unter die Lipidmonoschicht bei 20 mN/m (Abb. 4a rechts), könnte ein experimentelles Artefakt sein, da das Protein mittels einer Nadel durch den Lipidfilm injiziert wurde. Nach einer kurzen Latenzzeit stieg der Oberflächendruck aufgrund der MBP-Wechselwirkung mit der Lipidmonoschicht allmählich an.

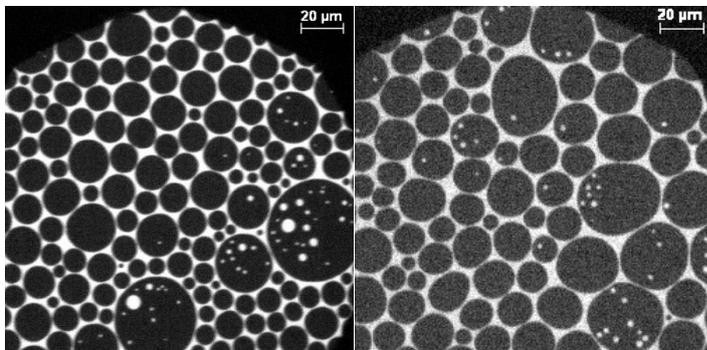


Abbildung A4b: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder einer Lipidmonoschicht mit 44% Cholesterol bei 25 mN/m (0,05 mol-% Rh-DHPE), wobei MBP bei 20 mN/m (links) und 0 mN/m (rechts) injiziert wurde (Subphase von HEPES-NaCl-Puffer, 20 °C).

Die Fluoreszenzbilder in Abbildung A4b zeigen den Vergleich der beiden Injektionspunkte von MBP bei 20 mN/m und 0 mN/m bei einem Oberflächendruck von ungefähr 25 mN/m. Beide Bilder zeigen große Domänen, die nicht mehr perfekt kreisförmig sind.

A 5. Kompressibilität der Lipidmonoschichten

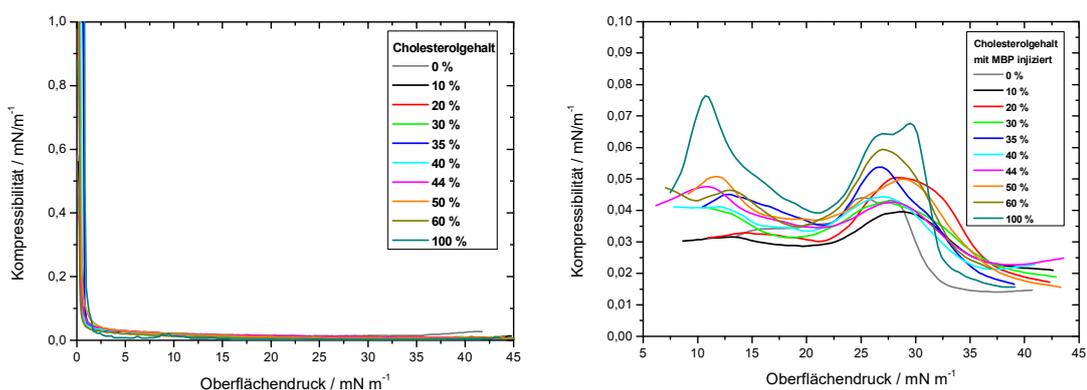


Abbildung A5: Kompressibilität/Oberflächendruck-Graphiken von Monoschichten mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt mit (rechts) und ohne (links) MBP bei 20 °C. Als Grundlage dienen die Isothermen aus Abbildung 17 und 18.

Die Kompressibilität κ der Monoschichten wurde aus den Isothermen von Abbildungen 17 und 18 mit $\kappa = -\frac{1}{A} \frac{dA}{d\pi}$ berechnet. Die Kompressibilität der Monoschichten mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt zeigt keinen Phasenübergang ohne MBP (Abbildung A5 links). Wenn jedoch MBP unter die Monoschichten injiziert wird, ändert sich die Kompressibilität für alle Gemische deutlich zwischen 20 mN/m und 35 mN/m (Abbildung A5 rechts). Diese Veränderung ist vermutlich auf das Herausdrücken des Proteins zurückzuführen. Die zweite Änderung der Kompressibilität bei niedrigeren Oberflächendrücken (5-17 mN/m) wurde nicht im Detail untersucht. Es könnte sich um einen Phasenübergang handeln, der von Cholesterol herrührt, da er in der reinen Cholesterolisotherme am stärksten ausgeprägt ist, aber auch um ein Artefakt der Monoschicht, da es sich um einen sehr breiten Übergang handelt.

A 6. Differenz der Oberflächen von Monoschichten mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt und MBP

Tabelle A1: Berechnete Oberflächendifferenz von Monoschichten mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt und MBP zwischen 20 mN/m und 35 mN/m.

Cholesterolgehalt in %	$\Delta A = A_{20 \text{ mN/m}} - A_{35 \text{ mN/m}}$ in $\text{\AA}^2/\text{Molekül}$
0	45
10	42
20	51
30	46
35	44
40	39
44	36
50	42
60	42
100	38

Aufgeführt sind die Differenzen ΔA der Oberflächen bei 20 mN/m ($A_{20 \text{ mN/m}}$) und 35 mN/m ($A_{35 \text{ mN/m}}$) von Monoschichten mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt in Anwesenheit von MBP. Die Flächenwerte sind aus Abbildung 19 entnommen.

A 7. Einfluss fluoreszierender Farbstoffe auf das Isothermenverhalten

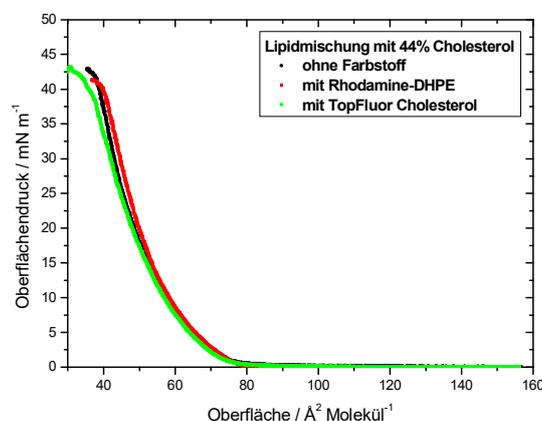


Abbildung A7: Vergleich der Kompressionsisothermen mit 44% Cholesterolgehalt in Präsenz von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (rot: Rhodamin-DHPE; grün: TopFluor® Cholesterol; schwarz: ohne Farbstoff) auf einer Subphase von HEPES-NaCl-Puffer bei 20 °C.

Die Kompressionsisothermen von 44% Cholesterol mit 0,05 mol-% Rhodamin-DHPE (rot) oder 1 mol-% TopFluor® Cholesterol (grün) zeigen keine signifikante Abweichung von der 44% Cholesterol-Lipidmonoschicht ohne Farbstoff (schwarz). Das Mischen des Fluoreszenzfarbstoffs mit der Lipidmischung sollte einen vernachlässigbaren Einfluss auf das Verhalten der Monoschichten haben.

A 8. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit TopFluor® Cholesterol

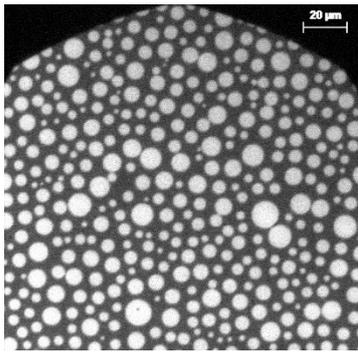
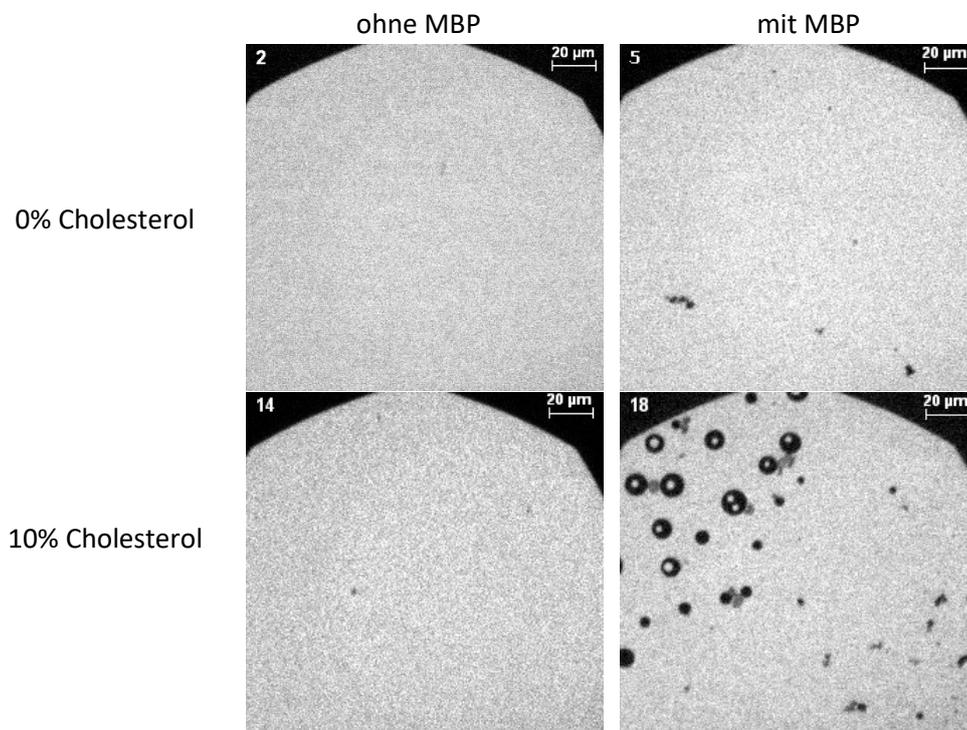


Abbildung A8: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Lipidmonoschicht mit 44% Cholesterol und 1 mol-% TopFluor® Cholesterol bei ca. 10 mN/m (20 °C).

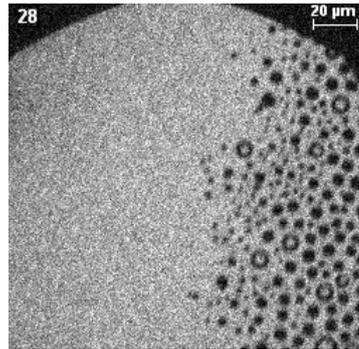
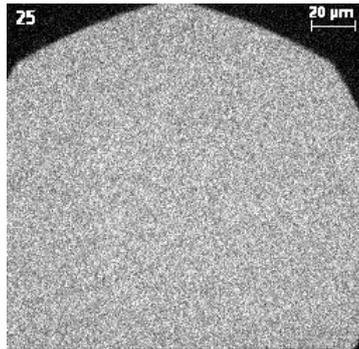
In Abbildung A8 sind die hellen Bereiche cholesterolreiche Domänen mit dem Farbstoff und der dunkle Bereich ist die phospholipidreiche flüssig-expandierte Phase. Das Bild ist genau invertiert zu den Fluoreszenzaufnahmen von Rhodamin-DHPE, was beweist, dass Cholesterol tatsächlich in den runden Domänen angereichert ist.

A 9. Vergleich aller Lipidgemische mit und ohne MBP bei ca. 10 mN/m

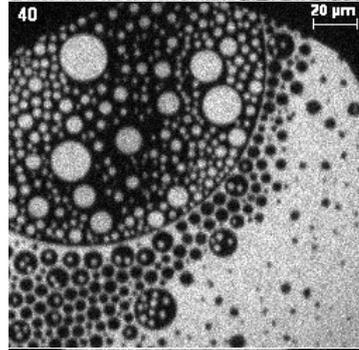
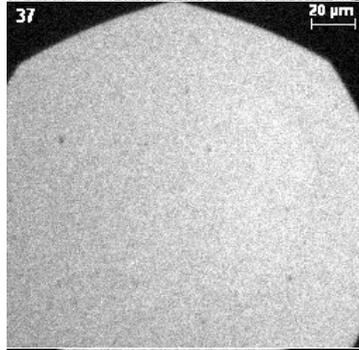


(Abbildung wird auf der nächsten Seite fortgesetzt.)

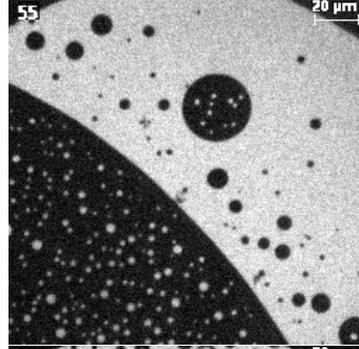
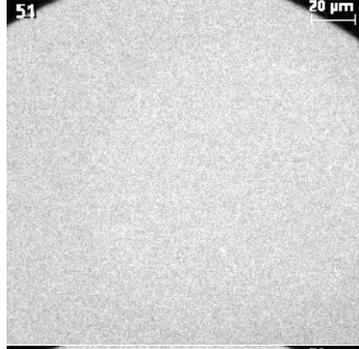
20% Cholesterol



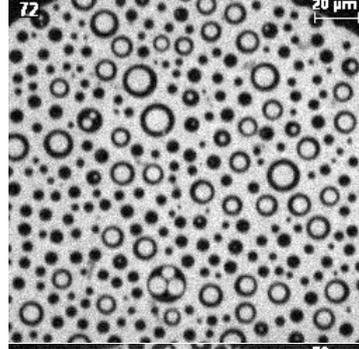
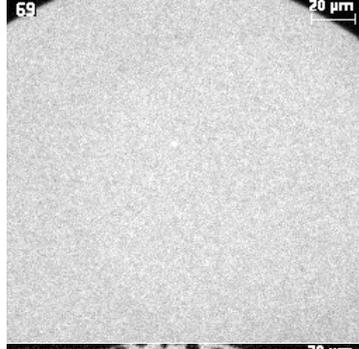
30% Cholesterol



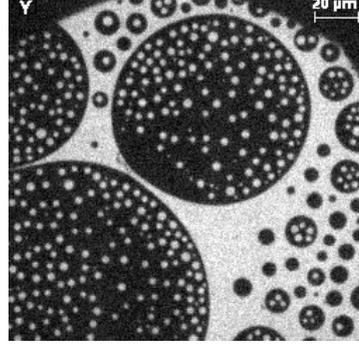
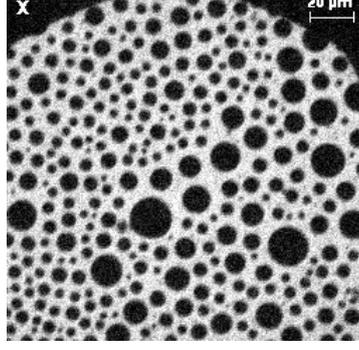
35% Cholesterol



40% Cholesterol



44% Cholesterol



(Abbildung wird auf der nächsten Seite fortgesetzt.)

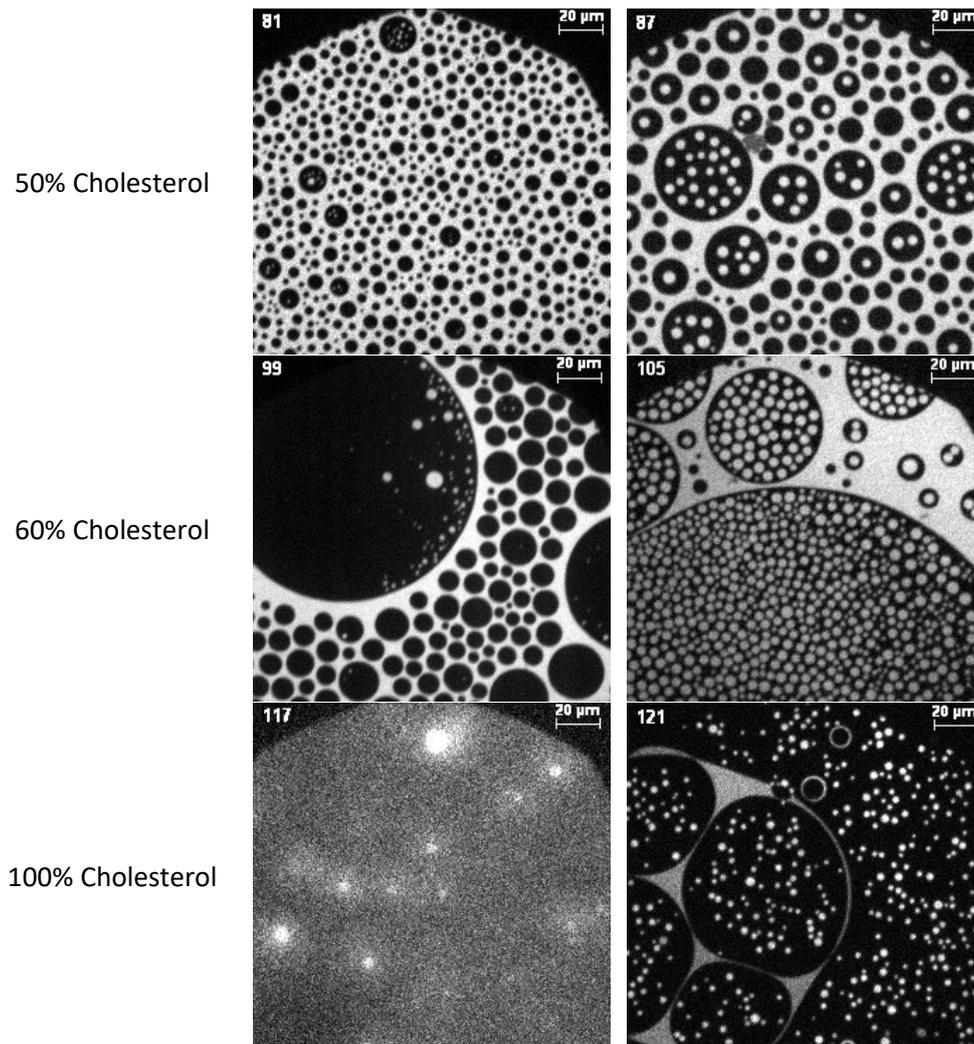
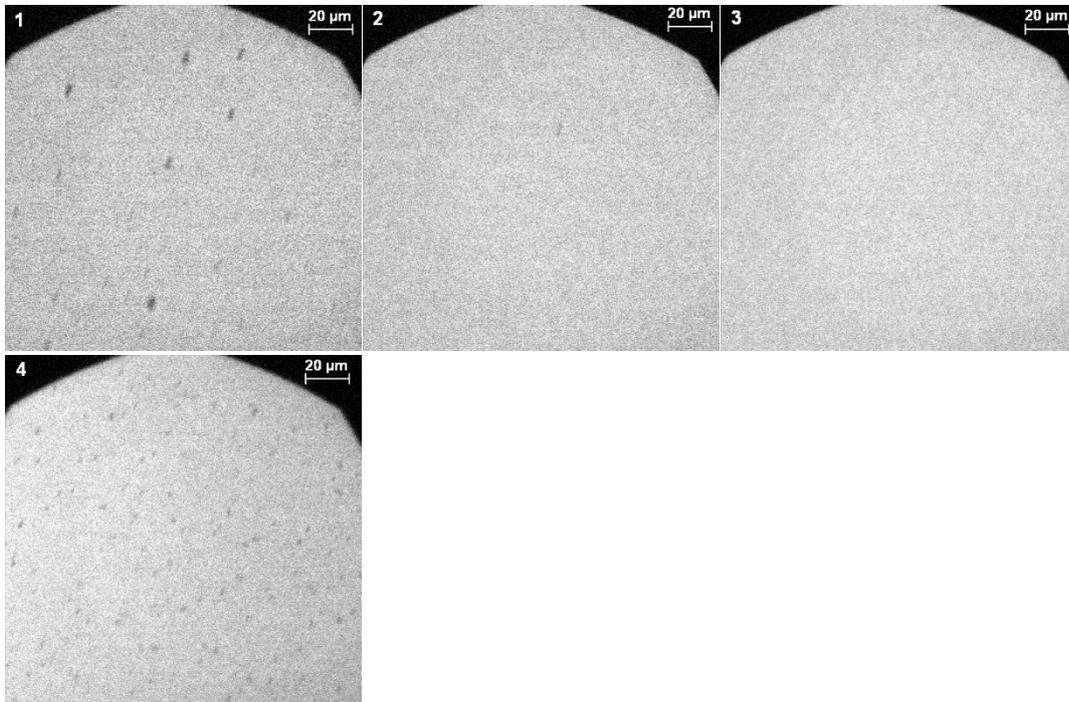


Abbildung A9: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Lipidmonoschichten bei 10 ± 2 mN/m mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt und 0,05 mol-% Rh-DHPE. linke Seite: ohne MBP, rechte Seite: mit MBP.

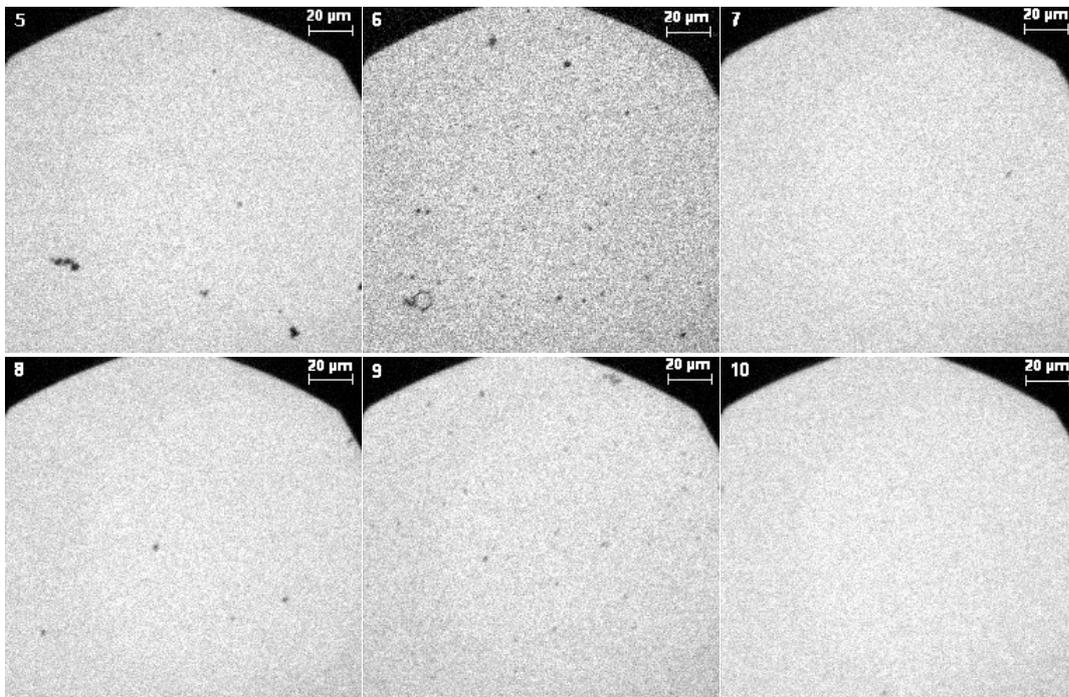
A 10. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aller verwendeten Lipidmischungen mit und ohne MBP

Die zugehörigen Oberflächendrücke zu jedem Bild sind in Tabelle A2 in A12 aufgeführt.

