

Antibiotische Peptide in Phospholipiden: Strukturuntersuchungen mit Beugungsmethoden

Dissertation der Fakultät für Physik
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Christian Münster
aus Berchtesgaden/Oberau

München, den 22.05.2000

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Peisl
2. Gutachter: Prof. Dr. H.E. Gaub
Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2000

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Einleitung	7
1 Lipide	8
1.1 biologische Membrane	8
1.1.1 Bedeutung biologischer Membrane	8
1.1.2 Aufbau der Lipiddoppelschicht	9
1.2 Multilamellare Lipidmembrane als smektische Phasen	13
1.3 Wechselwirkungen zwischen Membranen	15
2 Peptide	19
2.1 Grundaufbau der Peptide	19
2.2 Allgemeine Bedeutung in der Natur	21
2.3 Peptide als Antibiotika	21
2.4 Magainin	22
2.4.1 Struktur von Magainin	23
2.4.2 Wechselwirkungsmechanismen von Magainin	24
2.5 Energiebetrachtungen der Membran-Peptid Wechselwirkung	29
3 Untersuchungsmethoden	34
3.1 Streugeometrie	35
3.2 Meßaufbau für Streumessungen	39
3.3 Strukturfaktor	40
3.3.1 Statistische Beschreibung einer selbstaffinen rauhen Grenzfläche	40
3.3.2 Strukturfaktor der diffusen Streuung	41
3.4 AFM	43

4	Probenpräparation	47
4.1	Probenpräparation	47
4.2	Probenumgebung	49
5	Auswertungen	51
5.1	Diffuse Neutronenstreuung an reinen Lipiden	51
5.2	Erweiterung auf Lipid/Peptidsysteme	58
5.3	Beugung unter streifendem Einfall an reinen Lipidsystemen	61
5.4	Beugung unter streifendem Einfall an Lipid/Peptid- systemen	66
5.5	Strukturfaktorberechnungen einer Helix	68
5.6	Abschätzung des kritischen Verzerrungsfeldradius	69
5.7	Reflektivitätsmessungen	73
5.8	Streuung an Membrandefekten	79
	Literaturverzeichnis	83

Zusammenfassung

Diese Arbeit zeigt, daß sich zur Untersuchung der strukturellen Eigenschaften von Lipid- und Lipid/Peptid-Systemem hochorientierte multilamellare Proben weitaus besser eignen als „Pulverproben“. Standardstreuverfahren der Festkörperphysik, darunter die Beugung unter streifenden Winkeln (GID) oder die spekuläre Reflexion unter streifenden Winkeln, wurden zum Teil erstmals auf multilamellare Membranstapel angewendet. Weiterhin wurde mit einem neuen Meßkonzept, der diffusen (nichtspekulären) Neutronenbeugung, eine Methode vorgestellt, die einen weiten lateralen Impulsübertragsbereich mit hoher Auflösung verbindet. Strahlenschäden an den Proben treten bei Neutronenbeugung generell nicht auf. Bei Röntgenbeugung wurde dies durch die Wahl hochenergetischer Röntgenstrahlung (20keV) erreicht.

Die Probenpräparation der hochorientierten, multilamellaren Systeme konnte reproduzierbar verbessert werden. Die Fehlorientierung (Mosaizität) der Schichten ist mit 0.01° meist an der Auflösungsgrenze der Experimente. Für detaillierte Strukturbestimmungen in der biologisch relevanten L_α -Phase waren eine stabile Temperierung ($\Delta T \leq 0.01^\circ C$) und eine vollständig gesättigte Wasserdampfatosphäre unerlässlich. Zu diesem Zweck wurde eine doppelwandige Probenmeßkammer konstruiert.

Die gewonnenen Daten zeigen, daß das von Caille vorgeschlagene Modell einer divergierenden Höhen-Höhen-Selbstkorrelationsfunktion nicht auf hochorientierte, multilamellare Membranstapel anwendbar ist. Der Einfluß von (zwangsläufig vorhandenen) Membrandefekten spielt eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Darüberhinaus unterscheiden sich partiell und vollständig hydratisierte Proben deutlich bei kleinen lateralen Impulsüberträgen.

An partiell hydratisierten Systemen aus Lipid/Peptidmischungen konnte gezeigt werden, daß das antibiotische Peptid Magainin2 einen starken Einfluß auf die multilamellare Ordnung des Systems ausübt. Die Wechselwirkung von Magainin2 mit den Lipiden erfolgt kollektiv. Jedes Peptid stört in einem kritischen Mindestdurchmesser von ca. 80 \AA die Ketten-Ketten-Korrelation der Lipide. Dabei wird die Membran destabilisiert. Anhand rechnergestützter Simulationen konnten Streubilder verstanden und damit der (kontrovers diskutierte) Phasenübergang im Bindungszustand von Magainin2 beobachtet werden. Bei hohen Konzentrationen geht Magainin, das sich zunächst parallel an die Lipidoberfläche anlagert, oder besser in ihr versinkt, zumindest in einer Minderpopulation in einen transmembranen Bindungszustand über. Es sei hier aber ausdrücklich betont, daß dieser transmembrane Zustand, der höchstwahrscheinlich durch oligomere Porenbildung realisiert wird, nicht mit einer Korrelation dieser Poren einhergeht, wie in der Literatur behauptet wird. Das unserer Meinung nach

fehlinterpretierte Streusignal konnte vielmehr multilamellaren Membrandefekten zugeordnet werden.