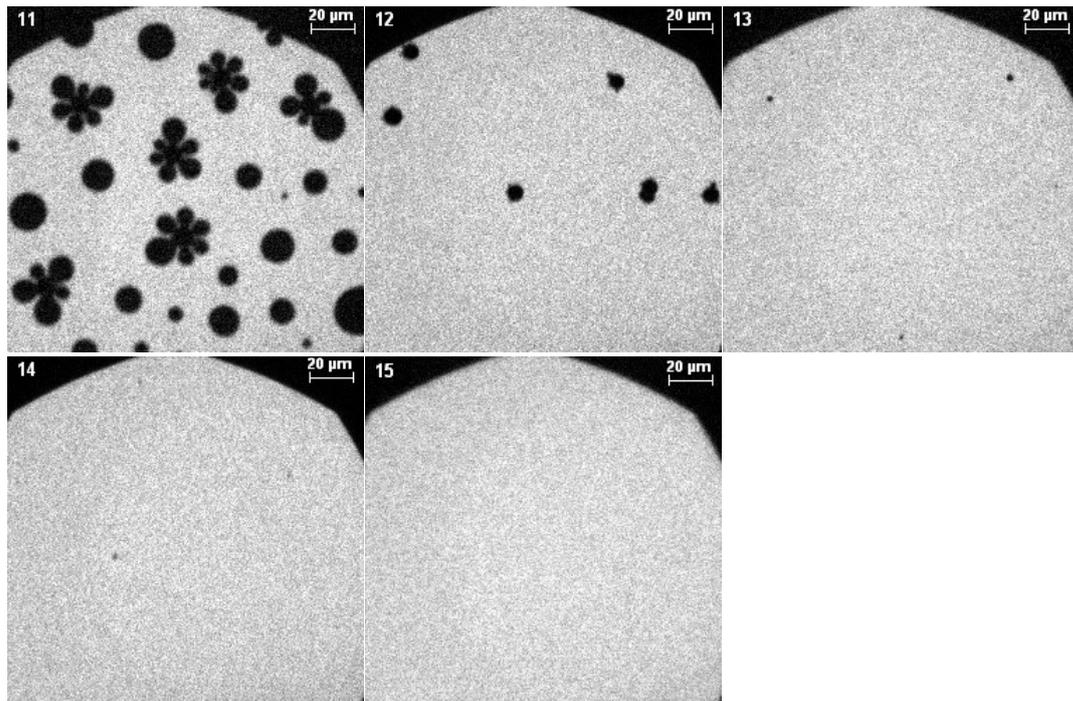
0% Cholesterol: ohne MBP



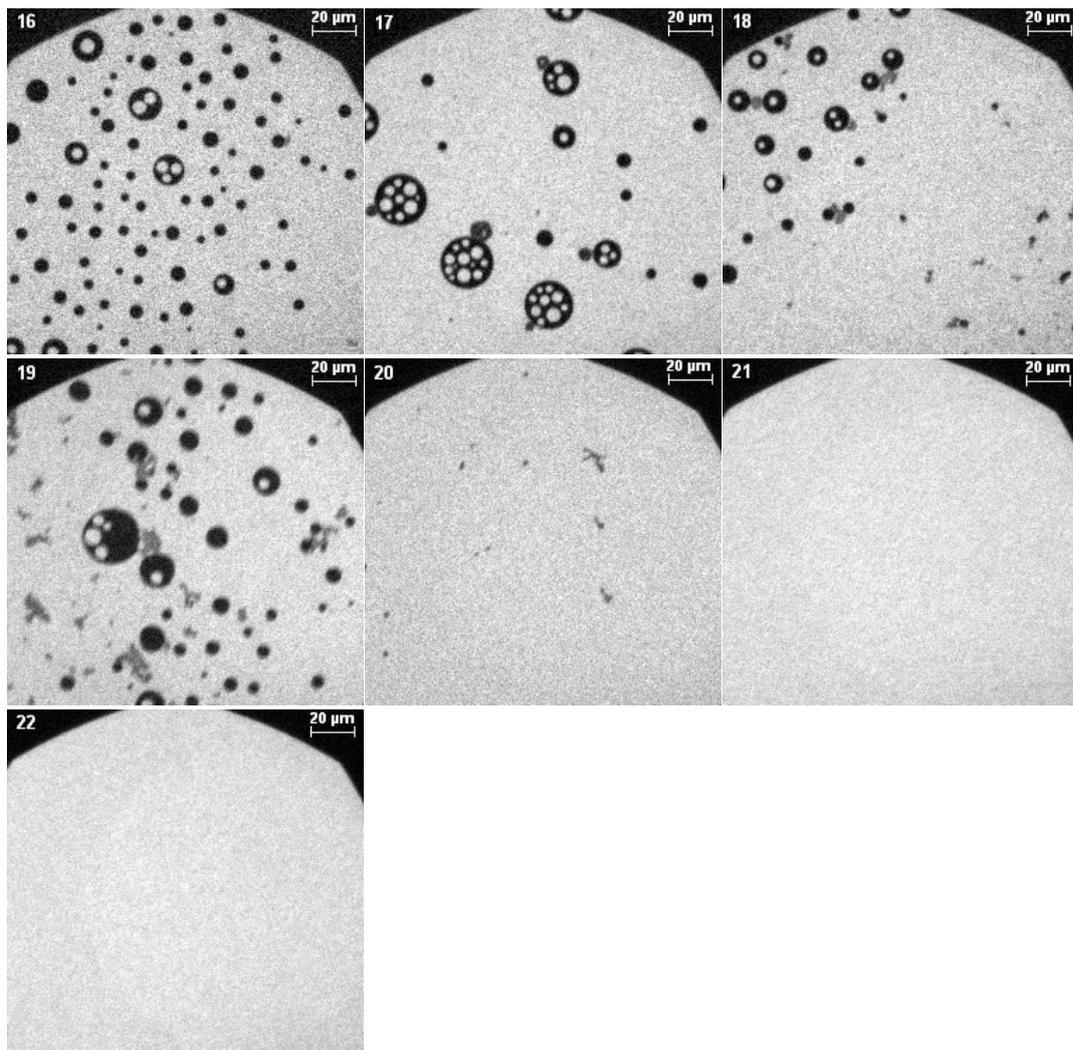
0% Cholesterol: mit MBP



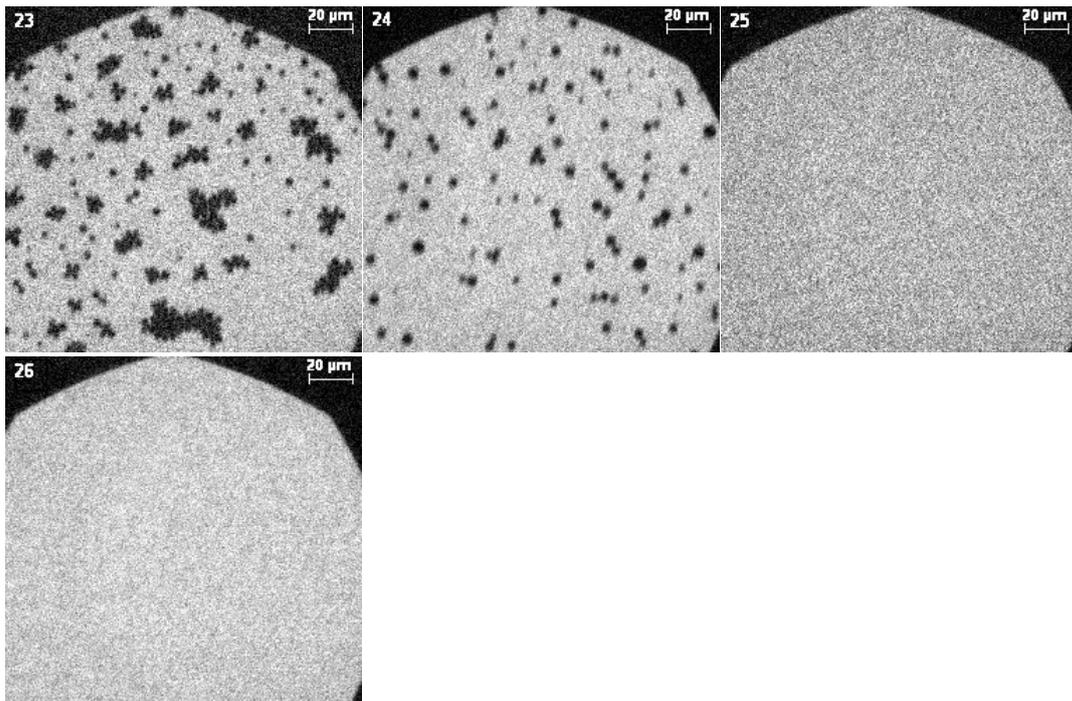
10% Cholesterol: ohne MBP



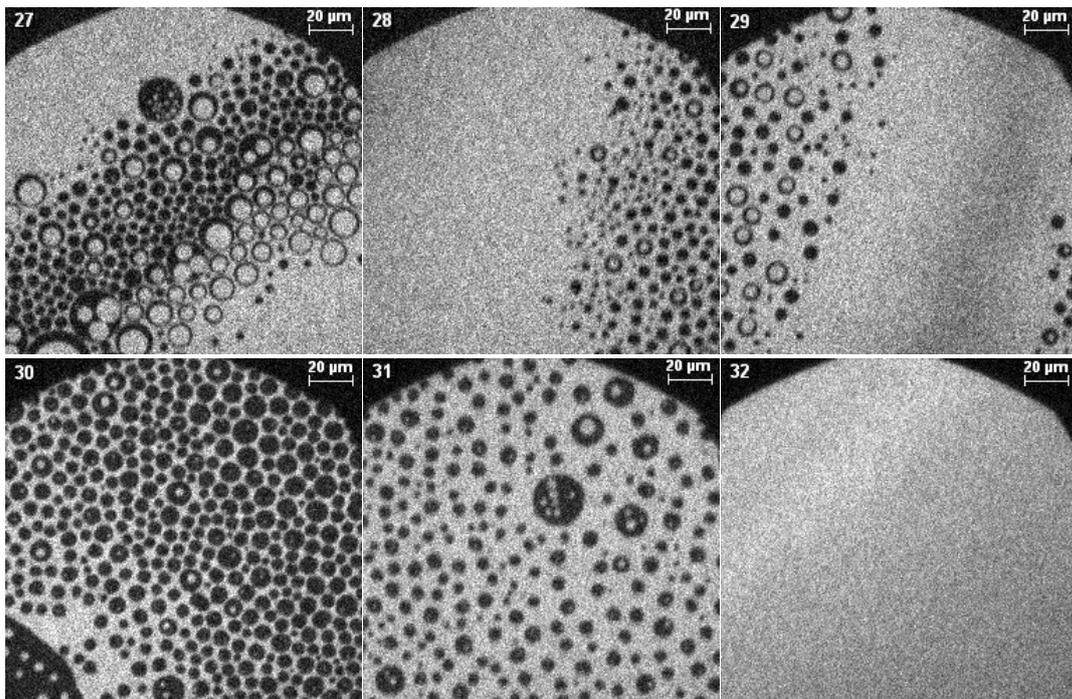
10% Cholesterol: mit MBP



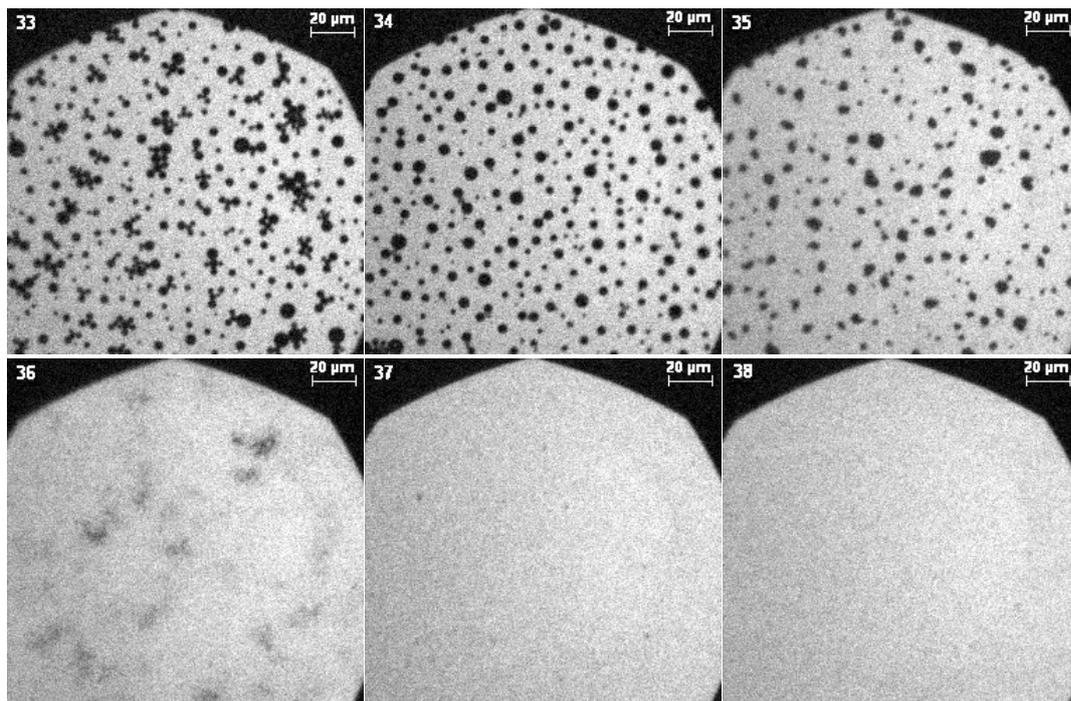
20% Cholesterol: ohne MBP



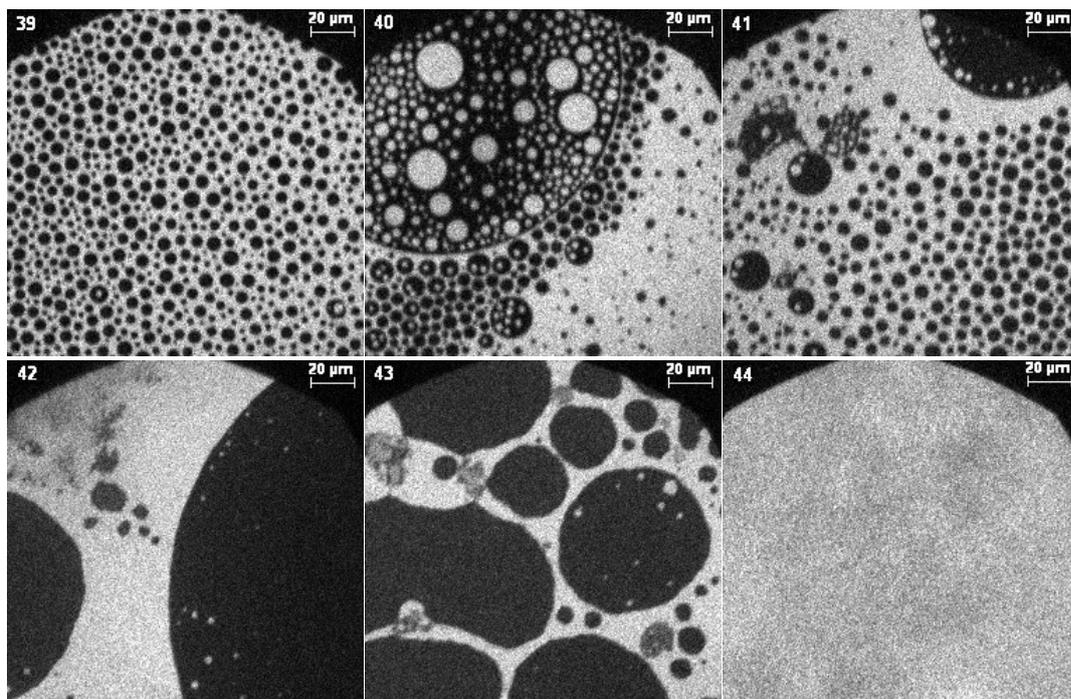
20% Cholesterol: mit MBP



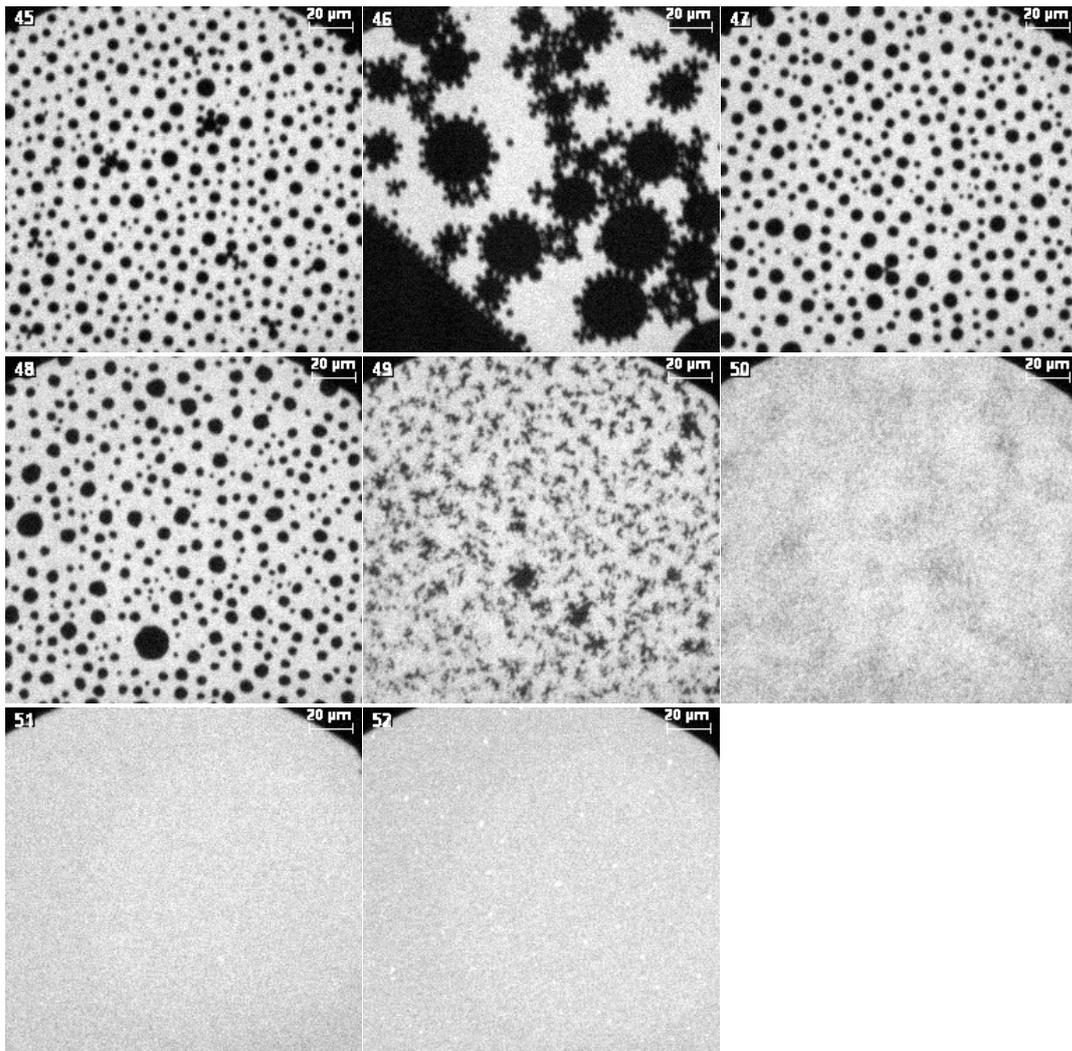
30% Cholesterol: ohne MBP



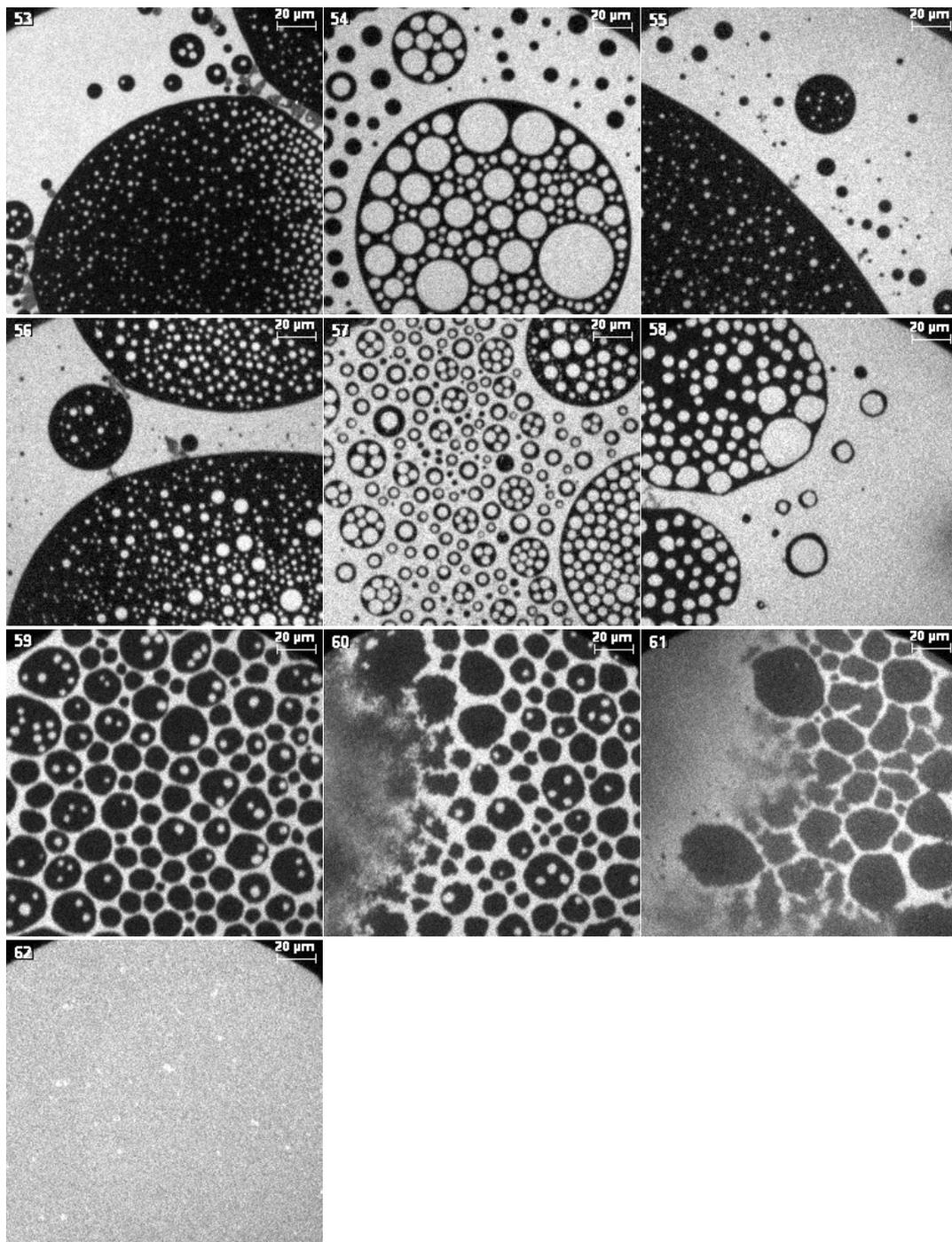
30% Cholesterol: mit MBP



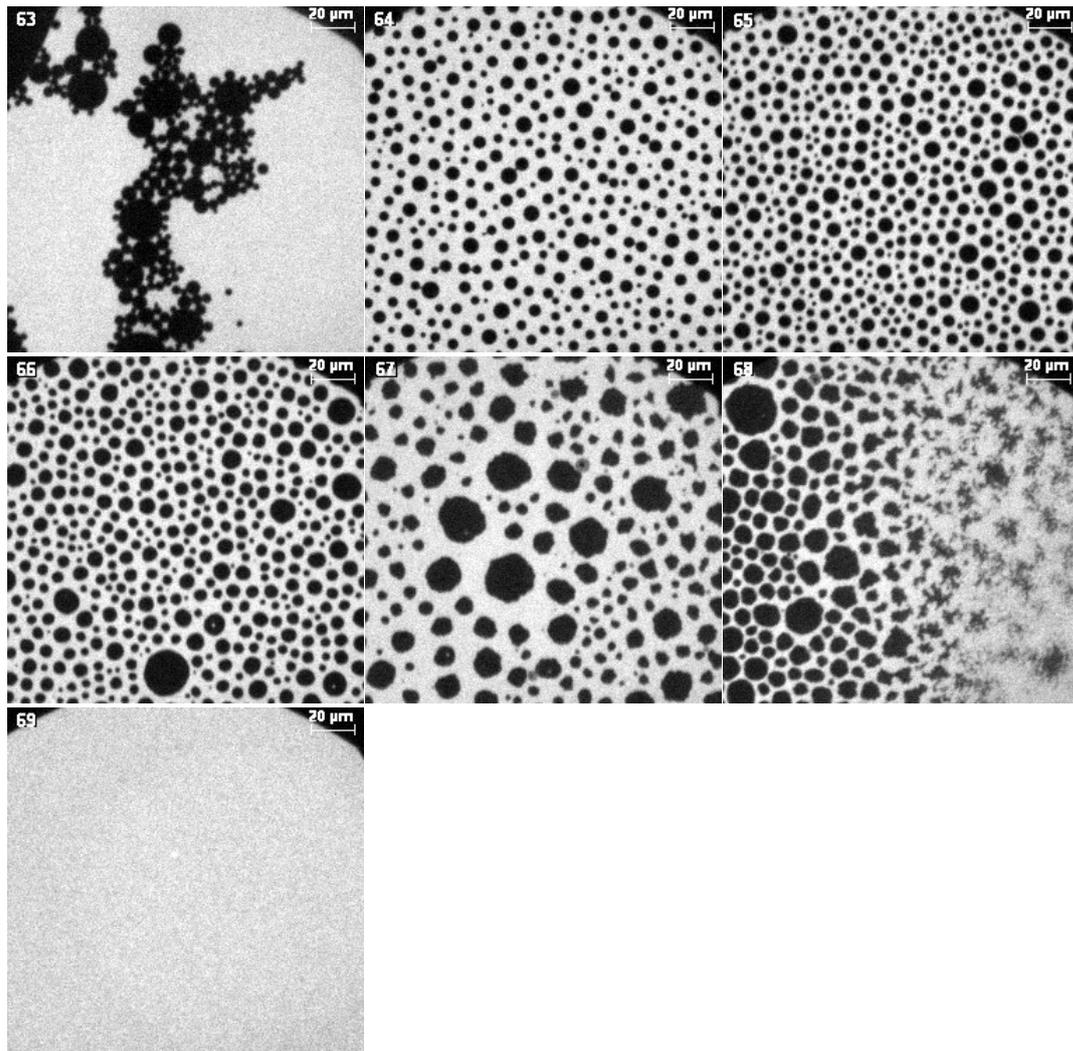
35% Cholesterol: ohne MBP



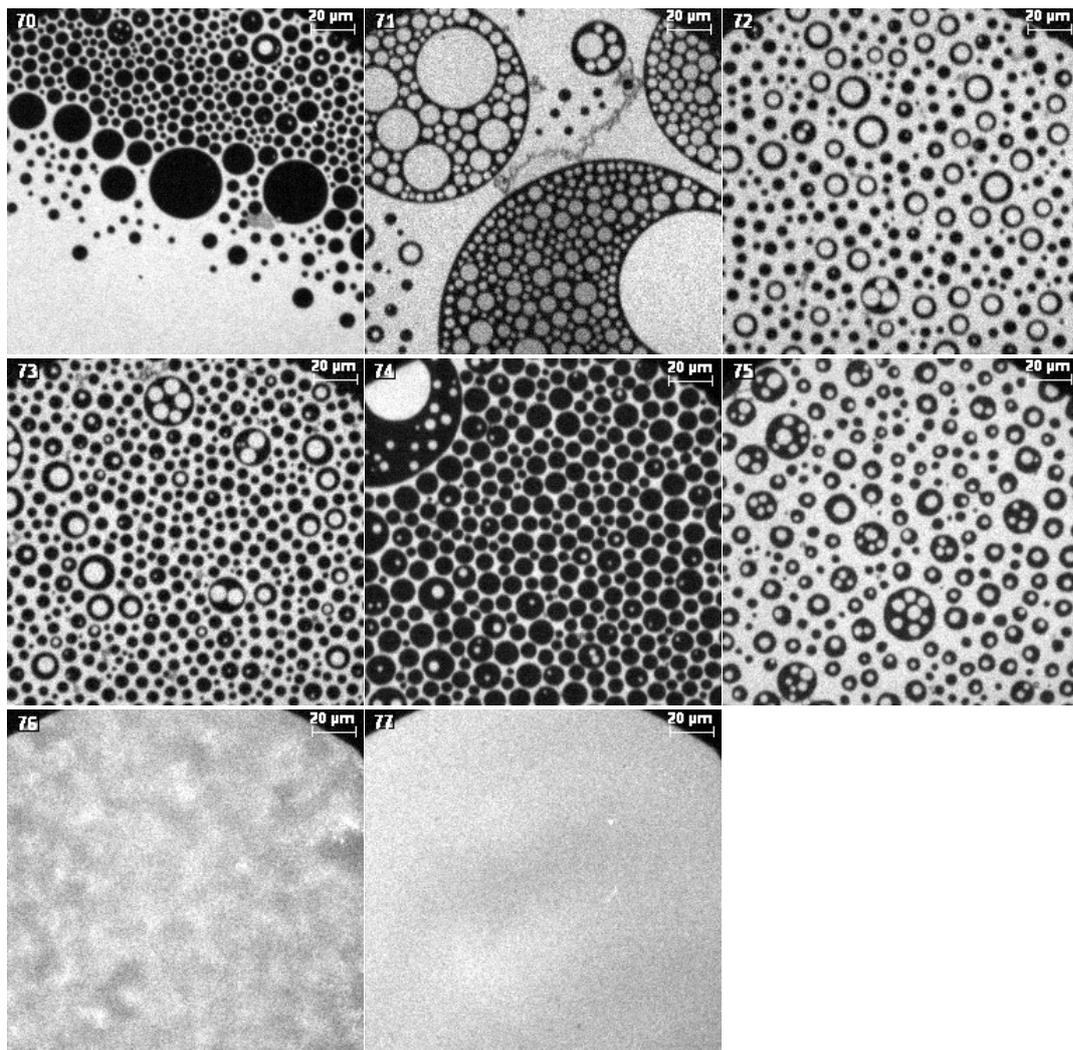
35% Cholesterol: mit MBP



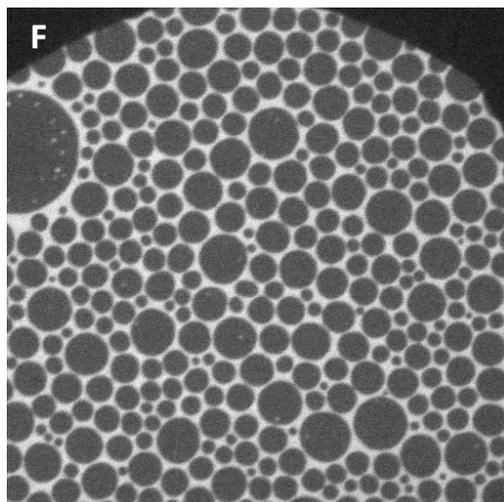
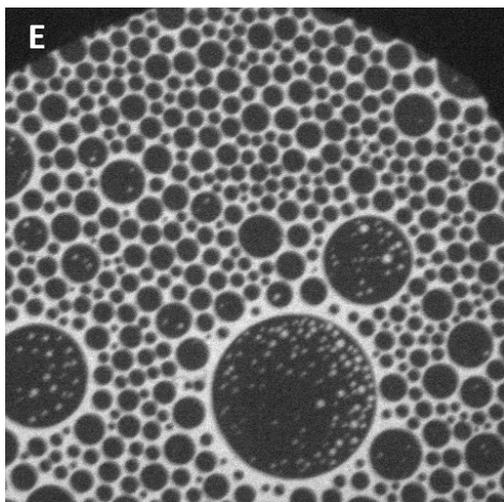
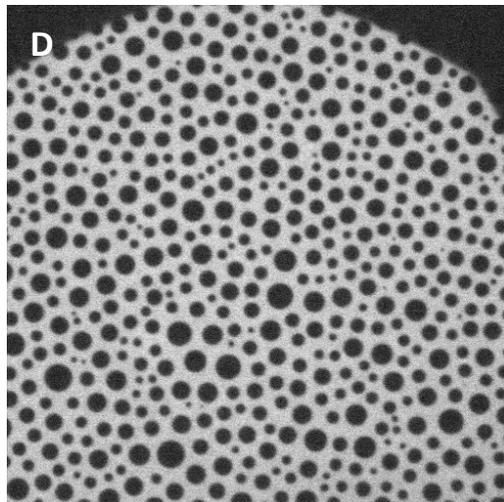
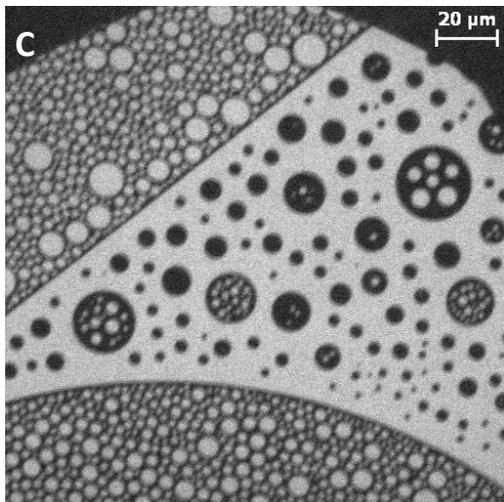
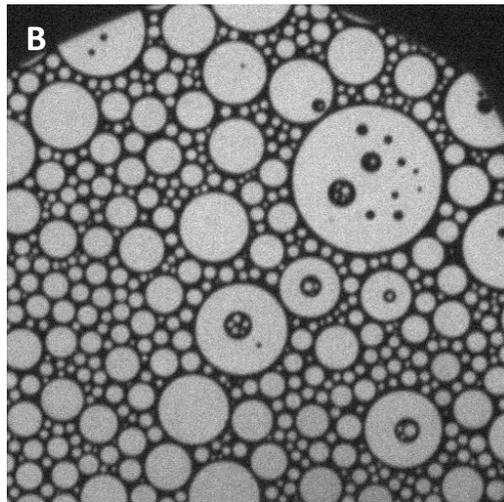
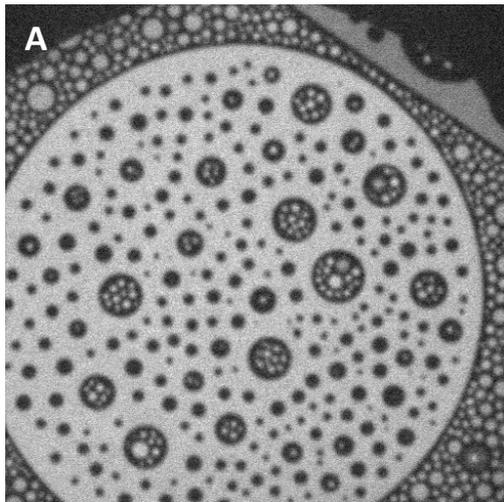
40% Cholesterol: ohne MBP

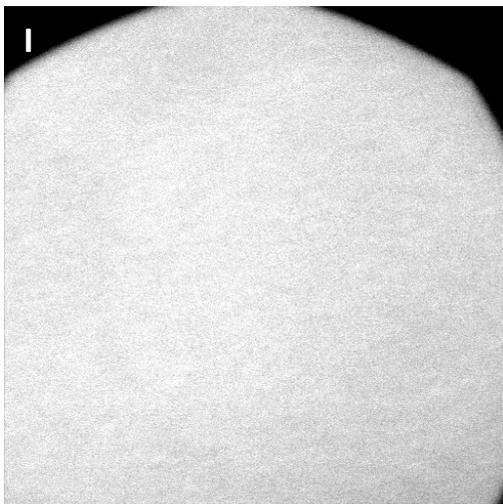
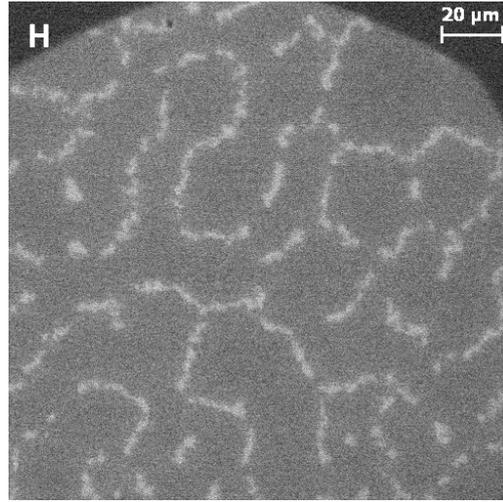
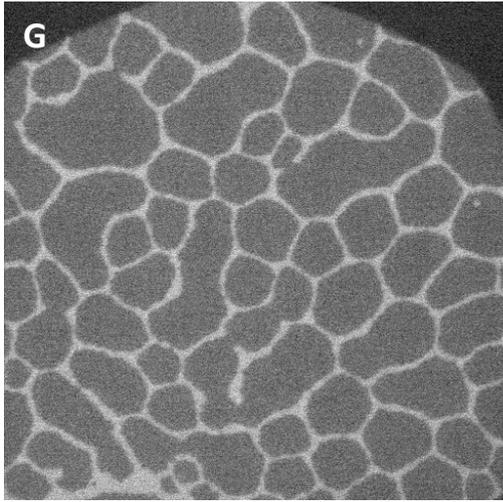


40% Cholesterol: mit MBP

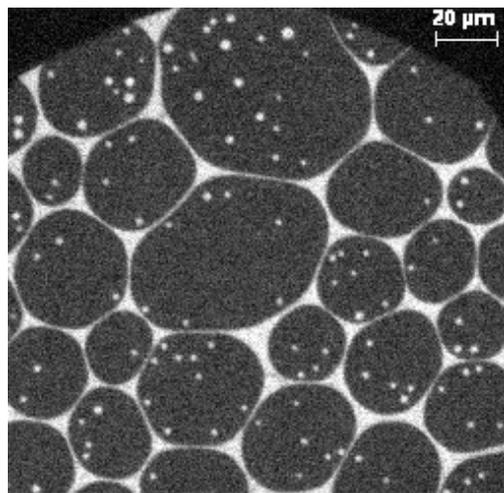
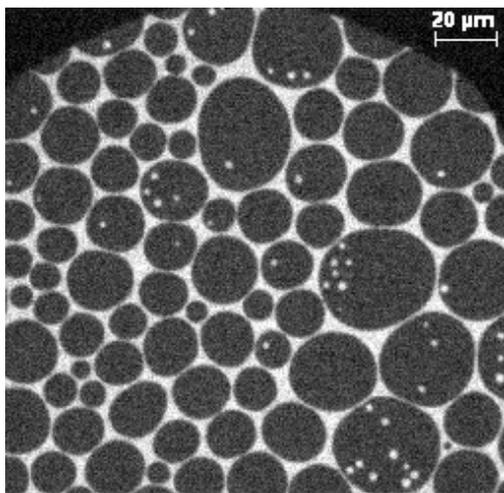
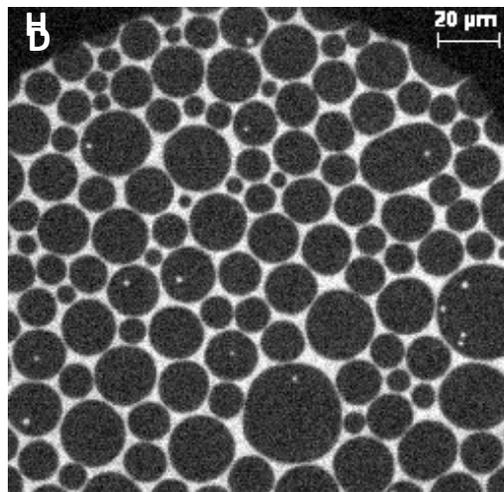
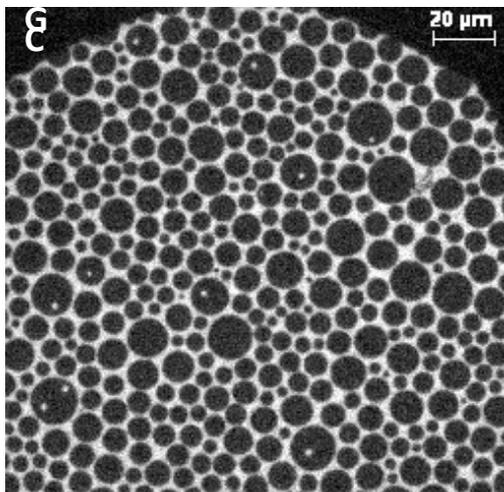
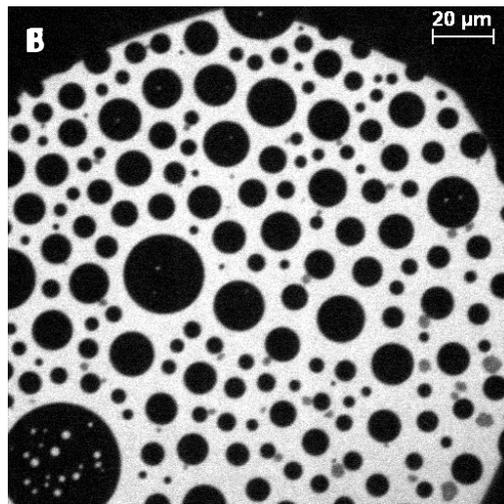
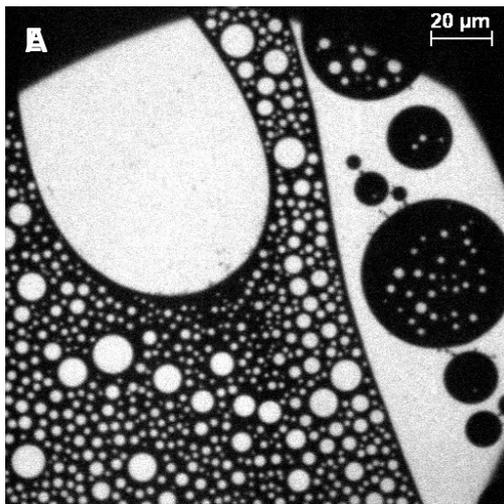


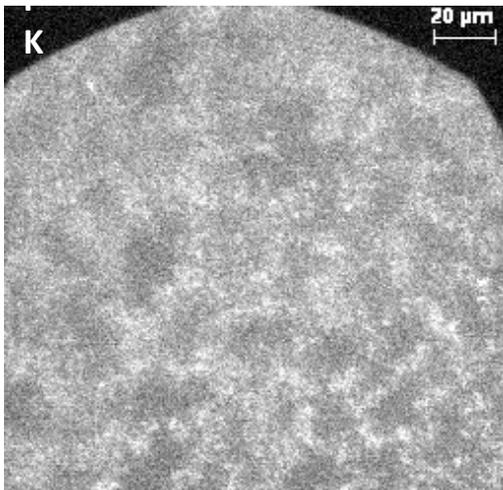
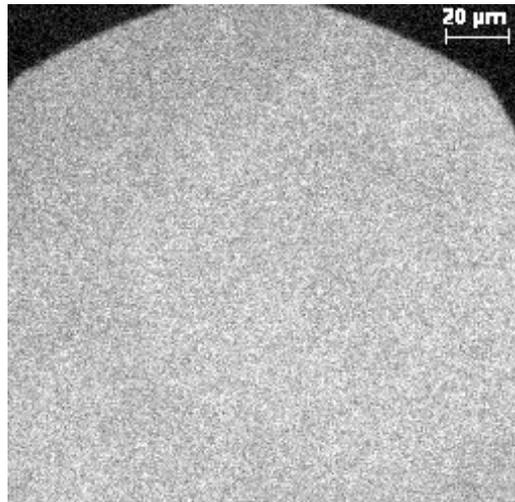
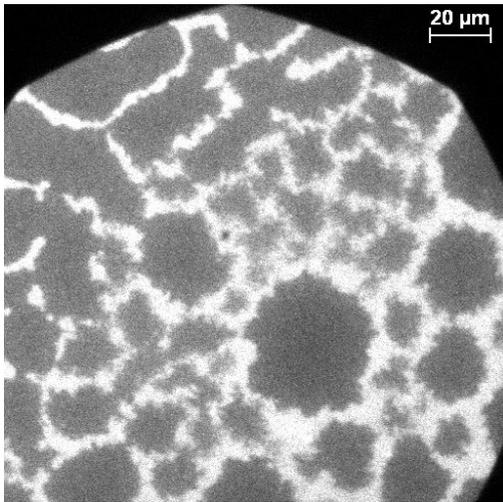
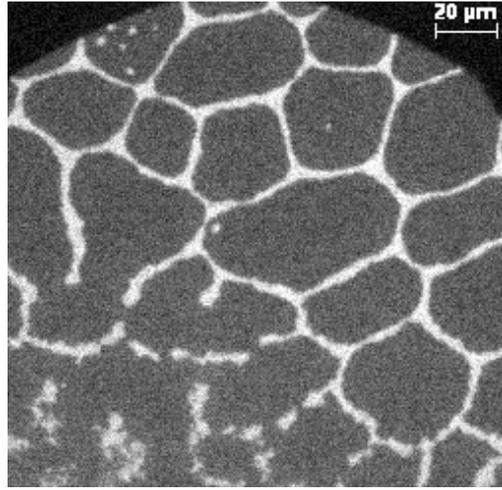
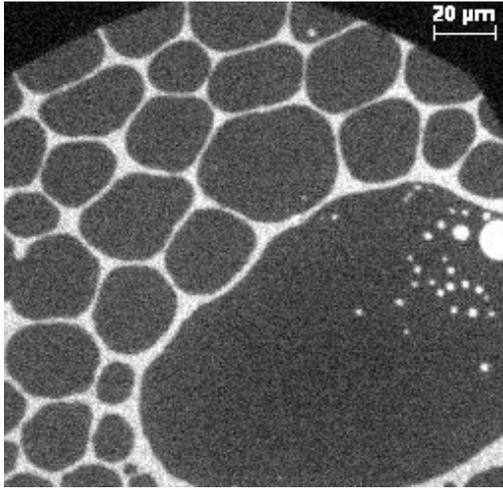
44% Cholesterol: ohne MBP