Die Verwendung von Hochorientierung bei gleichzeitiger Anwendung von weitentwickelten Streumethoden an Synchrotronstrahlungsquellen kann als zukunftsweisendes Konzept für die Erforschung von Membranproteinen dienen. Viele Membranproteine lassen sich nämlich bisher nicht oder nur unter großem Aufwand (Mikrogravitation) kristallisieren. Wenn es gelingt, eine definierte Zahl von Membranen auf Festkörperoberflächen zu präparieren und mit einer Deckschicht (caplayer) abzuschließen, dann können zukünftige Untersuchungen bei Anregung von Wellenleitermoden, unter Ausnutzung eines verbesserten Signal zu Untergrundverhältnisses, erfolgen.

Einleitung

Lebende Organismen unterscheiden sich auf molekularer Ebene sehr wenig.

Es ist daher schwer, unspezifisch wirksame Substanzen zu finden, die für ‚Angreifer‘ letal wirken und für die Wirtsorganismen zumindest nicht überaus schädlich sind. Antibiotika sind solche Medikamente, die selektiv Bakterien oder Viren angreifen, aber den Wirtsorganismus weitgehend verschonen. Penicillin ist z.B. einer dieser Stoffe. Durch den mittlerweile weltweit verbreiteten Einsatz werden aber immer mehr Bakterienstämme gegen Antibiotika resistent (siehe z.B. Science 264 (1994) 359-393). Der Wettlauf zwischen neuen Wirkstoffen und den resistenten Keimen wird immer schneller. Hinter dieser Entwicklung verbirgt sich ein enormes Gefahrenpotential, zu dessen Eindämmung breite, interdisziplinäre Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet nötig sind.

Die Entdeckung einer Fülle von natürlich vorkommenden antibiotischen Peptiden eröffnet Auswege aus dieser Krise. Antibiotische Peptide wirken selektiv. Prokaryotische Zellen werden zerstört, eukaryotische Wirtszellen hingegen bleiben verschont. Die entscheidende Frage an dieser Stelle ist demnach: Durch welche molekularen Wechselwirkungsmechanismen entfalten antibiotische Peptide diese selektive Wirkung?

In dieser Arbeit wird das antibiotische Peptid Magainin aus der Haut des südafrikanischen Klauenfrosches *Xenopus laevis* vorgestellt. Dessen bakterientötende, fungizide und virulente Wirkung ist nicht an spezielle Proteinwechselwirkungen geknüpft. Physikalische Gesichtspunkte, wie etwa Elastizitätseigenschaften, sterische Wechselwirkungen oder auch elektrostatische Eigenschaften treten in den Vordergrund. Als ein Ergebnis dieser Arbeit zeigt sich zum Beispiel, daß sich Magainin2 an einer Stelle der Membran anlagert und dabei ein weitreichendes Verzerrungsfeld auf nanoskopischer Skala erzeugt.

Zur Klärung grundlegender, struktureller Fragen werden Neutronen- und Röntgenstreuungsmethoden erweitert und auf ein Modellsystem aus Dimyristoylglycerophosphatidylcholine (DMPC) und Magainin2 angewendet. Es wird gezeigt, daß sie sich in besonderer Weise für die Untersuchung dieser überaus weichen Systeme unter biologisch relevanten Bedingungen eignen.

Kapitel 1

Lipide

1.1 biologische Membrane

In diesem Kapitel werden die biologische Relevanz, der Aufbau und die Eigenschaften von Membranen erläutert. Dazu gibt es eine Vielzahl reich bebildeter Lehrbücher der Molekularbiologie (Lodish 1995 [Lod 95], Stryer [Stry 75]). Die physikalische Chemie biologischer Makromoleküle (Sun 1994 [Sun 94]) und die Biophysik von Membranen (Merz und Roux 1995 [Mrz 96]) ist ebenfalls auf Lehrbuchebeane in den letzten Jahren dargestellt worden. Dieses Kapitel greift daher nur einige wichtige Aspekte heraus und liefert im wesentlichen einige Elemente und Definitionen, die von allgemeinem Interesse, aber auch für das spätere Verständnis in der Arbeit wichtig sind. An dieser Stelle sei auch auf die beiden umfaßenden Werke von Cevc [Cevc 1, Cevc 2] verwiesen.