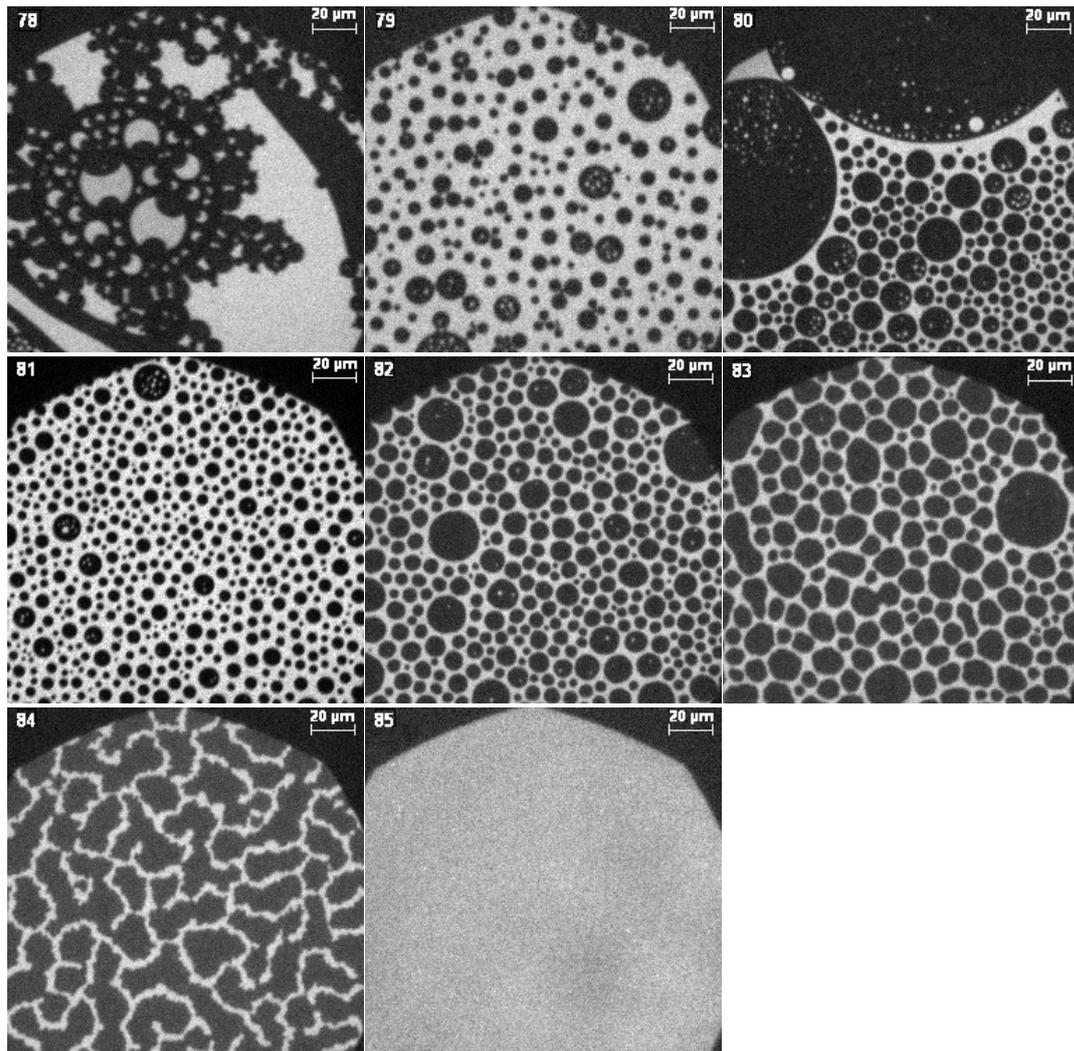


44% Cholesterol: mit MBP

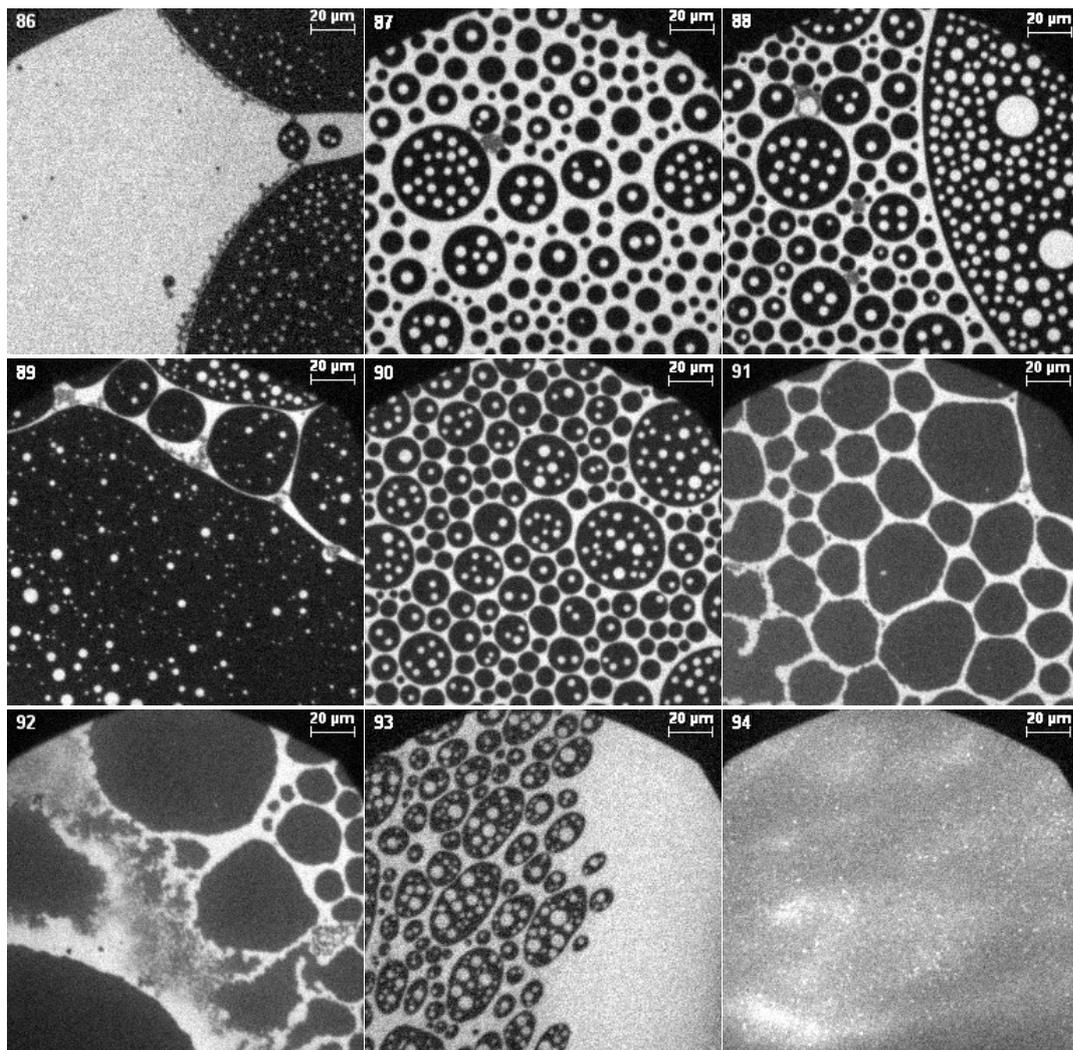




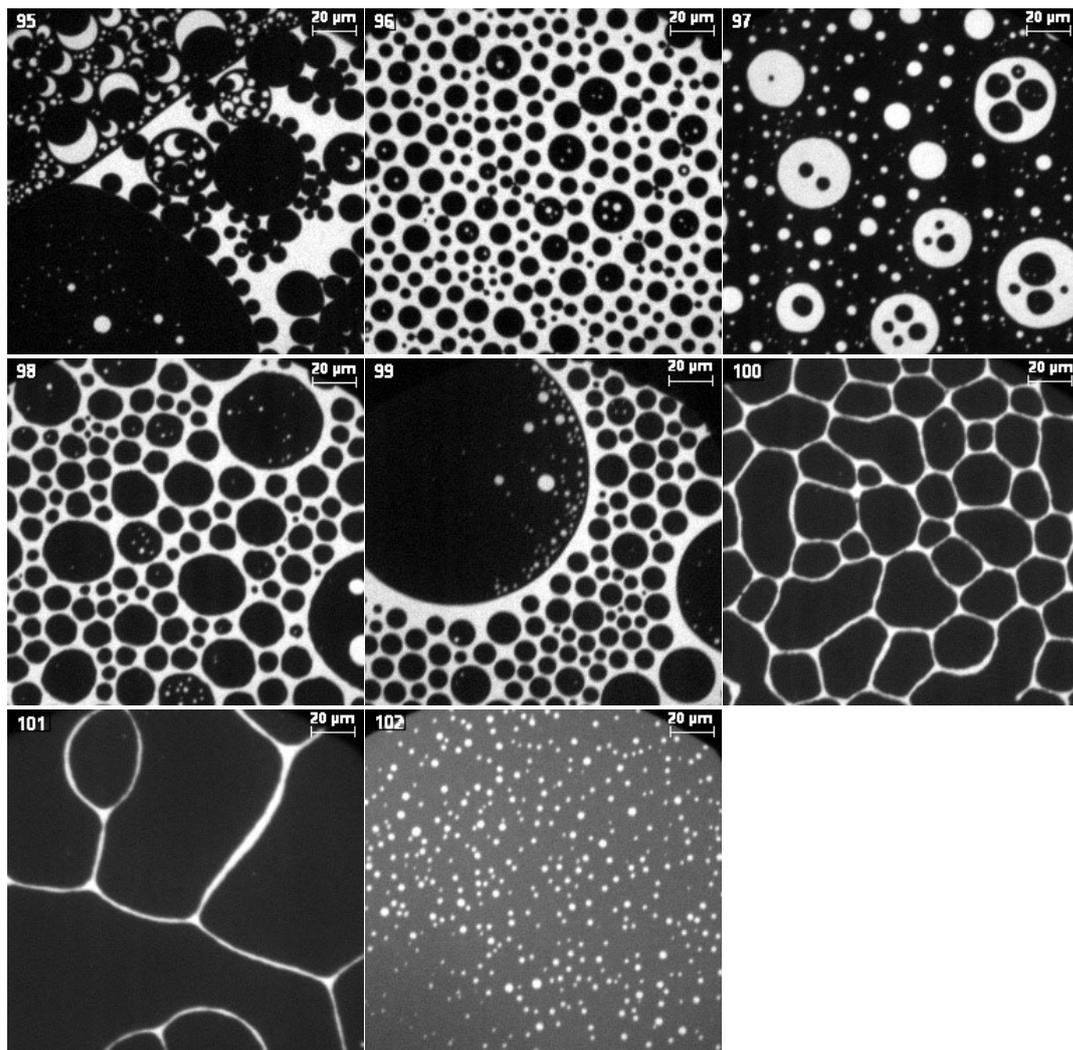
50% Cholesterol: ohne MBP



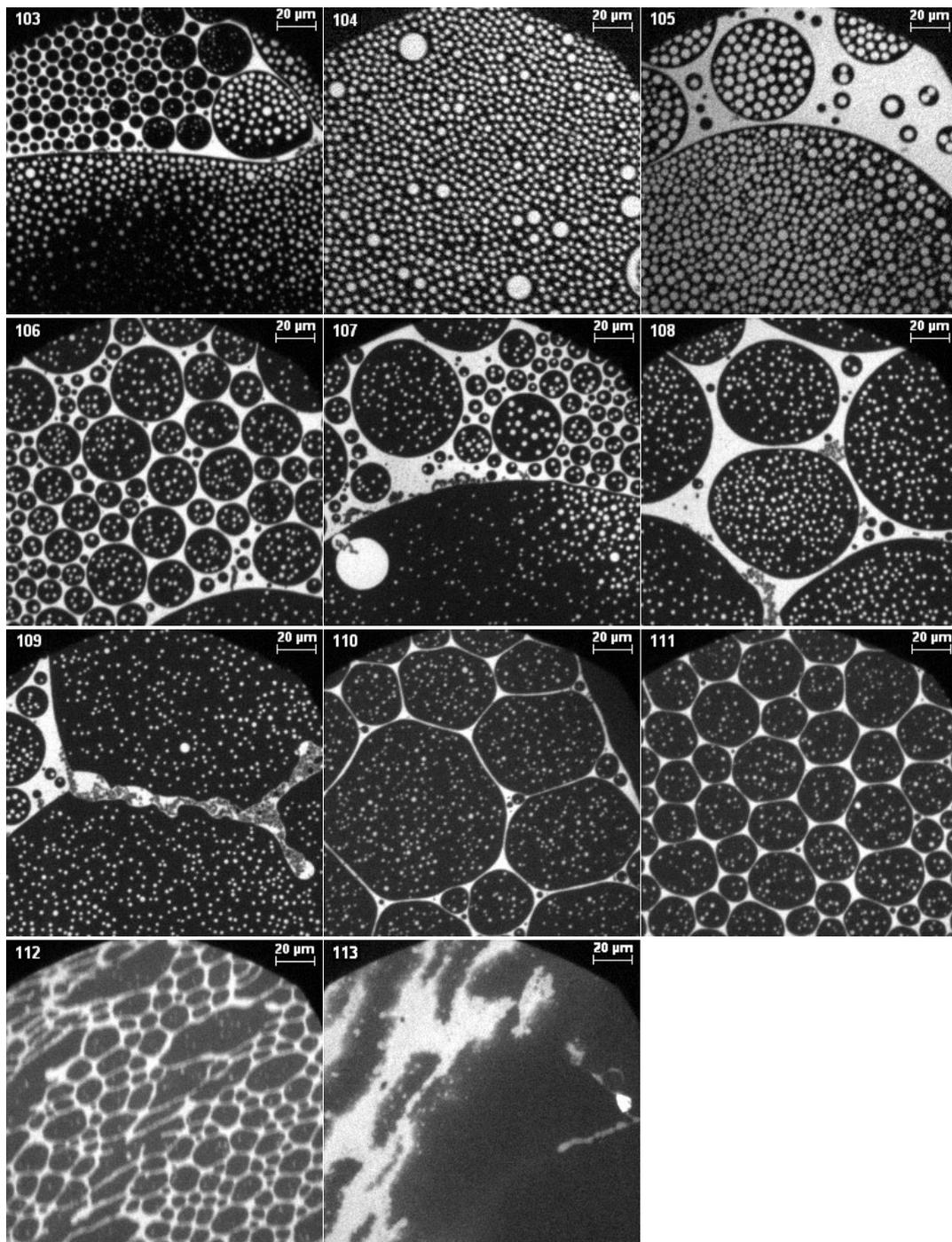
50% Cholesterol: mit MBP



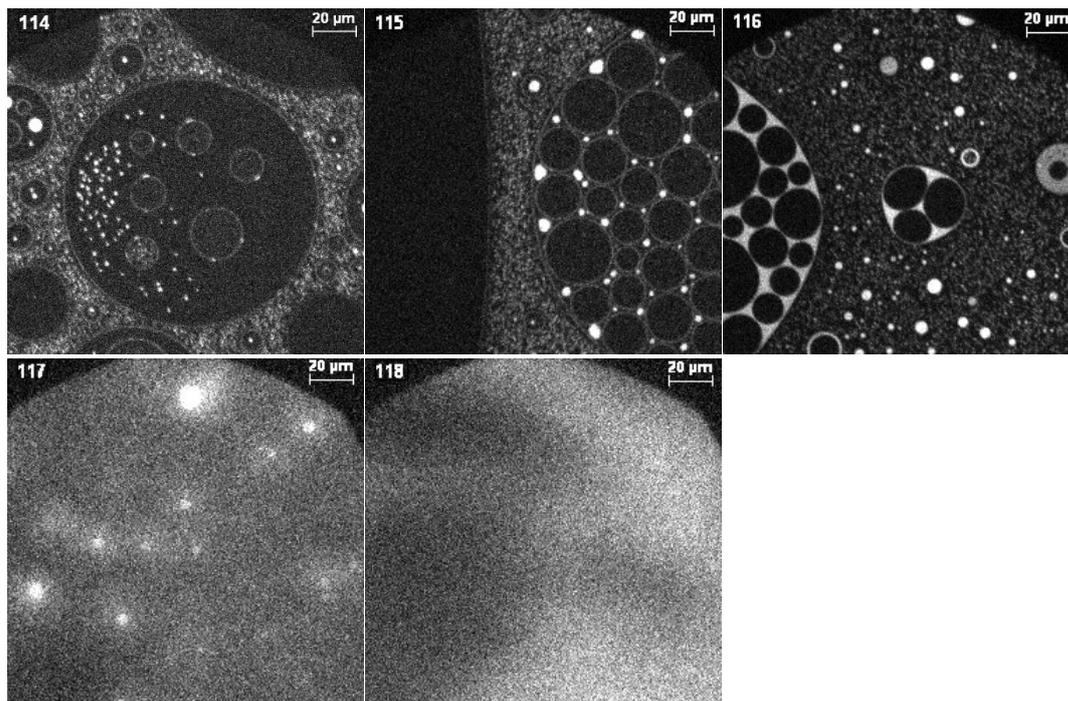
60% Cholesterol: ohne MBP



60% Cholesterol: mit MBP



100% Cholesterol: ohne MBP



100% Cholesterol: mit MBP

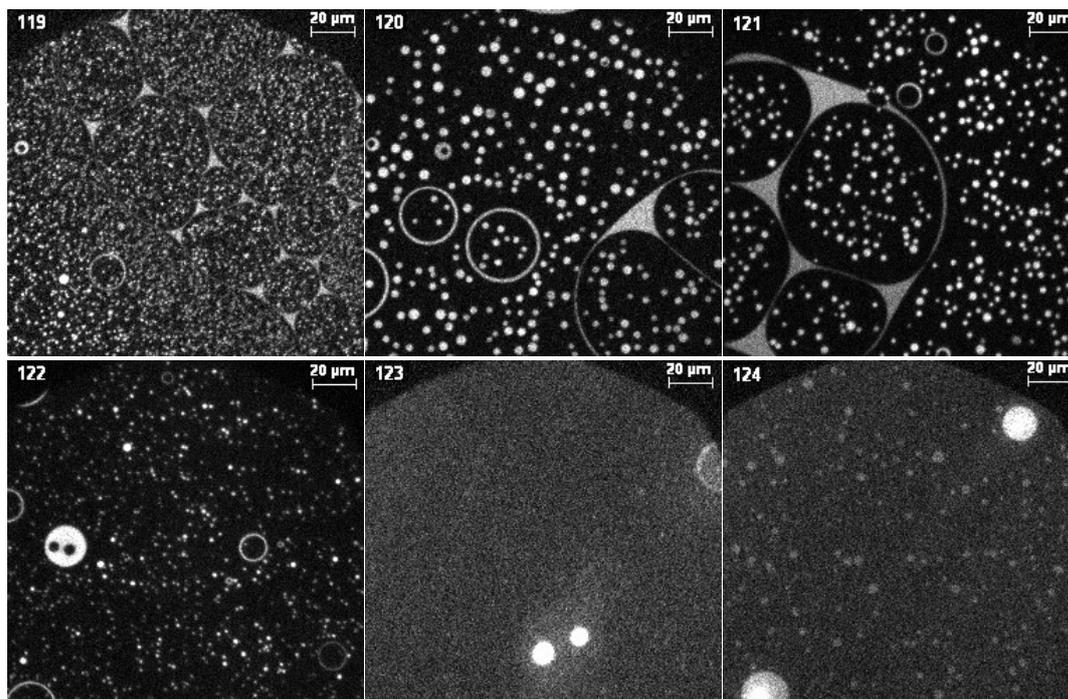


Abbildung A10. Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Kompression von Lipidmonoschichten mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt mit und ohne MBP und 0,05 mol-% Rh-DHPE bei 20 °C auf einer HEPES-NaCl-Subphase. Die jeweiligen Oberflächendrücke zu jedem Bild sind in Tabelle A2 in A12 aufgeführt.

A 11. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit einem 20-fachen Vergrößerungsobjektiv

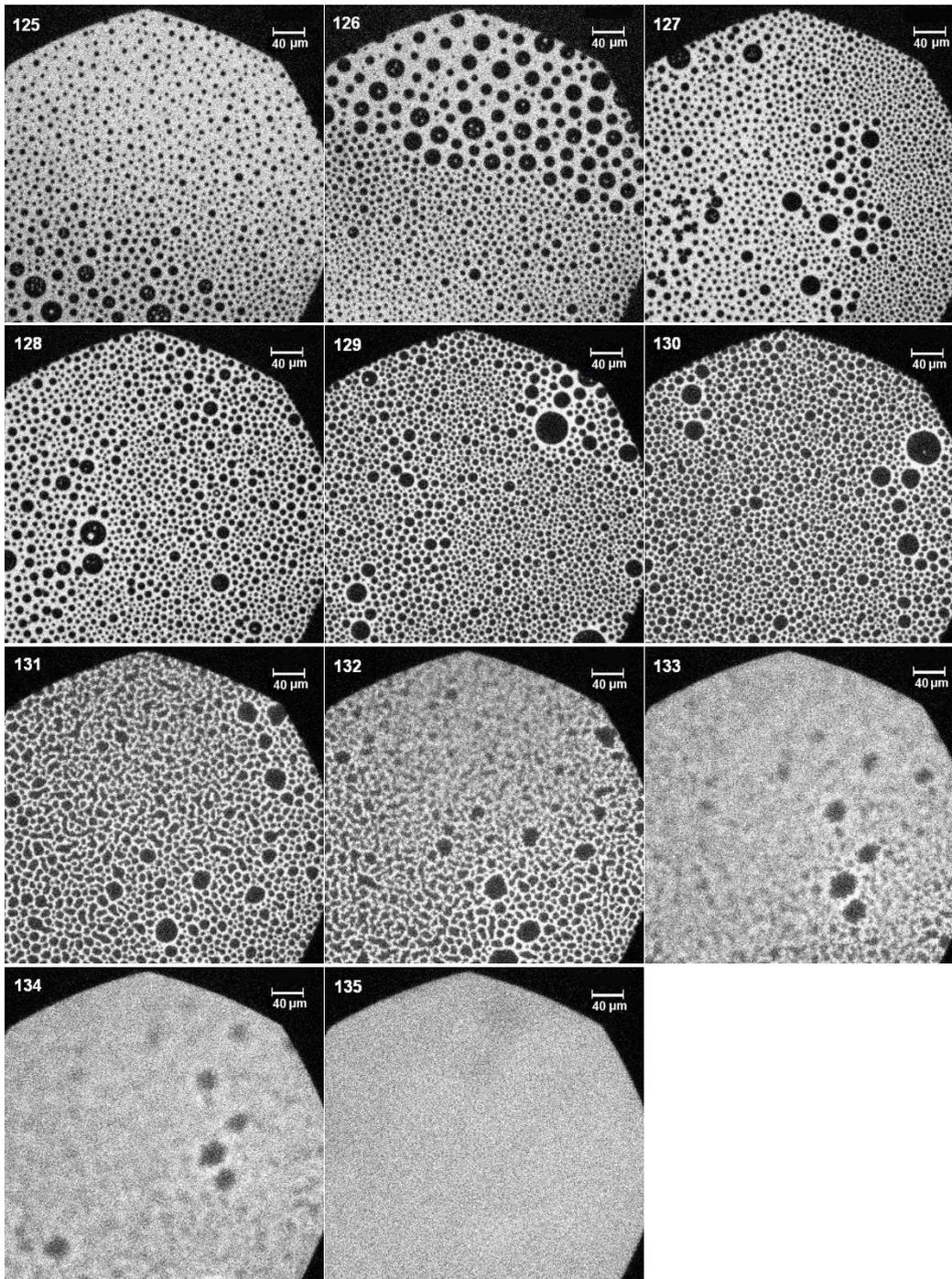


Abbildung A11: Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Lipidmonoschicht mit 44% Cholesterolgehalt und 0,05 mol-% Rh-DHPE mit 20-facher Vergrößerung (auf HEPES-NaCl-Puffer, 20 °C).

A 12. Tabelle der Oberflächendrücke für alle Fluoreszenzaufnahmen

Tabelle A2: Auflistung aller fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit zugehörigem Oberflächendruck für Monoschichten mit unterschiedlichem Cholesterol- und MBP-Gehalt.

Cholesterolgehalt in %	Bildnummer und zugehöriger Oberflächendruck in mN/m ohne MBP	Bildnummer und zugehöriger Oberflächendruck in mN/m mit MBP	Cholesterolgehalt in %	Bildnummer und zugehöriger Oberflächendruck in mN/m ohne MBP	Bildnummer und zugehöriger Oberflächendruck in mN/m mit MBP
0	1 → 0.5 2 → 10 3 → 30 4 → 40	5 → 10 6 → 13 7 → 16 8 → 25 9 → 31 10 → 41	40	63 → 0 64 → 0 65 → 1.6 66 → 5.4 67 → 7 68 → 7.8 69 → 12	70 → 3 71 → 6 72 → 11 73 → 13.5 74 → 23 75 → 25 76 → 32 77 → 39
10	11 → 0 12 → 0.2 13 → 4 14 → 11 15 → 36	16 → 5.9 17 → 7.6 18 → 11 19 → 23 20 → 25 21 → 29 22 → 40	44	Abbildung 20 A → 0 B → 0 C → 5 X → 9 D → 21 E → 25 F → 30 G → 35 H → 36 I → 37	Abbildung 21 A → 5 B → 5 Y → 8.8 C → 20.8 D → 22 E → 25 F → 25.8 G → 28.7 H → 28.9 I → 30 J → 32 K → 37
20	23 → 0.2 24 → 1 25 → 10.6 26 → 36	27 → 9 28 → 13 29 → 25 30 → 30 31 → 31 32 → 40	50	78 → 0 79 → 0 80 → 5.6 81 → 10 82 → 13 83 → 14 84 → 14.5 85 → 19	86 → 4.5 87 → 10.8 88 → 12 89 → 23 90 → 24 91 → 27 92 → 28 93 → 29 94 → 46
30	33 → 0 34 → 0.7 35 → 6 36 → 6.4 37 → 9 38 → 17	39 → 7.4 40 → 9 41 → 16 42 → 25 43 → 25.4 44 → 30	60	95 → 0 96 → 0.1 97 → 4 98 → 5 99 → 10 100 → 11 101 → 35 102 → 44	103 → 5 104 → 5.3 105 → 11 106 → 24 107 → 24.6 108 → 25 109 → 25.6 110 → 27 111 → 27.6 112 → 33 113 → 34

(Tabelle wird auf der nächsten Seite fortgesetzt.)

35	45 → 0 46 → 0 47 → 3.5 48 → 4.4 49 → 4.8 50 → 5 51 → 9 52 → 44	53 → 7.2 54 → 8.8 55 → 10 56 → 11.7 57 → 16 58 → 23 59 → 23.1 60 → 23.4 61 → 30 62 → 32	100	114 → 0 115 → 0 116 → 0.4 117 → 10 118 → 26	119 → 6.2 120 → 6.6 121 → 10 122 → 22 123 → 33 124 → 45
44 mit 20x Vergrößerung	125 → 6.2 126 → 14.6 127 → 23.3 128 → 27.1 129 → 32.4 130 → 34 131 → 34.5 132 → 34.9 133 → 35 134 → 35.5 135 → 38				

8.2 Anhang zu Kapitel 3.2.1

A 13. Kryo-TEM-Daten mit MBP in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt

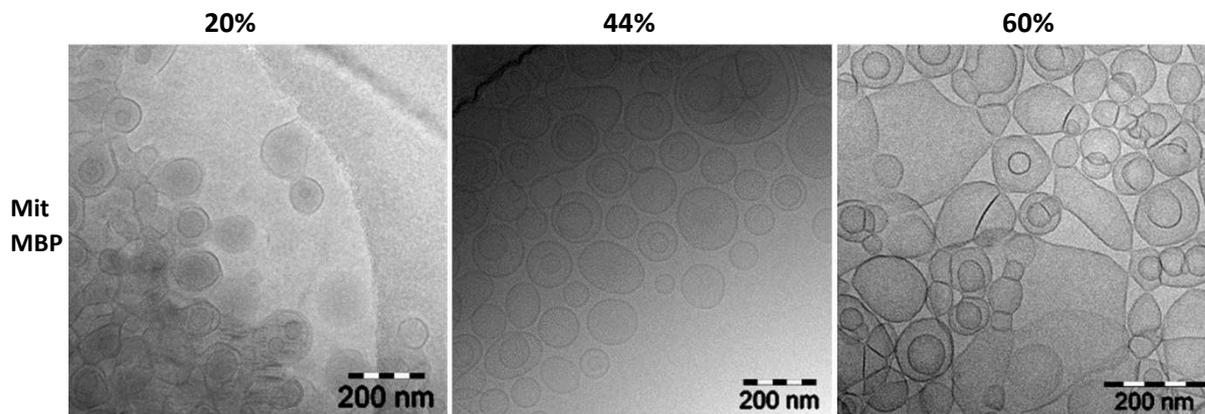


Abbildung A13: Vergrößerte Kryo-TEM-Aufnahmen aus Abbildung 22 von Vesikeln mit 20% (links), 44% (Mitte) und 60% (rechts) Cholesterolgehalt mit MBP in HEPES-NaCl-Puffer. Die Präparation der Proben wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

A 14. DLS-Daten ohne MBP in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt

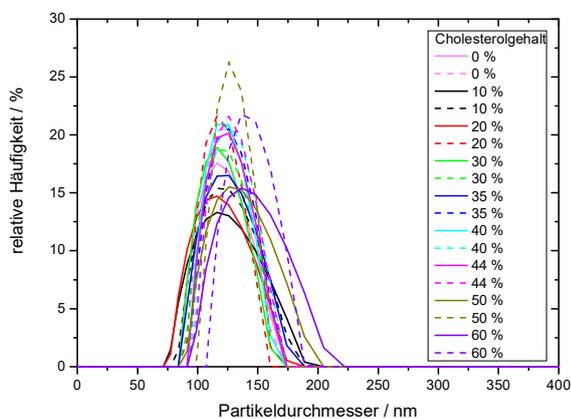


Abbildung A14a: Intensitätsgewichtete Verteilungen des Partikeldurchmessers von LUVs mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt erhalten durch dynamische Lichtstreuung, beispielhaft für eine Messreihe. Gemessen bei 20 °C in einem HEPES-NaCl-Puffer mit Streuwinkeln von 90° (gestrichelte Linien) und 175° (durchgezogene Linien).

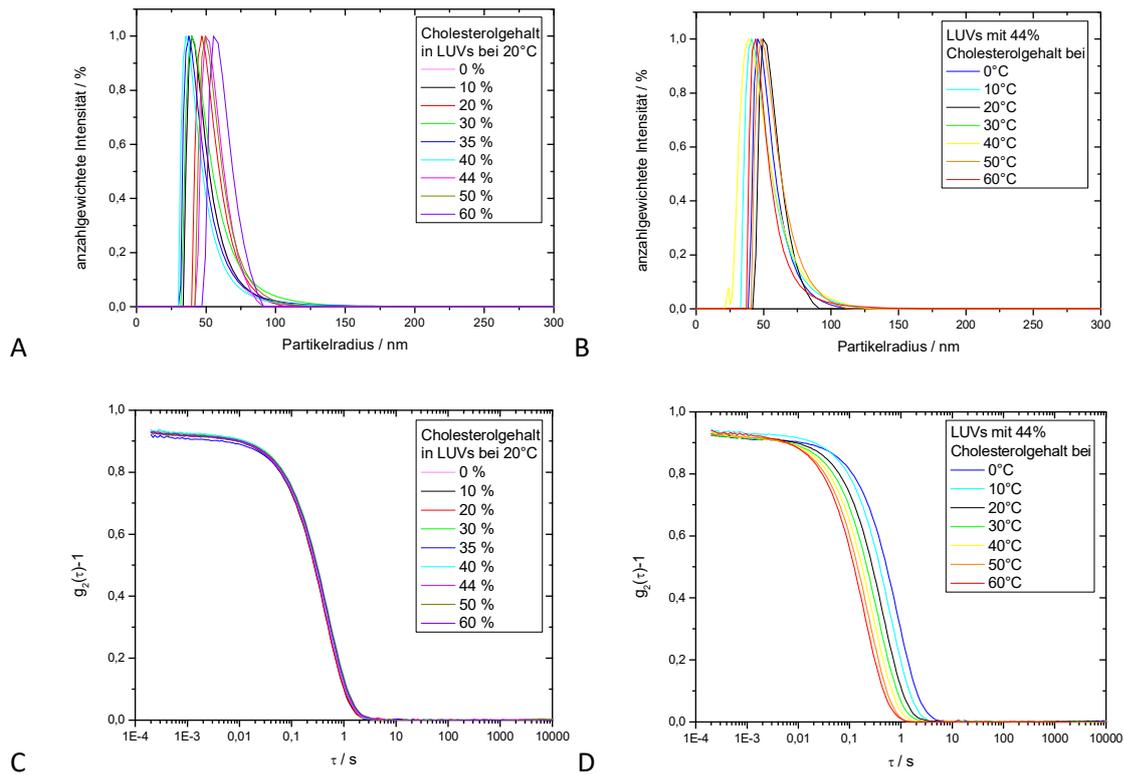


Abbildung A14b: Anzahlgewichtete Verteilungen des Teilchenradius und die Korrelationsfunktionen $g_2(\tau)-1$ von (A+C) LUVs mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt, beispielhaft für eine bei 20 °C gemessene Messreihe. (B+D) zeigt die Temperaturabhängigkeit von 44% LUVs. Alle Proben wurden in einem HEPES-NaCl-Puffer und einem Streuwinkel von 90° vermessen.

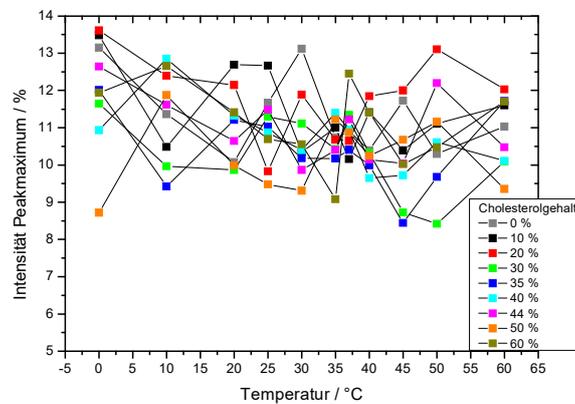


Abbildung A14c. Mittels dynamischer Lichtstreuung erhaltene intensitätsgewichtete Maxima der Partikelgrößenverteilung der Partikelgröße von LUVs mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt in Abhängigkeit von der Temperatur mit einem Streuwinkel von 90°.

A 15. DLS-Daten mit MBP in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt

Messungen mit MBP sind nicht reproduzierbar, deshalb werden nur grobe Tendenzen analysiert und beispielhaft sind im Folgenden einzelne Messreihen dargestellt. Die Reproduzierbarkeit scheitert daran, dass MBP keine gleichmäßig großen Aggregate bildet

und diese dazu führen, dass die *count rate* eine stärkere Streuung aufzeigt mit einzelnen sehr hohen Ausreißern. Da die *count rate* für die Korrelationsfunktion und folglich für die gewichteten Verteilungen von Nöten ist, sind die Daten nur sehr begrenzt interpretierbar. Deshalb werden im Folgenden nur exemplarisch Ergebnisse der Messreihen gezeigt.

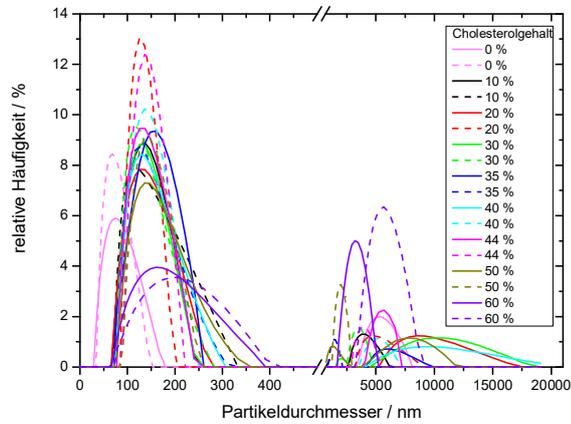


Abbildung A15a: Intensitätsgewichtete Verteilungen des Partikeldurchmessers von LUVs mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt und MBP, beispielhaft für eine Messreihe. Gemessen bei 20 °C mit Streuwinkeln von 90° (gestrichelte Linien) und 175° (durchgezogene Linien) in einem HEPES-NaCl-Puffer.

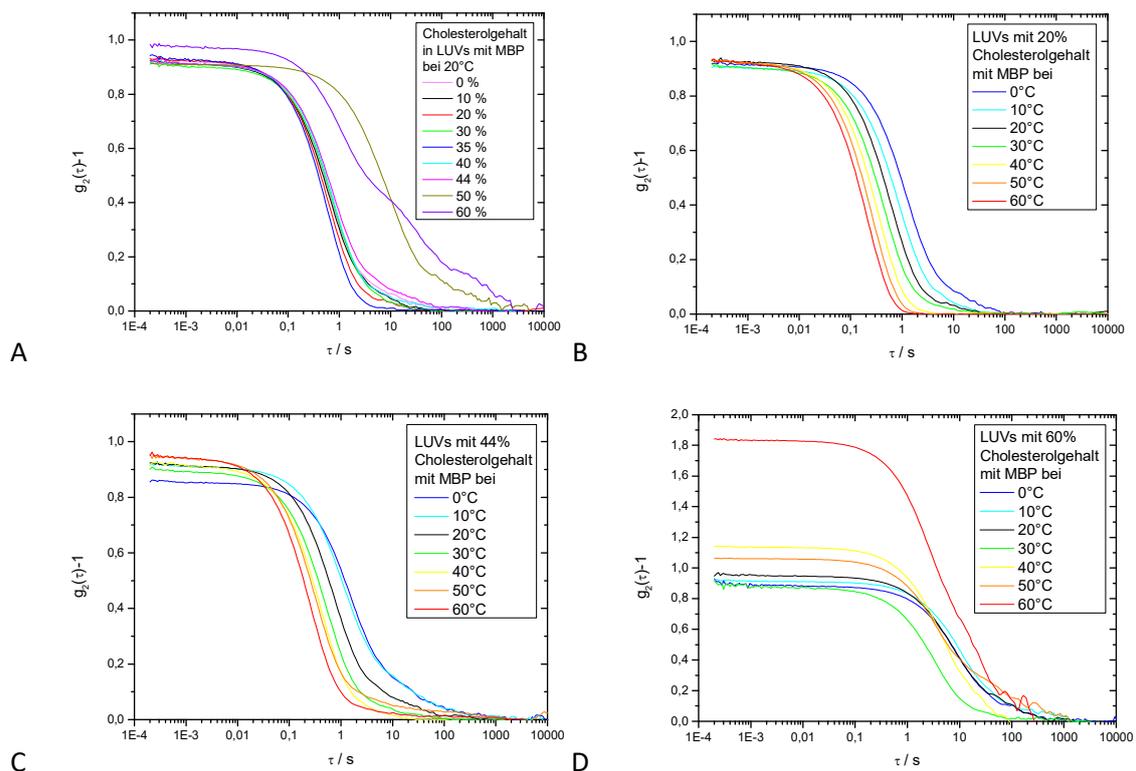


Abbildung A15b: Korrelationsfunktionen $g_2(\tau)-1$ von (A) LUVs mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt und MBP beispielhaft für eine bei 20 °C gemessene Messreihe und (B, C, D) zeigen die Temperaturabhängigkeit von jeweils 20%, 44% und 60% cholesterolhaltigen LUVs mit MBP. Gemessen in einem HEPES-NaCl-Puffer bei einem Streuwinkel von 90°.

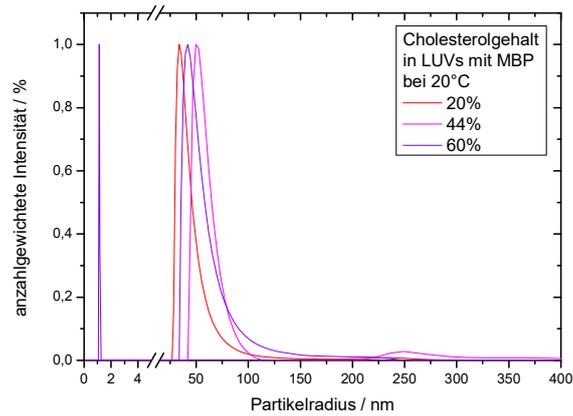


Abbildung A15c: Exemplarische anzahlgewichtete Verteilungen des Teilchenradius von LUVs mit einem Cholesterolgehalt von 20%, 44% und 60% mit MBP bei 20 °C. Erhalten durch dynamische Lichtstreuung mit einem Streuwinkel von 90°.

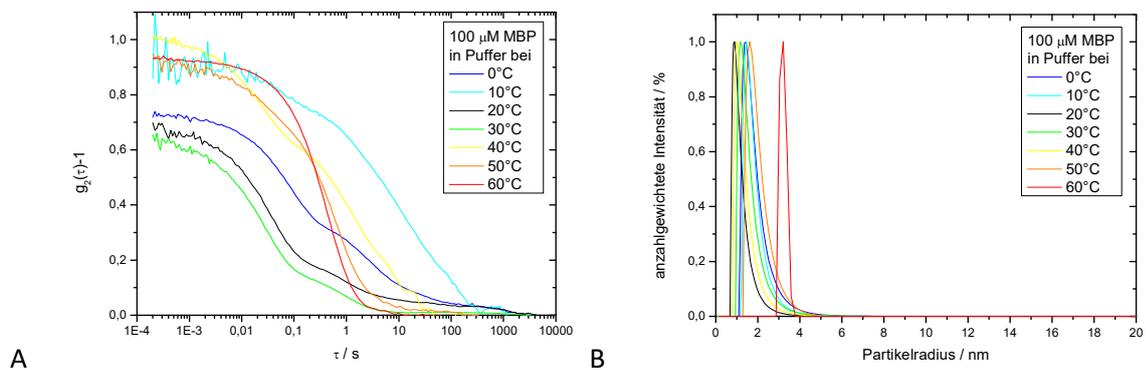


Abbildung A15d: Dynamische Lichtstreuung an einer wässrigen bMBP-Lösung (100 µM) in HEPES-NaCl-Puffer bei pH 7,4 und unterschiedlichen Temperaturen. (A) Korrelationsfunktionen, (B) anzahlgewichtete Verteilungen der Partikelradien. Gemessen mit einem Streuwinkel von 90°.

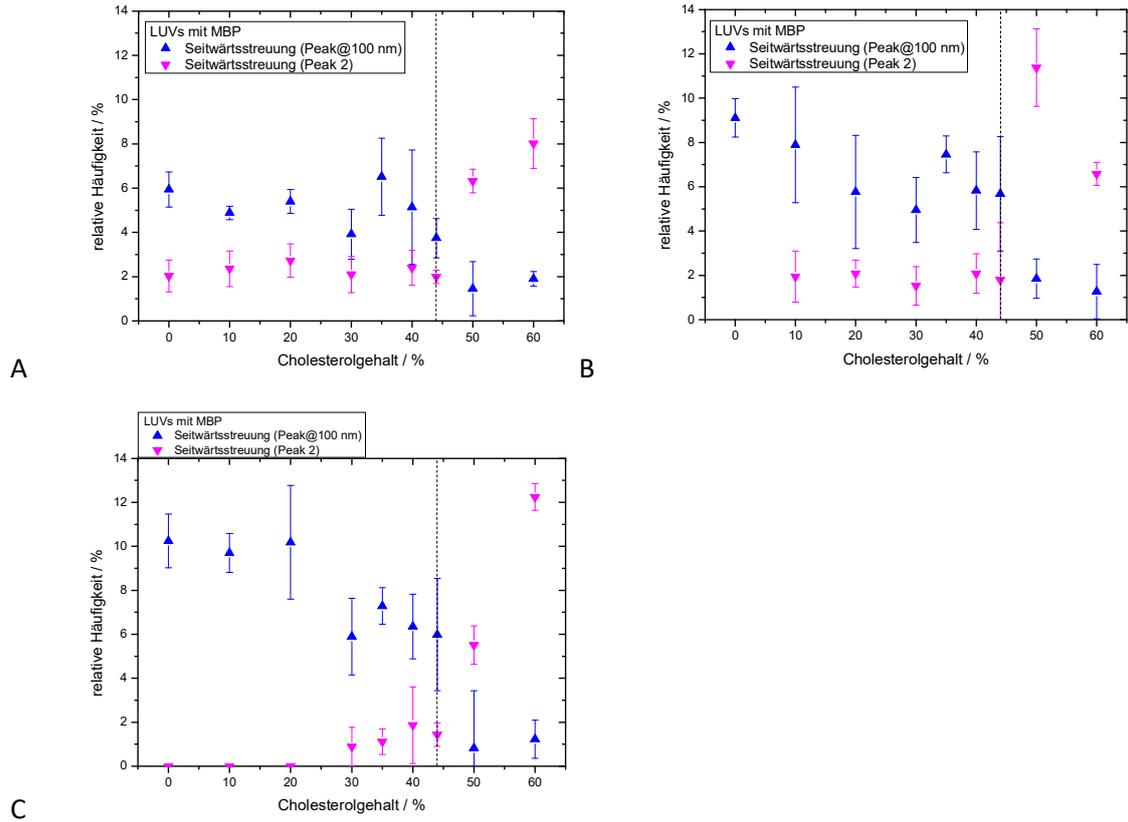


Abbildung A15e. Intensitätsgewichtete Peakmaxima des hydrodynamischen Partikeldurchmessers von Cholesterol enthaltenden LUVs mit MBP (2 μ M). Gemessen bei (A) 10 $^{\circ}$ C, (B) 37 $^{\circ}$ C und (C) 60 $^{\circ}$ C in einem HEPES-NaCl-Puffer mit einem Streuwinkel von 90 $^{\circ}$ (Seitwärtsstreuung), erhalten durch dynamischen Lichtstreuung. Peak 1 @100 nm und Peak 2 beziehen sich dabei auf die in Abbildung 25 definierten Peaks der bimodalen Partikelgrößenverteilung. Die gestrichelte Linie bei 44% Cholesterolgehalt visualisiert den Umschlagspunkt des, im Text diskutierten, Aggregationsverhalten. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts von drei Messungen.

A 16. Zeta-Potential-Daten in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt

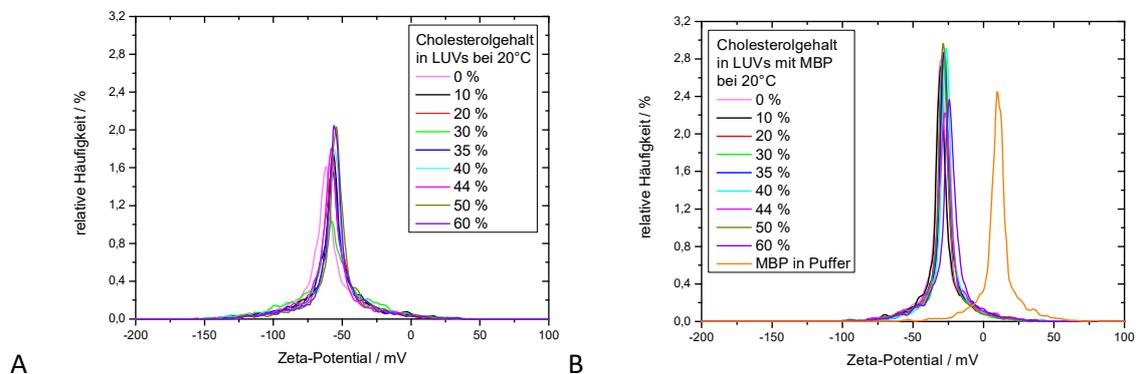


Abbildung A16: Verteilungen des Zeta-Potentials von LUVs mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt (A) ohne und (B) mit MBP. In (B) ist zusätzlich das Potential für bMBP in HEPES-NaCl-Puffer (2 μ M) ohne LUVs dargestellt. Alle Messungen sind beispielhaft für eine Messreihe bei 20 $^{\circ}$ C.

A 17. EPR-Daten in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt

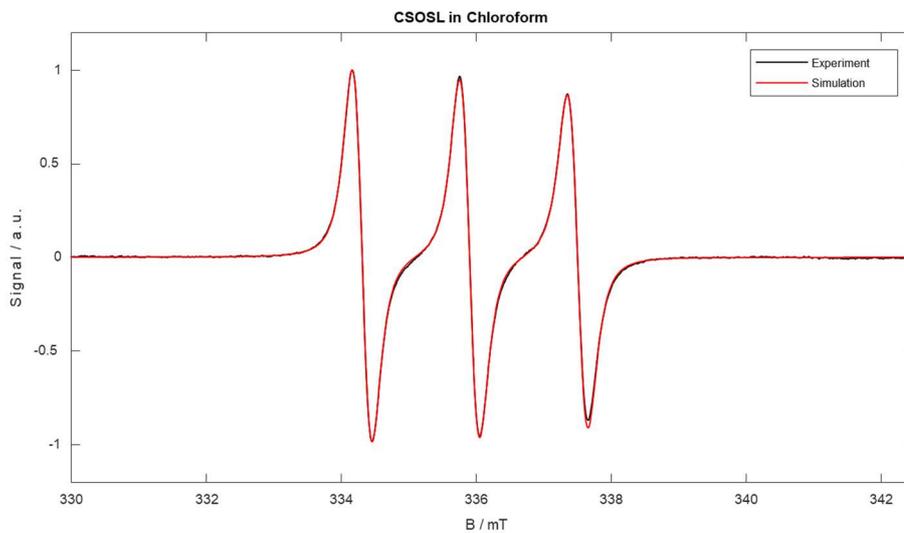


Abbildung A17a: Experimentelle cw EPR-Messung (schwarz) und Simulation (rot) von CSOSL (50 μM) in Chloroform bei 20 °C. Mit $g_{xx}=2.0093$, $g_{yy}=2.0062$, $g_{zz}=2.0022$, $a_{\text{iso,app}}=44,92$ MHz, $D_{xx}=D_{yy}=8,9 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$, $D_{zz}=3,5 \cdot 10^{10} \text{ s}^{-1}$, $\beta=58^\circ$ und normiert auf den Mittelfeldpeak.

Reines CSOSL wurde in Chloroform vermessen, da es nur geringfügig wasserlöslich ist und keine Mizellen ausbilden sollte. Abbildung A17a zeigt ein Spektrum von frei rotierendem CSOSL bei X-Band-Frequenzen und dient bedingt als Referenz. Deutlich erkennbar ist bei LUV-Proben die Veränderung der Intensitätsverhältnisse der drei Peaks zueinander und die allgemeine Verbreiterung der Peaks (siehe z. B. A17b) im Vergleich zu frei rotierendem CSOSL.

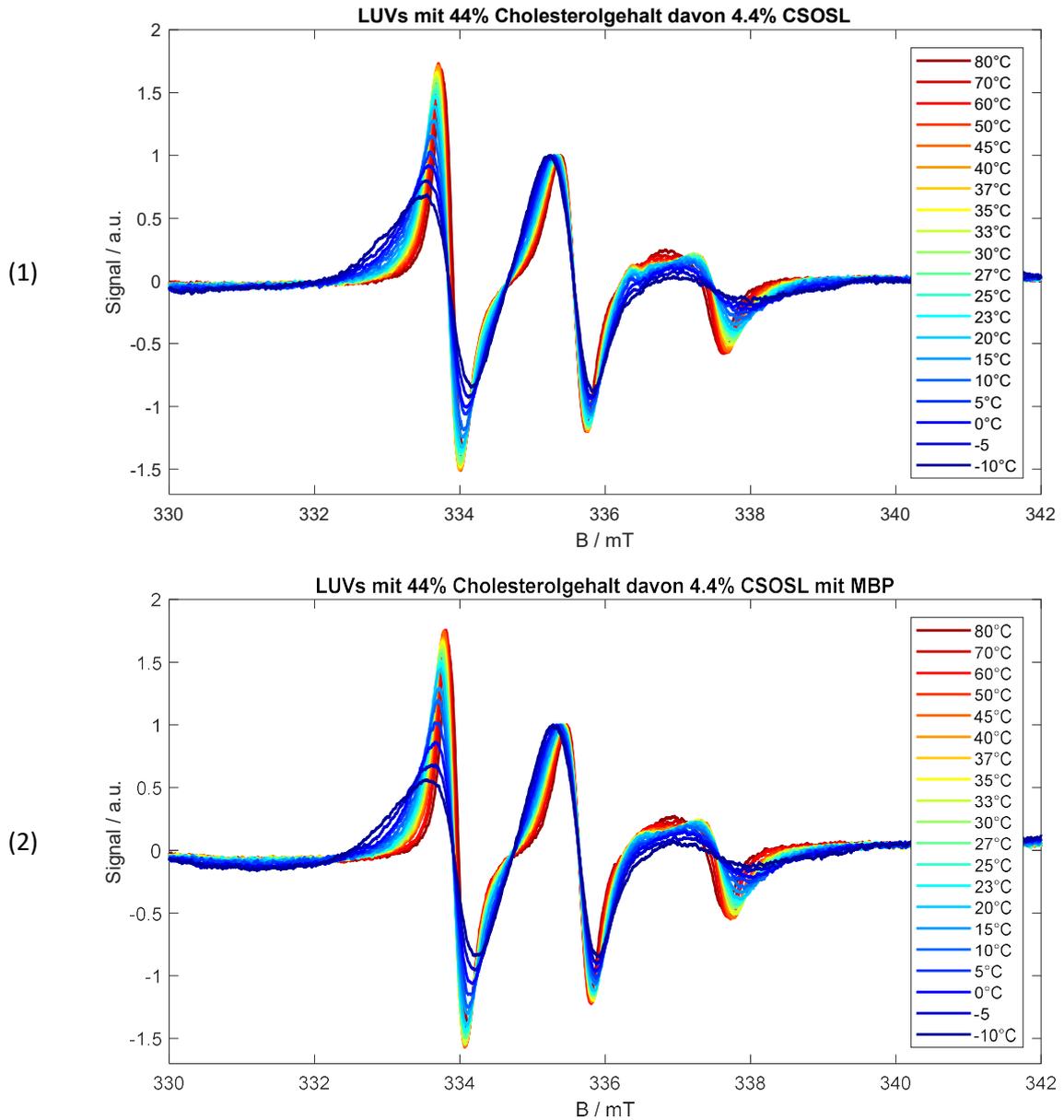


Abbildung A17b: Temperaturreihen von normierten X-Band-cw-EPR-Spektren von LUVs mit 44% Cholesterol, davon 4,4% CSOSL, (1) ohne und (2) mit MBP in einem HEPES-NaCl-Puffer (jeweils 8 Scans gemessen bei -10 °C bis 80 °C, MW-Leistung 5-10 dB, Mittelfeld 336 mT, Scanbreite 15 mT, Modulationsamplitude 0,1 mT). Das Lipid/MBP-Verhältnis betrug 567:1.

Die Temperaturreihen (A17b) zeigen die Immobilisierung der Spinmarkierung mit sinkender Temperatur, da zunehmende Spinanisotropien zu spektralen Verzerrungen führen.

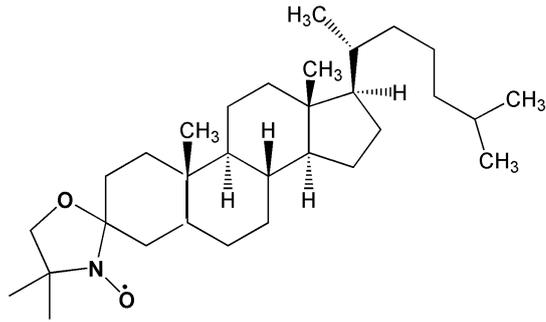


Abbildung A17c: Chemische Struktur des spinmarkierten Cholestans CSL [260].

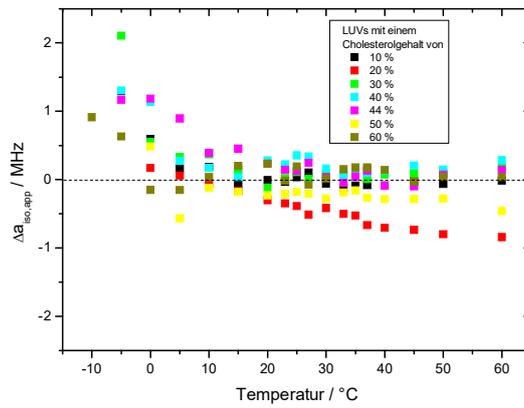


Abbildung A17d: Differenzen $\Delta a_{\text{iso,app}} = a_{\text{iso,app}}(\text{MBP}) - a_{\text{iso,app}}(\text{LUVs})$ der scheinbaren isotropen Hyperfeinkopplungskonstanten $a_{\text{iso,app}}$ von LUVs mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt (aus Abbildung 30), die 4,4% CSOSL enthalten in Abhängigkeit der Temperatur. Die LUV-Proben wurden in einem HEPES-NaCl-Puffer und mit einem Lipid/Protein-Verhältnis von 567:1 vermessen.

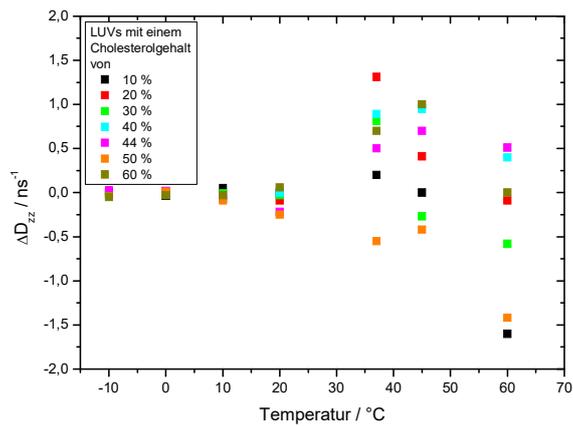
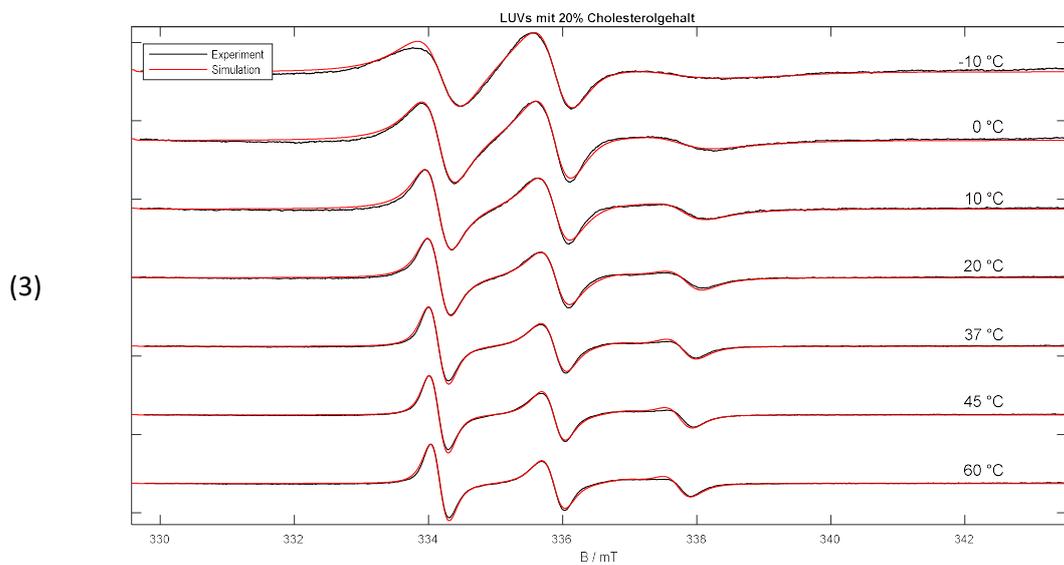
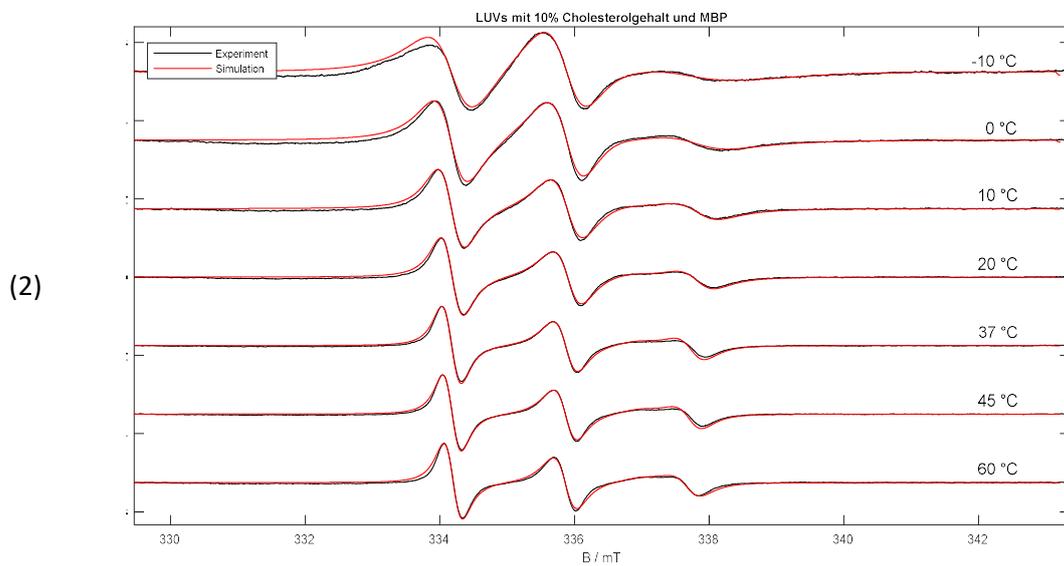
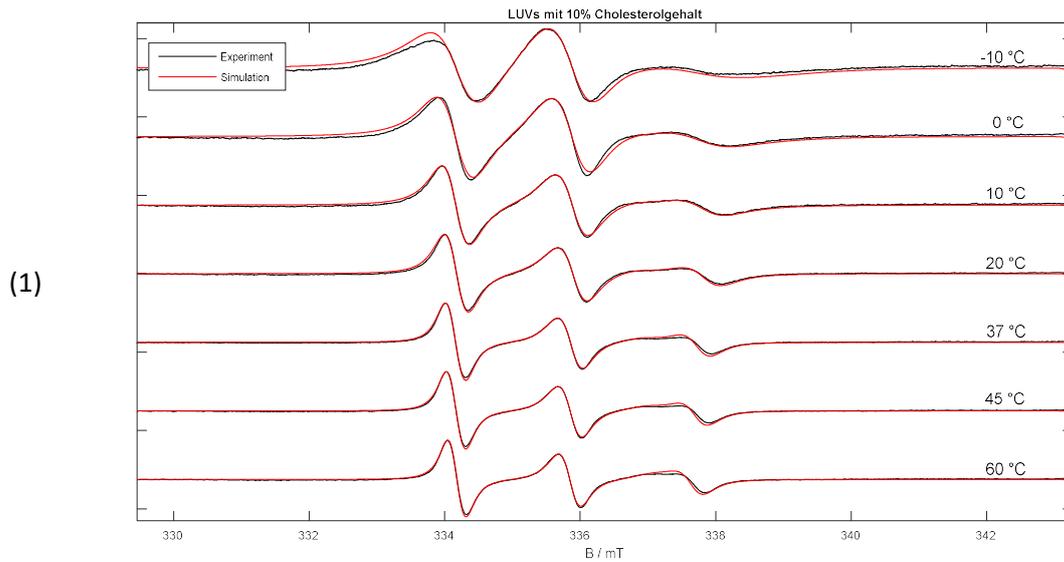
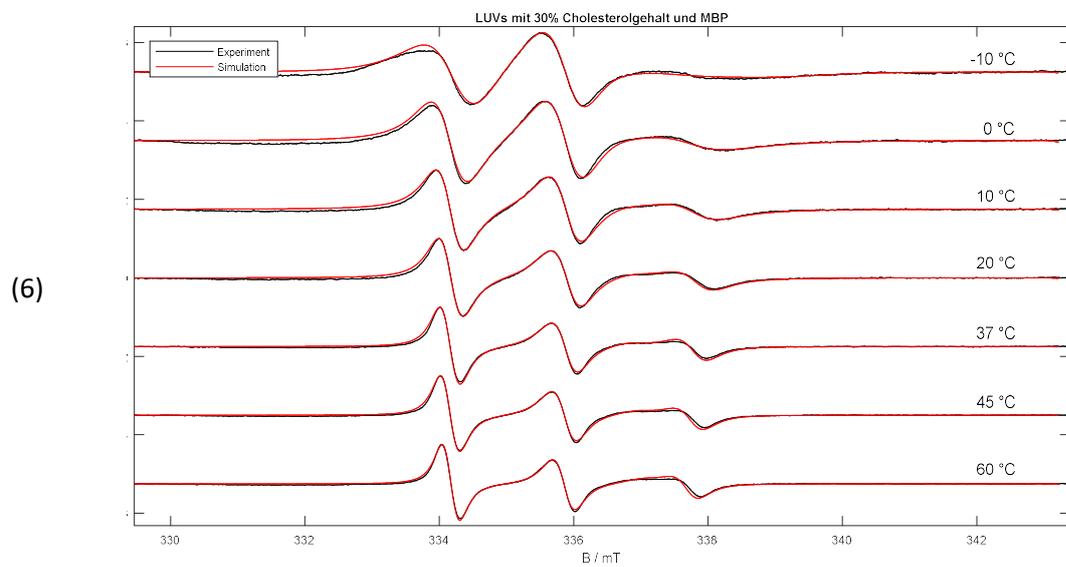
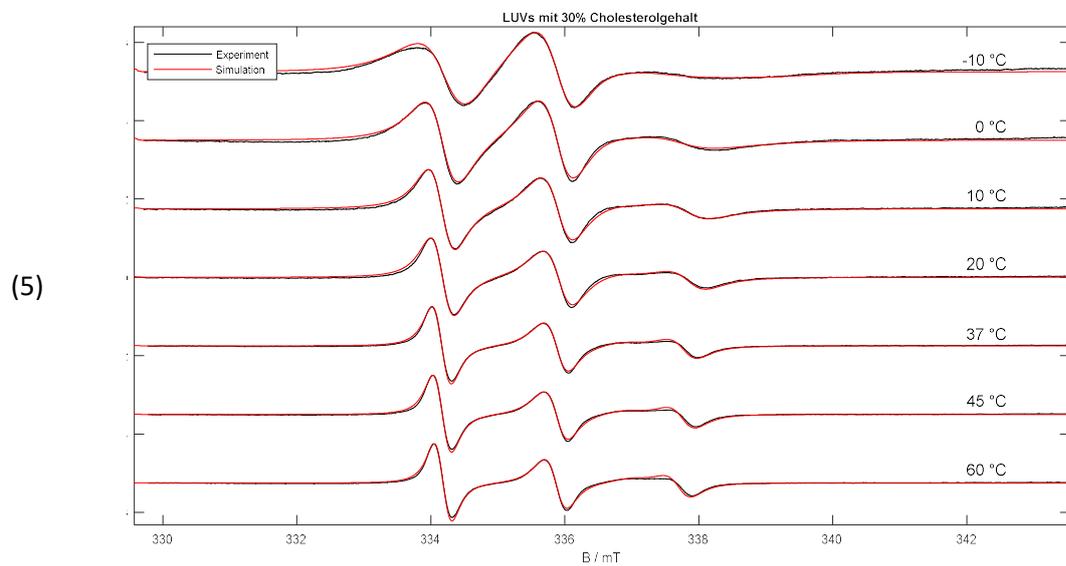
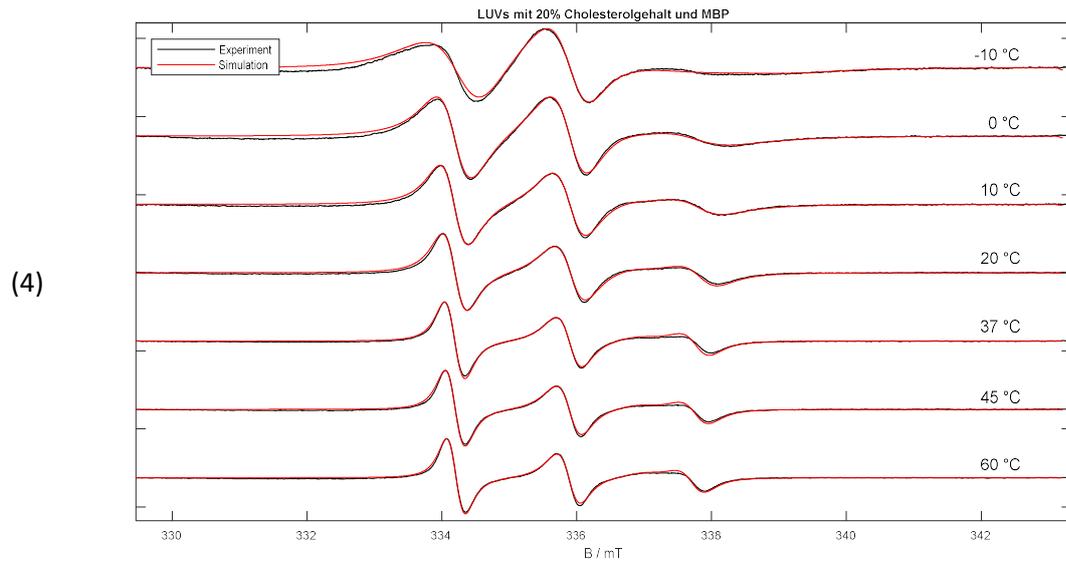


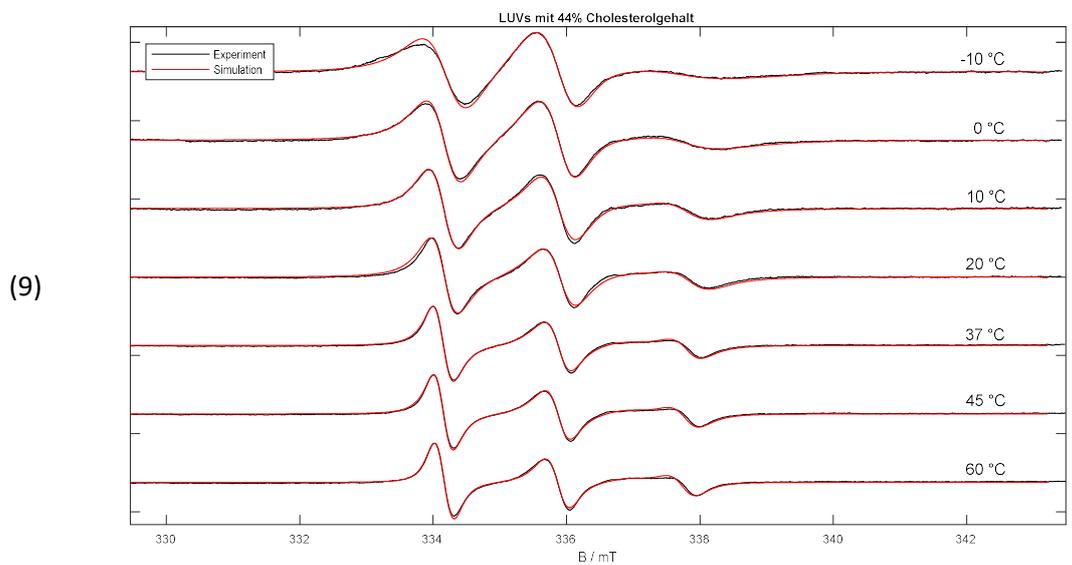
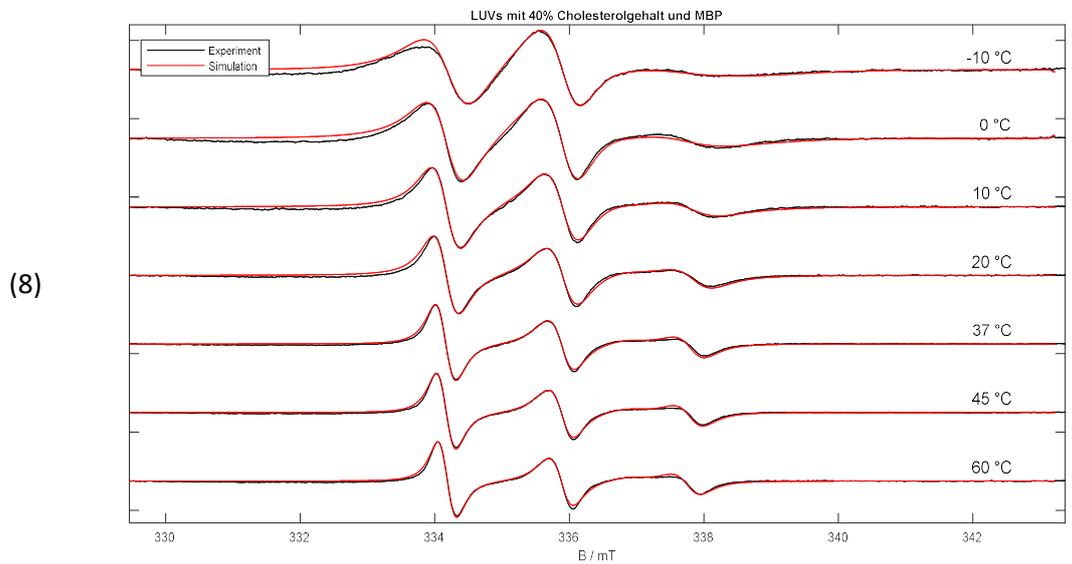
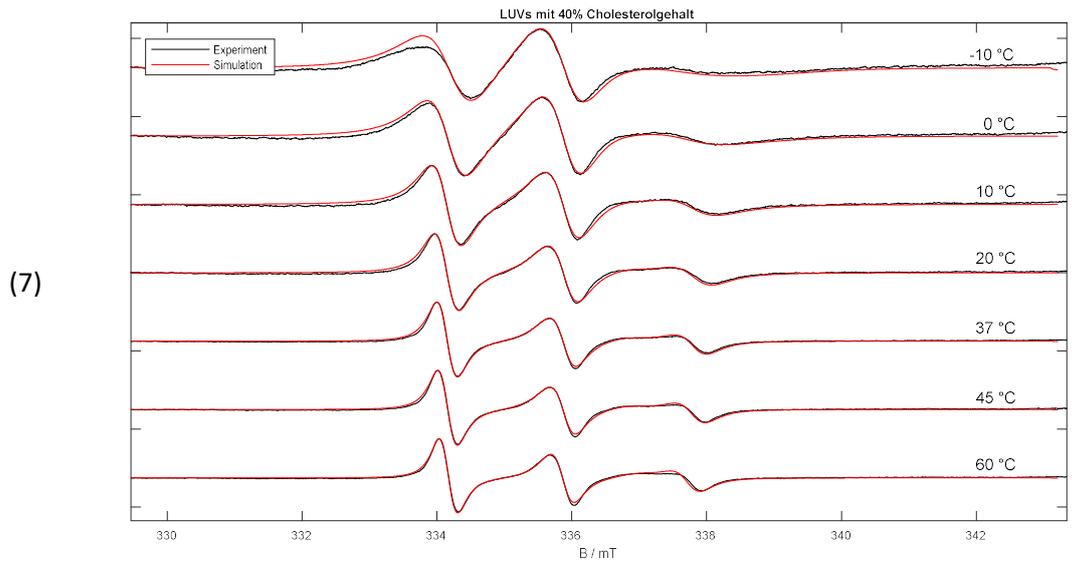
Abbildung A17e: Temperaturabhängige Rotationsdiffusionsdifferenz ΔD_{zz} aus $D_{zz}(\text{LUV})$ subtrahiert von $D_{zz}(\text{MBP})$, mit Werten aus Abbildung 32 für LUV-Proben mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt.



(Abbildung wird auf der nächsten Seite fortgesetzt.)

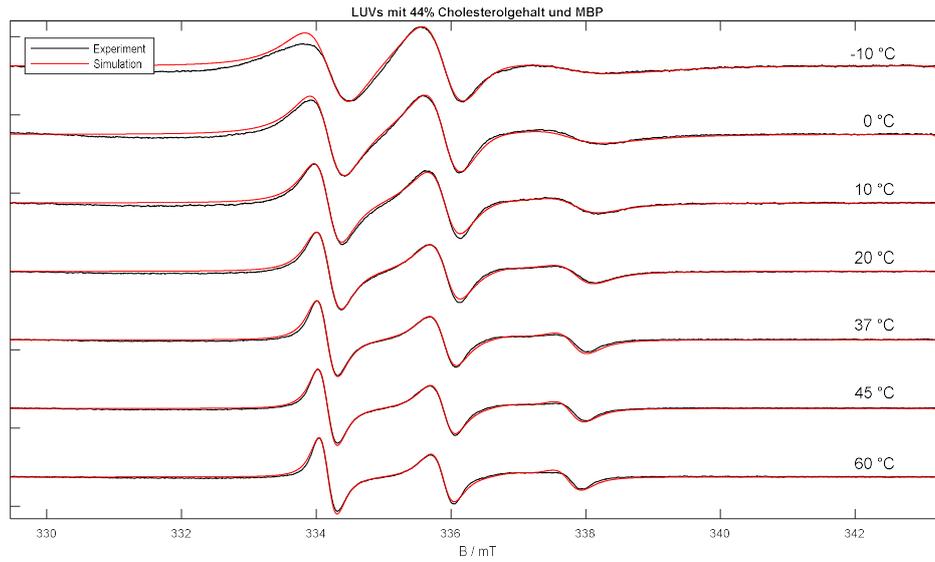


(Abbildung wird auf der nächsten Seite fortgesetzt.)

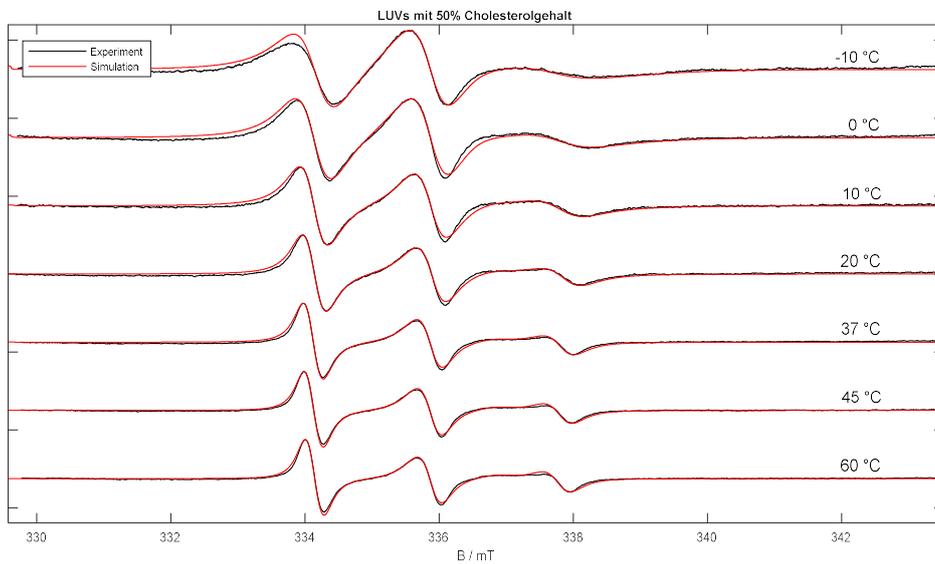


(Abbildung wird auf der nächsten Seite fortgesetzt.)

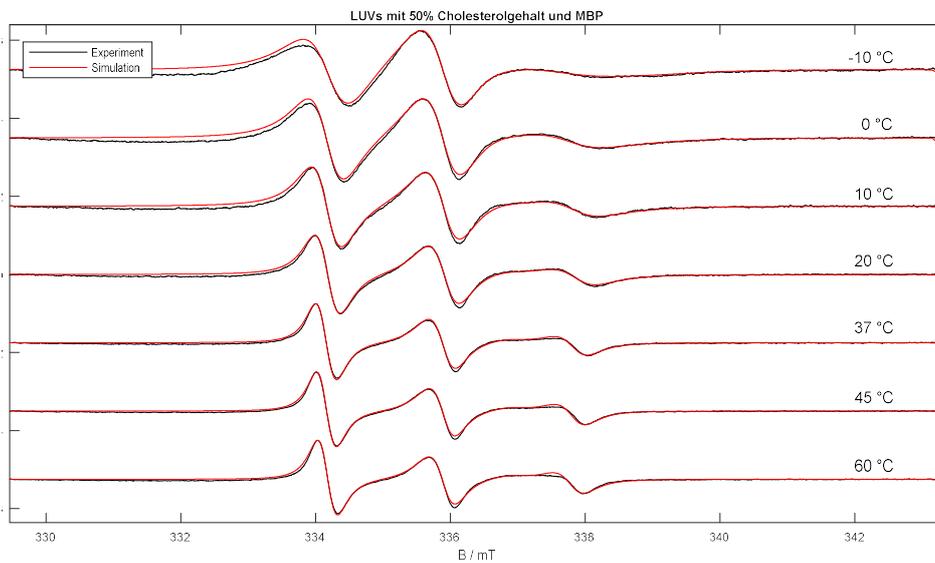
(10)



(11)

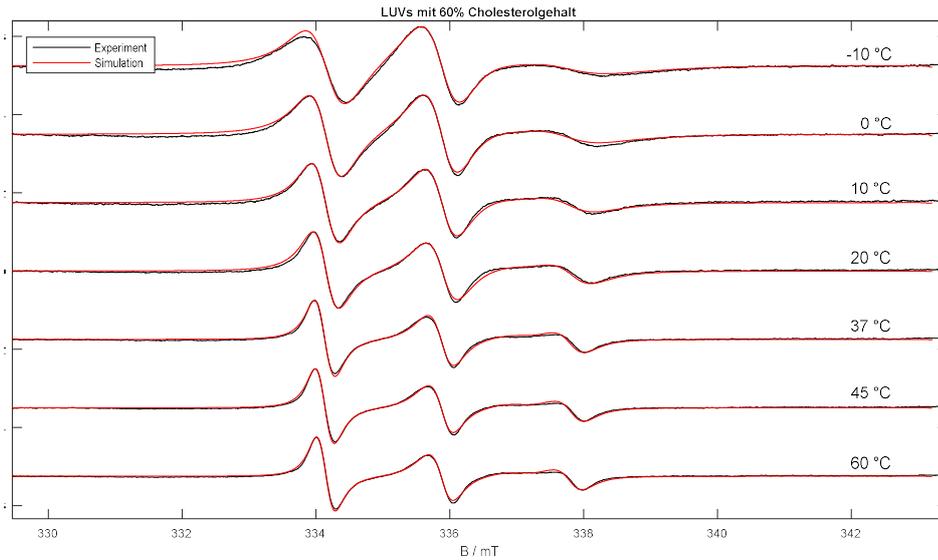


(12)



(Abbildung wird auf der nächsten Seite fortgesetzt.)

(13)



(14)

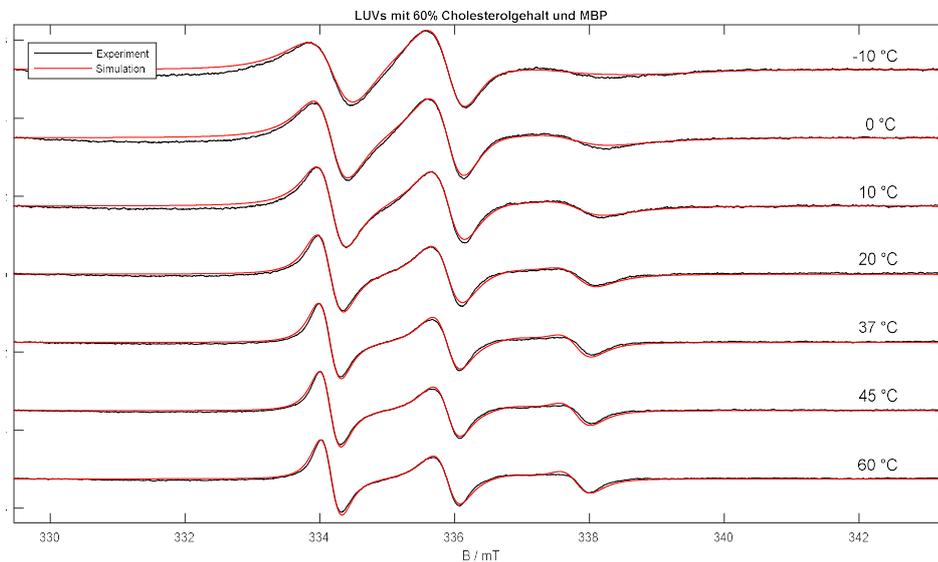


Abbildung A17f: Ausgewählte temperaturabhängige Simulationen mit den jeweiligen gemessenen und normierten X-Band-cw-EPR-Spektren von LUVs mit 50 μ M CSOSL in einem HEPES-NaCl-Puffer mit einem Cholesterolgehalt von (1) 10%, (2) 10% und MBP, (3) 20%, (4) 20% und MBP, (5) 30%, (6) 30% und MBP, (7) 40%, (8) 40% und MBP, (9) 44%, (10) 44% und MBP, (11) 50%, (12) 50% und MBP, (13) 60% und (14) 60% und MBP. Es wurde ein Lipid/Protein-Verhältnis von 567:1 verwendet. Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) Spektren für jede Temperatur.

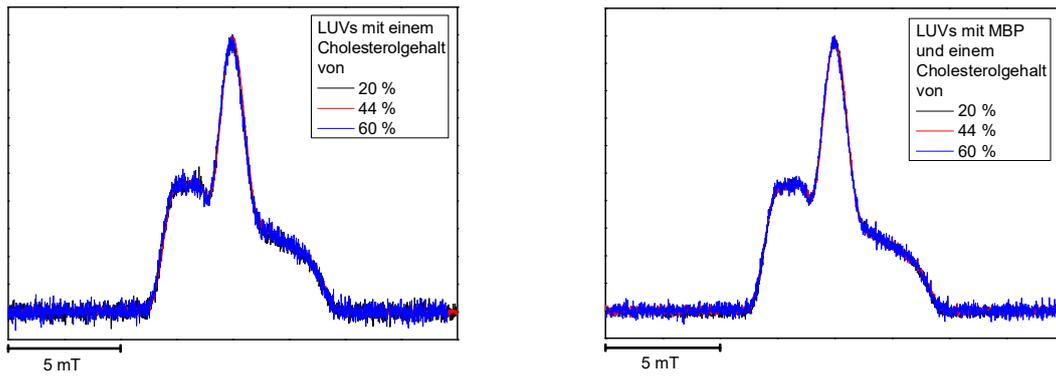


Abbildung A17g: ESE-detektierte EPR-Spektren von 4,4% CSOSL in LUVs mit unterschiedlichem Cholesterolgehalt in einem HEPES-NaCl-Puffer bei 50 K (Lipid/Protein-Verhältnis 567:1). Die Spektren wurden auf eine gleiche Amplitude normiert.

A 18. DLS-Daten in Abhängigkeit von Metallionen

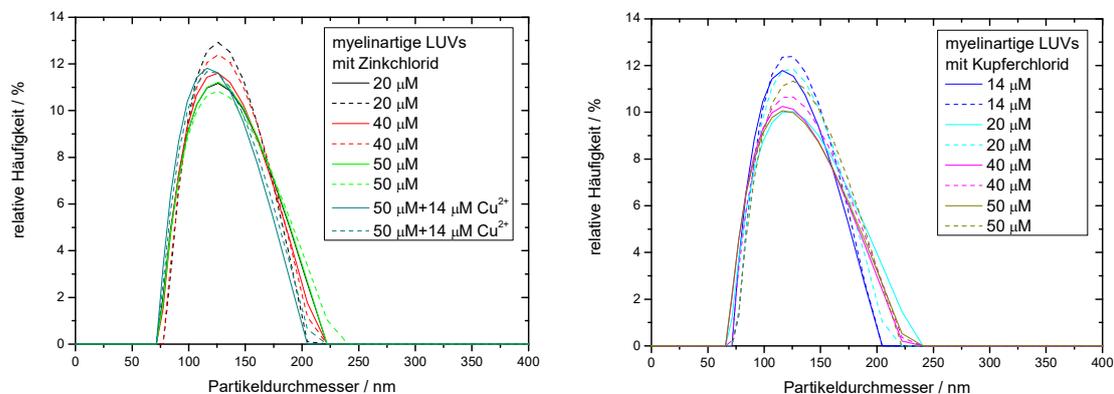
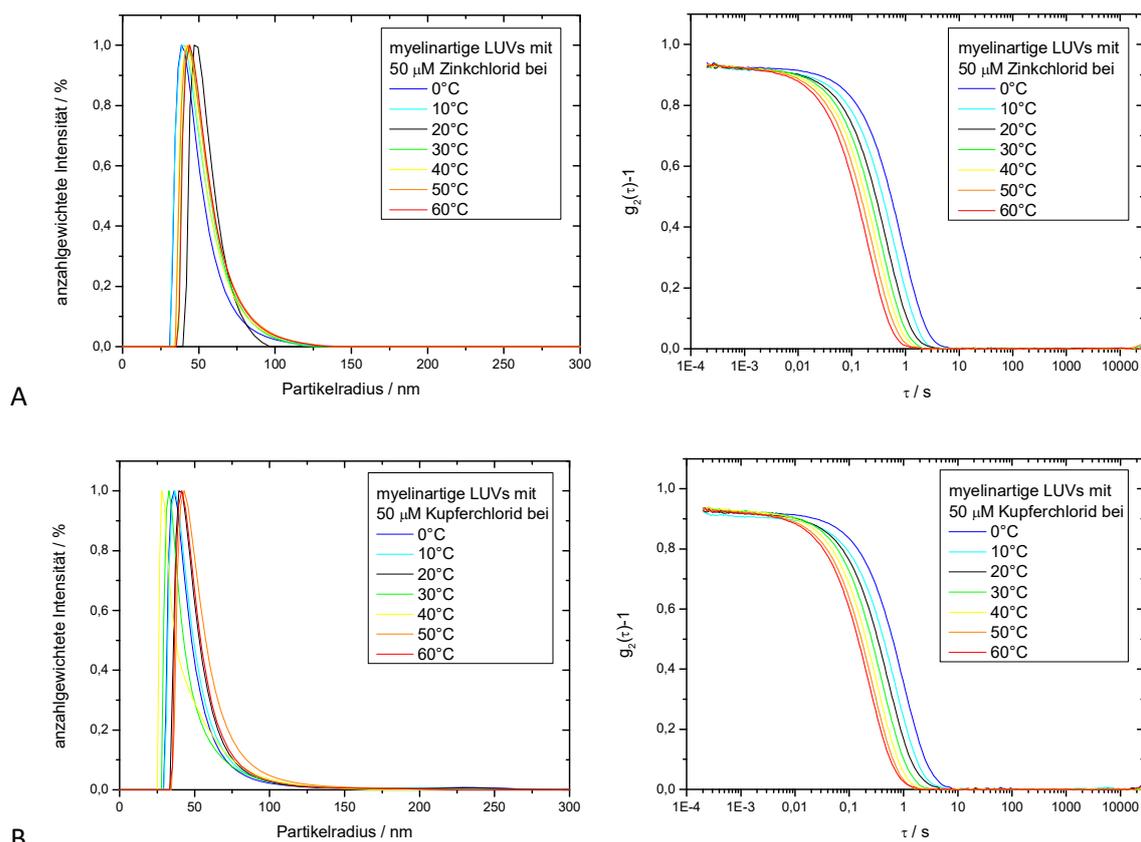


Abbildung A18a: Intensitätsgewichtete Verteilungen des Partikeldurchmessers durch dynamische Lichtstreuung von LUVs mit unterschiedlichem Metallionengehalt (rechts: Cu^{2+} , links: Zn^{2+}), beispielhaft für eine Messreihe. Gemessen bei 20 °C mit Streuwinkeln von 90° (gestrichelte Linien) und 175° (durchgezogene Linien) in einem HEPES-NaCl-Puffer.



(Die Abbildung wird auf der nächsten Seite fortgesetzt.)

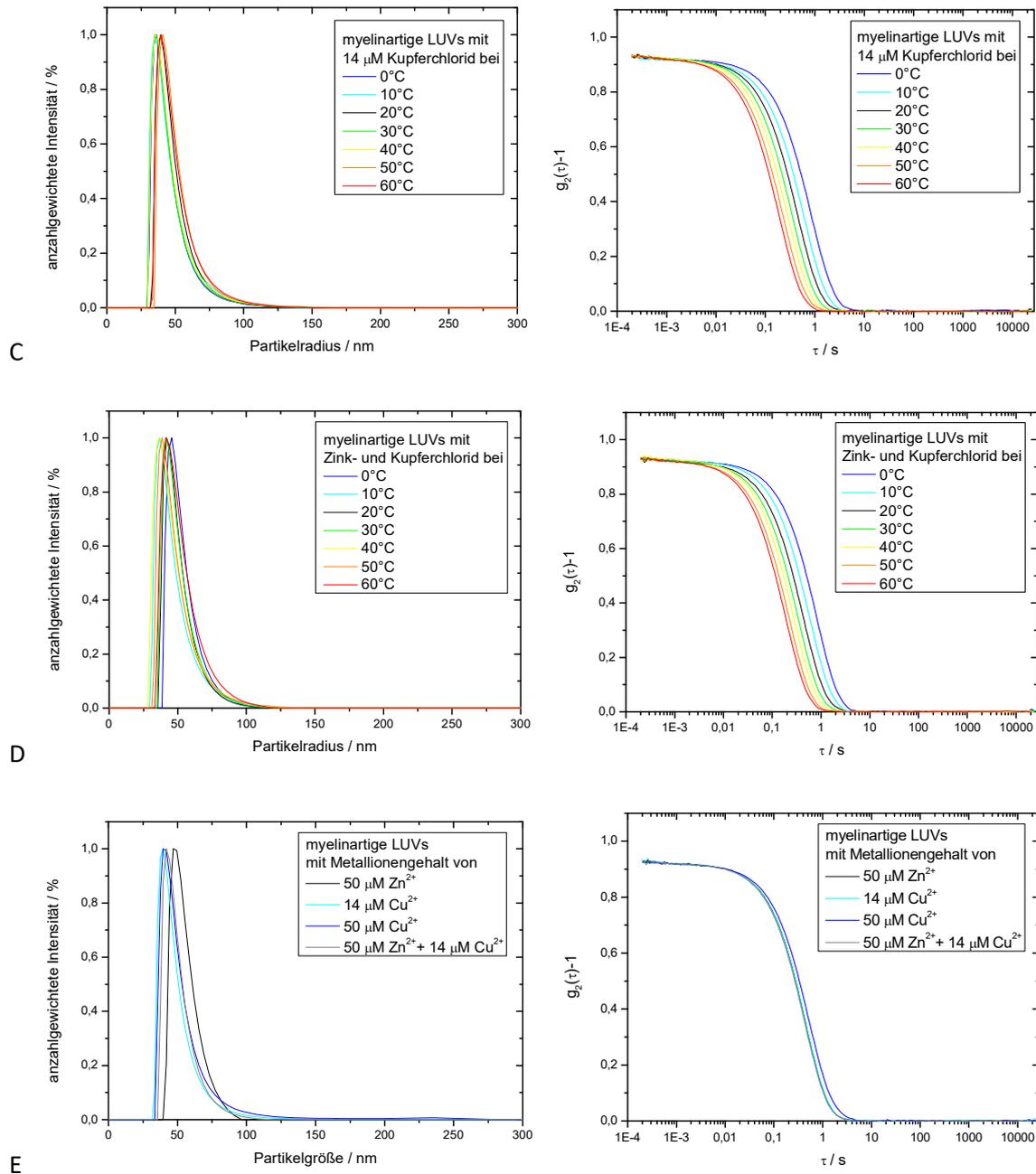


Abbildung A18b: Anzahlgewichtete Verteilungen des Teilchenradius (links) und die Korrelationsfunktionen $g_2(\tau)$ (rechts) von LUVs mit unterschiedlichem Metallionengehalt in Abhängigkeit von der Temperatur, erhalten durch dynamische Lichtstreuung. (A) 50 μM Zinkchlorid, (B) 50 μM Kupferchlorid, (C) 14 μM Kupferchlorid, (D) 50 μM Zinkchlorid + 14 μM Kupferchlorid, (E) Vergleich bei 20 °C. Gemessen bei einem Streuwinkel von 90° und in einem HEPES-NaCl-Puffer.

A 19. DLS-Daten mit MBP in Abhängigkeit von Metallionen

Messungen mit MBP sind nicht reproduzierbar, deshalb werden nur grobe Tendenzen analysiert und beispielhaft sind im Folgenden einzelne Messreihen dargestellt. Die Reproduzierbarkeit scheitert daran, dass MBP keine gleichmäßig großen Aggregate bildet und diese dazu führen, dass die *count rate* eine stärkere Streuung aufzeigt mit einzelnen sehr hohen Ausreißern. Da die *count rate* für die Korrelationsfunktion und folglich für die gewichteten Verteilungen von Nöten ist, sind die Daten nur sehr begrenzt interpretierbar. Deshalb werden im Folgenden nur exemplarisch Ergebnisse der Messreihen gezeigt.

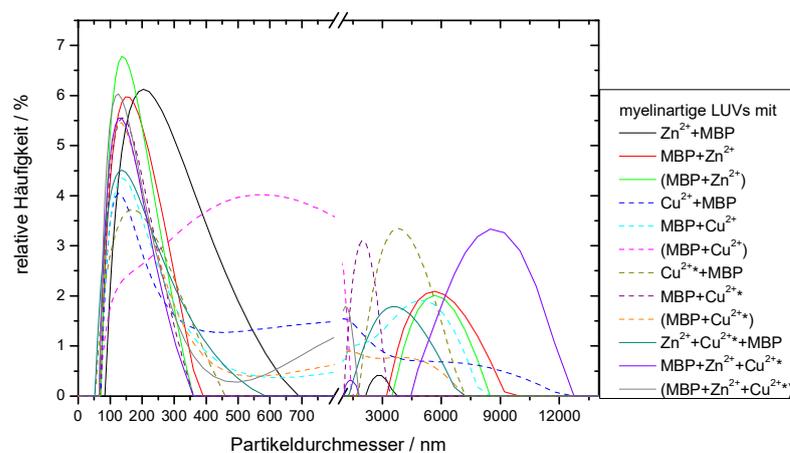


Abbildung A19a: Intensitätsgewichtete Verteilungen des Partikeldurchmessers von LUVs mit unterschiedlichem Metallionengehalt und MBP, beispielhaft für eine Messreihe. Dargestellt sind die drei verschiedenen Pipettier-Reihenfolgen für jede Messreihe. Gemessen bei 20 °C mit einem Streuwinkel von 90° in einem HEPES-NaCl-Puffer. Die Konzentrationen für die jeweiligen Metallionen sind: $\text{Zn}^{2+}=50 \mu\text{M}$, $\text{Cu}^{2+}=50 \mu\text{M}$, $\text{Cu}^{2+*}=14 \mu\text{M}$.

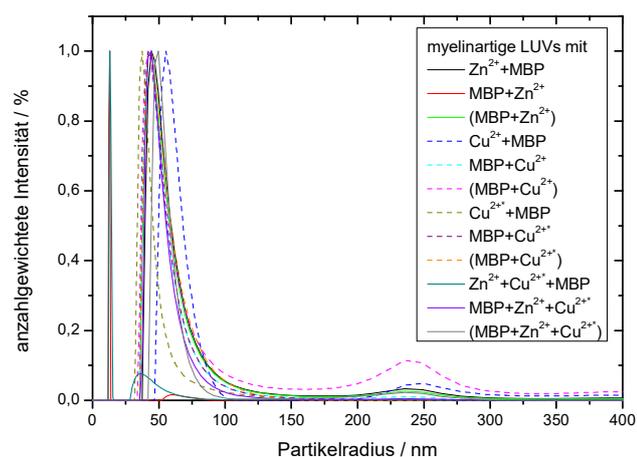


Abbildung A19b: Exemplarische anzahlgewichtete Verteilungen des Teilchenradius von LUVs mit unterschiedlichem Metallionengehalt mit MBP und deren drei Pipettier-Reihenfolgen bei 20 °C in einem HEPES-NaCl-Puffer, erhalten durch dynamische Lichtstreuung. Die Konzentrationen für die jeweiligen Metallionen sind: $\text{Zn}^{2+}=50 \mu\text{M}$, $\text{Cu}^{2+}=50 \mu\text{M}$, $\text{Cu}^{2+*}=14 \mu\text{M}$.

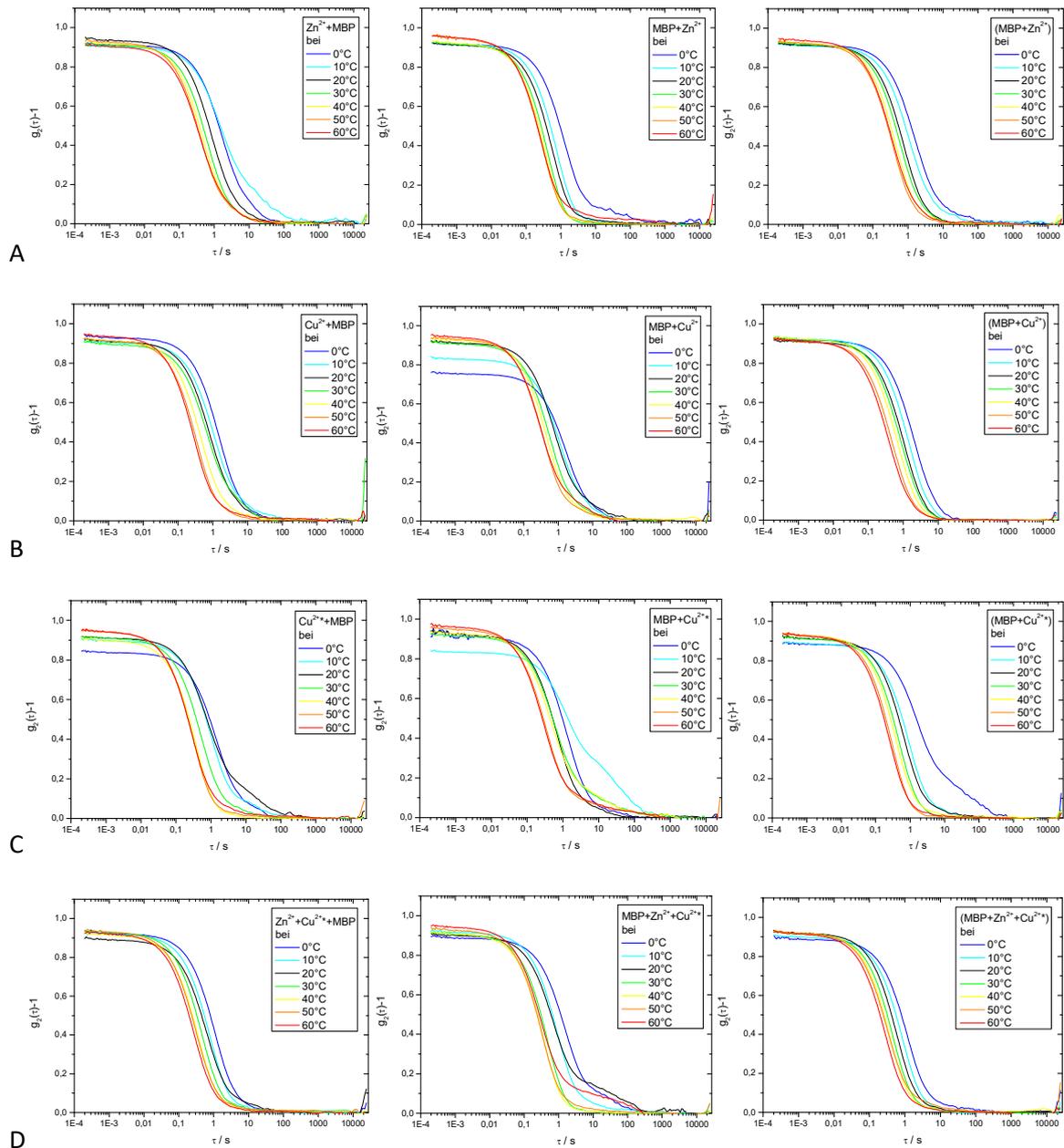


Abbildung A19c: Korrelationsfunktionen $g_2(\tau)$ von myelinartigen LUVs mit unterschiedlichem Metallionengehalt und MBP erhalten durch dynamische Lichtstreuung, beispielhaft für eine Messreihe im Temperaturbereich von 0 °C bis 60 °C. (A) mit 50 μ M ZnCl₂, (B) mit 50 μ M CuCl₂, (C) mit 14 μ M CuCl₂, (D) mit 50 μ M ZnCl₂ und 14 μ M CuCl₂. Es wurden drei Pipettier-Reihenfolgen verwendet: (links) LUVs+M²⁺+MBP, (Mitte) LUVs+MBP+M²⁺ und (rechts) LUVs+(MBP+M²⁺). Gemessen in einem HEPES-NaCl-Puffer und mit einem Streuwinkel von 90°.

A 20. Zeta-Potential-Daten in Abhängigkeit von Metallionen

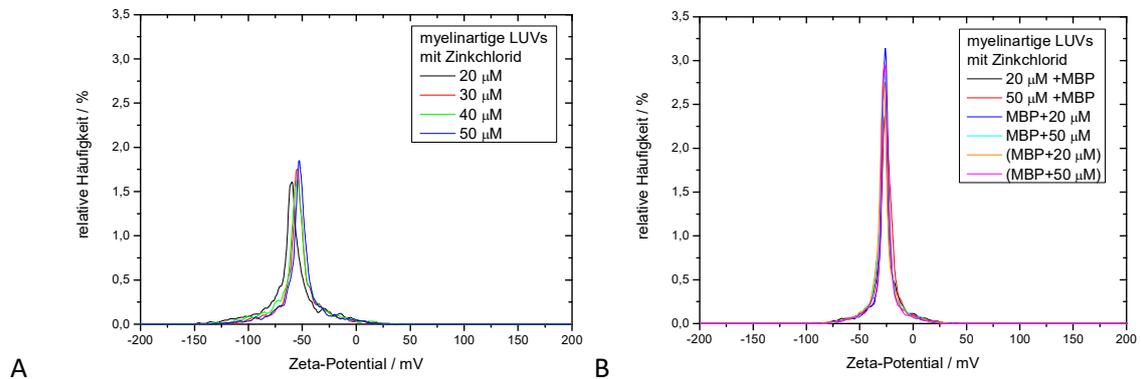


Abbildung A20a: Verteilung des Zeta-Potentials von myelinartigen LUVs mit unterschiedlichem Zinkchloridgehalt (A) ohne und (B) mit MBP in verschiedenen Pipettier-Reihenfolgen, beispielhaft für eine Messreihe. Gemessen bei 20 °C in einem HEPES-NaCl-Puffer, erhalten durch cmpALS.

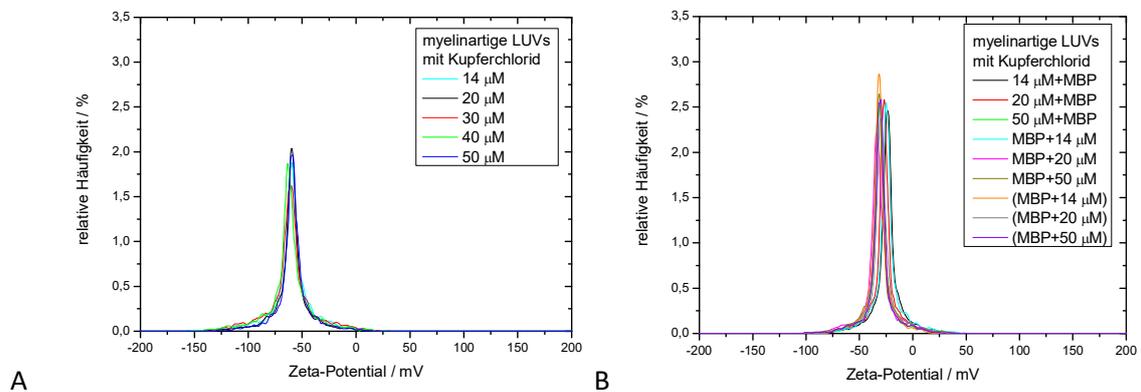


Abbildung A20b: Verteilung des Zeta-Potentials von myelinartigen LUVs mit unterschiedlichem Kupferchloridgehalt (A) ohne und (B) mit MBP in verschiedenen Pipettier-Reihenfolgen, beispielhaft für eine Messreihe. Gemessen bei 20 °C in einem HEPES-NaCl-Puffer, erhalten durch cmpALS.

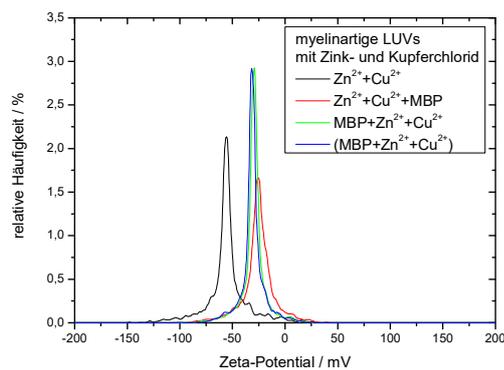


Abbildung A20c: Verteilung des Zeta-Potentials von myelinartigen LUVs mit einer Mischung aus Zink- (50 µM) und Kupferchlorid (14 µM) ohne und mit MBP in verschiedenen Pipettier-Reihenfolgen, beispielhaft für eine Messreihe. Gemessen bei 20 °C in einem HEPES-NaCl-Puffer, erhalten durch cmpALS.

A 21. Kryo-TEM-Aufnahmen in Abhängigkeit von Metallionen

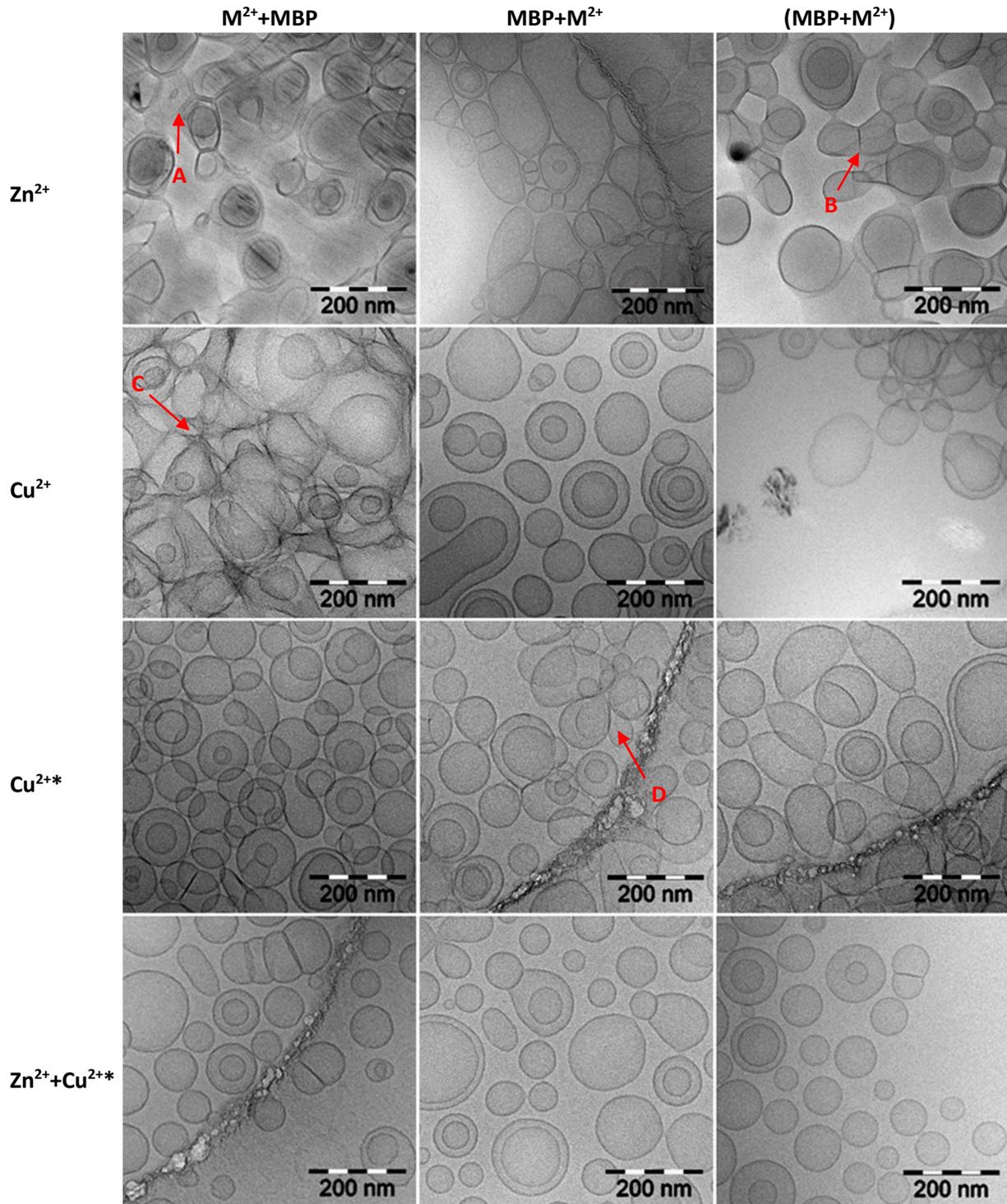


Abbildung A21: Vergrößerte Kryo-TEM-Aufnahmen aus Abbildung 37 von Vesikeln mit 44% Cholesterolgehalt mit MBP und verschiedenen divalenten Metallionen. Es wurde in drei verschiedenen Reihenfolgen Protein und Metallionen hinzugegeben: Metallionen dann Protein ($M^{2+}+MBP$), Protein dann Metallionen ($MBP+M^{2+}$) oder Protein und Metallionen wurden inkubiert ($(MBP+M^{2+})$). Dabei stehen die Abkürzungen der Ionen für folgende Konzentrationen: $Zn^{2+}=50 \mu M$, $Cu^{2+}=50 \mu M$, $Cu^{2+*}=14 \mu M$.

A 22. EPR-Daten in Abhängigkeit von Metallionen

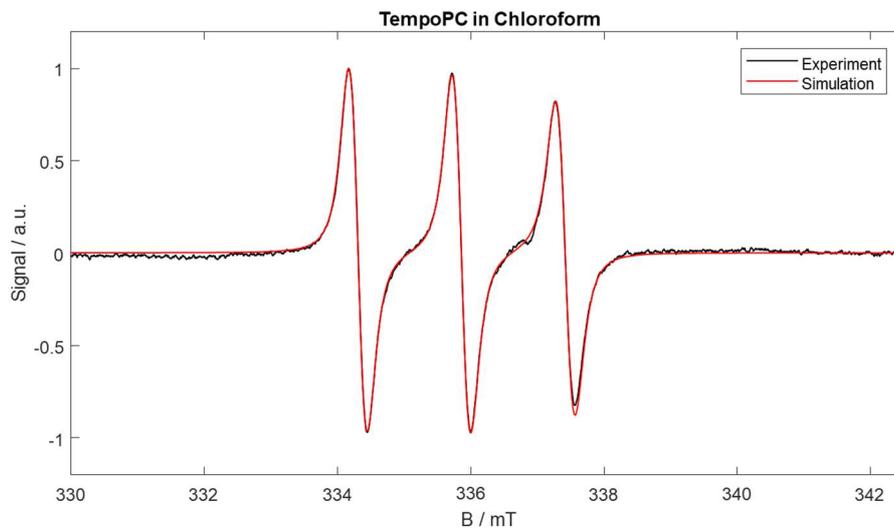
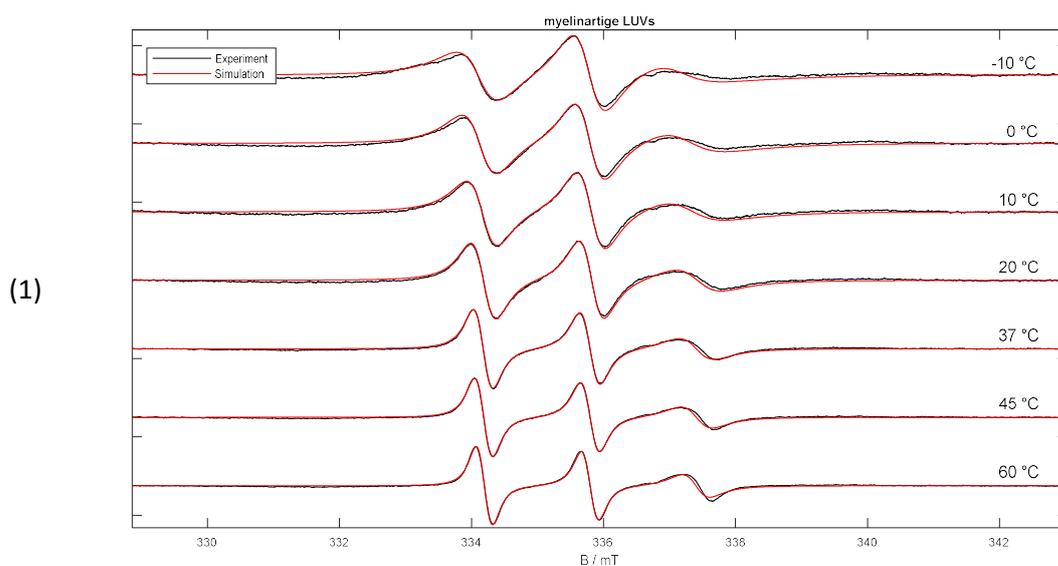


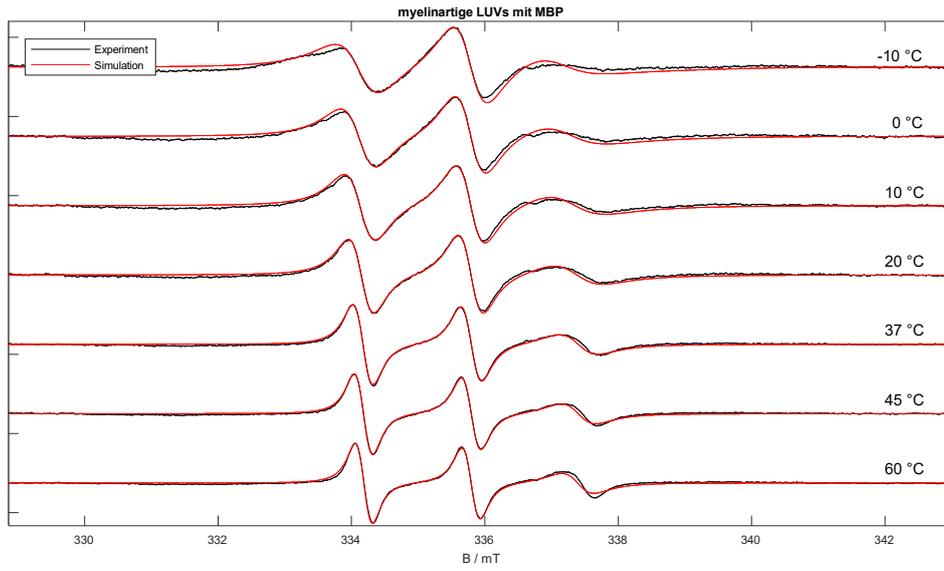
Abbildung A22a: Experimentelle cw EPR-Messung (schwarz) und Simulation (rot) von TempoPC (25 μM) in Chloroform bei 20 °C. Mit $g_{xx}=2.0099$, $g_{yy}=2.0061$, $g_{zz}=2.0024$, $a_{\text{iso,app}}=43,86$ MHz, $D_{xx}=D_{yy}=9,9*10^7$ s $^{-1}$, $D_{zz}=0,9*10^{10}$ s $^{-1}$, $\beta=53^\circ$ und normiert auf den Mittelfeldpeak.

Reines TempoPC wurde in Chloroform vermessen, da es nicht wasserlöslich ist und keine Mizellen ausbilden sollte. Abbildung A22a zeigt ein Spektrum von frei rotierendem TempoPC bei X-Band-Frequenzen und dient bedingt als Referenz. Deutlich erkennbar ist bei LUV-Proben die Veränderung der Intensitätsverhältnisse der drei Peaks zueinander und die allgemeine Verbreiterung der Peaks (siehe z. B. A22b) im Vergleich zu frei rotierendem TempoPC.

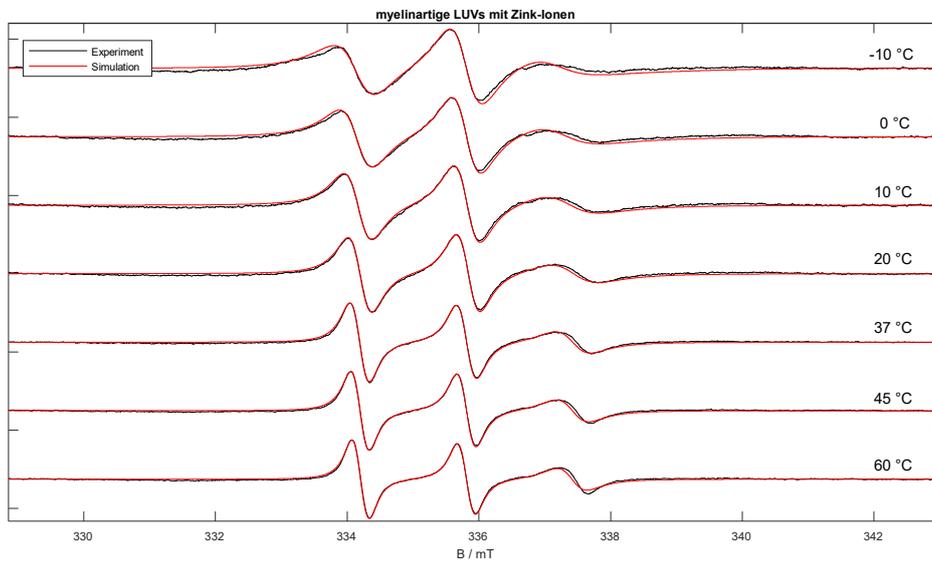


(Abbildung wird auf der nächsten Seite fortgesetzt.)

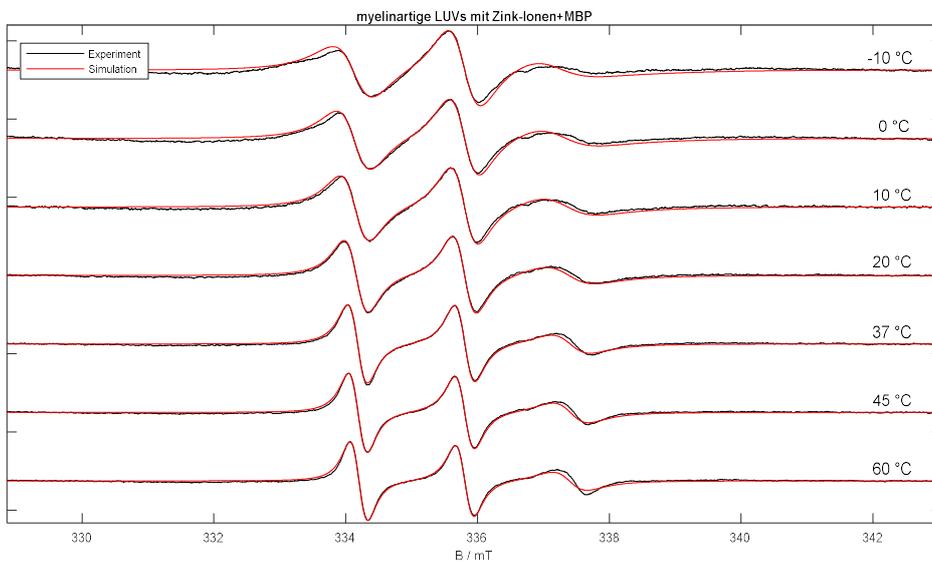
(2)



(3)



(4)



(Abbildung wird auf der nächsten Seite fortgesetzt.)

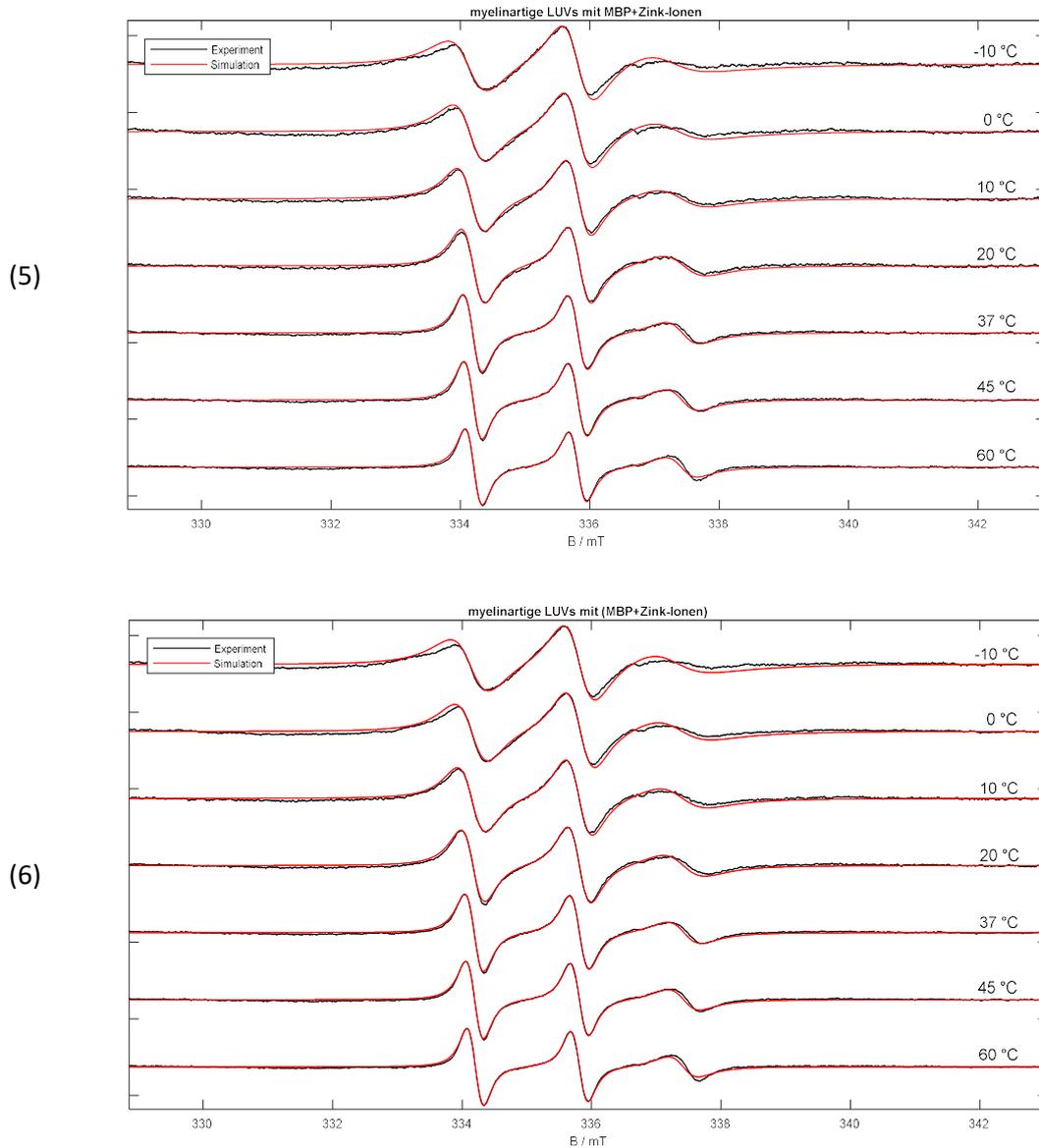


Abbildung A22b: Temperaturabhängige Simulationen von normierten X-Band-cw-EPR-Spektren von myelinartigen LUVs mit 25 μM TempoPC in einem HEPES-NaCl-Puffer (1) ohne Zusatz, (2) mit MBP, (3) mit Zink-Ionen, (4) mit Zink-Ionen und MBP, (5) mit MBP und Zink-Ionen, (6) mit (MBP+Zink-Ionen). Die Konzentration an Zink-Ionen betrug 50 μM und es wurde ein Lipid/Protein-Verhältnis von 567:1 verwendet. Experimentelle (schwarz) und simulierte (rot) Spektren für jede Temperatur.

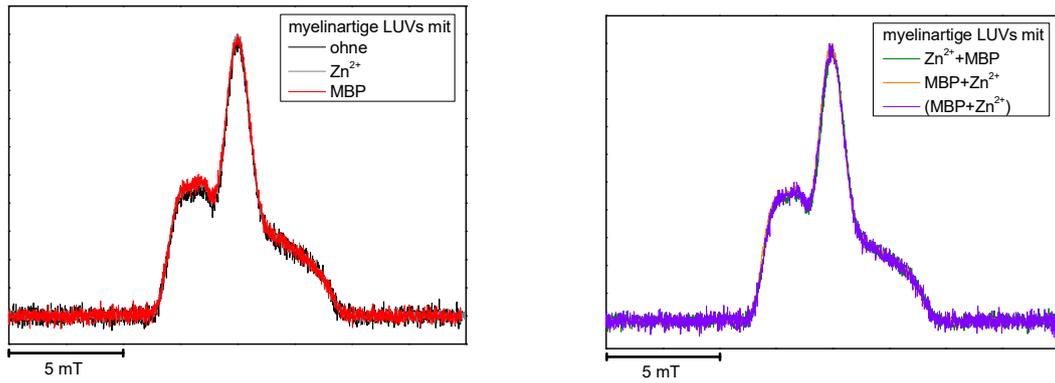


Abbildung A22c: ESE-detektierte EPR-Spektren von TempopC in myelinartigen LUVs in Abhängigkeit des MBP- und Zinkionen-Gehalts (und Reihenfolge der Zugabe) in einem HEPES-NaCl-Puffer bei 50 K (Lipid/Protein-Verhältnis 567:1). Die Spektren wurden auf eine gleiche Amplitude normiert.

Publikationen

1. Cerajewski, U., Träger, J., Henkel, S., Roos, A.H., Brehm, M., Hinderberger, D. Nanoscopic structures and molecular interactions leading to a dystectic and two eutectic points in [EMIm][Cl]/urea mixtures. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**, 20, 29591-29600. <https://doi.org/10.1039/C8CP04912B>.
2. 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, 6095–6108. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00321>.
3. 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. <https://doi.org/10.3390/cells9030529>.

Lebenslauf

Bisherige Ausbildung

Seit Mai 2017	Promotionsstudent an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Forschungsgruppe von Prof. Hinderberger im Bereich der physikalischen Chemie
Okt. 2014-2016	Masterstudium Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Abschluss: Master of Science
Okt. 2011-Sept. 2014	Bachelorstudium Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Abschluss: Bachelor of Science
2003-2011	Karl-Theodor-von-Dalberg Gymnasium, Aschaffenburg Allgemeine Hochschulreife

Danksagung

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

Prof. Dariush Hinderberger danke ich für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit mit einem großen Bearbeitungsfreiraum des Themas und die stets hilfreichen Hinweise und Diskussionen. Außerdem bedanke ich mich für die Unterstützung meine Forschung auf Konferenzen präsentieren und Fortbildungen wahrnehmen zu können.

Des Weiteren gilt mein Dank Prof. George Harauz für die allzeit hilfreiche Unterstützung bezüglich der MBP-Forschung.

Für die Förderung des Projektes und ihre finanzielle Unterstützung von Anfang bis Ende danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG).

Privatdozentin Dr. Annette Meister und Dr. Gerd Hause danke ich sehr, sowohl für die Einblicke in die Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie als auch für die Präparation und Messung aller meiner TEM-Proben.

Besonders möchte ich mich auch bei Dr. Andreas Kerth bedanken für das geweckte Interesse im Gebiet der biophysikalischen Chemie, die Einarbeitung in die Filmwaagen-Technik und die stete Unterstützung seit meiner Bachelorarbeit. Bei Katharina Laaß möchte ich mich für die Einarbeitung in das MBP-Projekt bedanken.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Hinderberger danke ich herzlich für die Einarbeitung in diverse Messtechniken und deren Datenanalyse, die wissenschaftlichen und persönlichen Diskussionen, das super Arbeitsklima und die erheiternden, köstlichen Kaffee-/Kuchenrunden.

Speziell bei meinen Freunden bedanke ich mich für ein immer offenes Ohr, die moralische Unterstützung und die kleinen/großen Ablenkungen.

Der größte Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich uneingeschränkt in jeder Lebenslage unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die 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),

Jennica Träger