1.1.1 Bedeutung biologischer Membrane

Membrane sind der Hauptbestandteil einer jeden Zelle. Jede Zelle ist von einer Membran umgeben. Zellmembrane dienen der Abgrenzung des inneren Cytosols gegen die extrazelluläre Umwelt. Ohne Membrane würden Zellen zerfließen und informationstragende Moleküle würden verlorengehen. Die meisten Zellen verfügen zusätzlich über umfangreiche intrazelluläre Membransysteme. Sie grenzen Kompartimente, das sind klar voneinander getrennte Reaktionsräume mit ihren charakteristischen Unterschieden (chemisches Potential, elektrisches Potential, osmotischer Druck) voneinander ab. Innerhalb einer Eukaryotenzelle sind dies Organellen wie Mitochondrien, Chloroplasten, Golgi-Apparat, Lysome oder Endoplasmatisches Retikulum, die gegen das sie umgebende Cytosol abgegrenzt werden. Ohne Trennung in Kompartimente wäre das thermodynamische Gleichgewicht das sichere Ende der zahlreichen Stoffwechselprozesse. Die Einzigartigkeit des Lebens auf der Erde ist also eng mit der Existenz von Membranen verknüpft.

Biologische Membrane sind hauptsächlich aus einer Vielzahl verschiedener Lipide und Proteine zusammengesetzt. Die Membranproteine sind regelrecht in die Membran eingebettet (Flüssig-Mosaik Modell - Singer und Nicolson 1972).

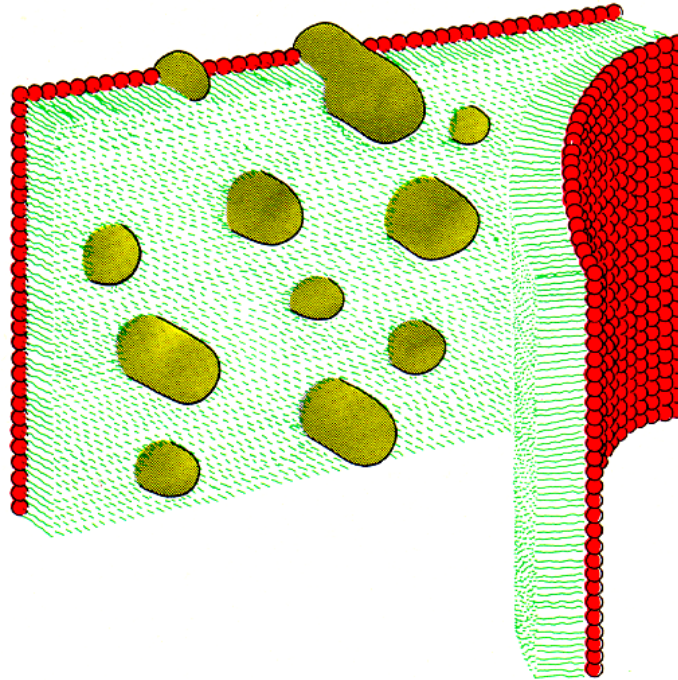


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einer biologischen Membran [Stry 75] nach dem Flüssig-Mosaik Modell von (Singer und Nicolson 1972). Zwischen die Lipide sind die Membranproteine eingebettet

Über diese integralen Membranproteine kann die Zelle aktiv mit der Umwelt wechselwirken. Die biologische Kommunikation, sei es durch Reizempfang von außen oder durch Signalerzeugung, wird über spezialisierte Proteine in der Membranen erreicht. Darüberhinaus sind Membranen für Ionen und andere Moleküle keine unüberwindbaren Schranken, vielmehr handelt es sich um eine selektive Permeabilitätsschranke. Wiederum durch die Aktivität von spezialisierten Membranproteinen wird die intrazelluläre Molekül- und Ionenzusammensetzung reguliert. Molekulare Pumpen in Membranen dienen zusätzlich biologischen Energiegewinnungsprozessen. Die beiden wichtigsten sind die oxidative Phosphorylierung (ATP-Synthese) und die Photosynthese.

1.1.2 Aufbau der Lipiddoppelschicht

Trotz der Diversifizierung und Funktionalisierung biologischer Zellmembrane besitzen diese alle ein universelles Grundmotiv, nämlich die Lipid-Doppelschicht. Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit Kontrastierung ist diese als Doppelschicht mit einem dazwischenliegenden hellen Streifen zu erkennen.

Diese Doppelschichtstruktur bildet sich als direkte Folge der Amphiphilität der am Aufbau beteiligten Lipidmoleküle. Lipide sind, wie andere biologische Makromoleküle auch, zur Selbstorganisation fähig¹. Oberhalb einer kritischen Mizellenkonzentration (eng. *critical*

¹Unter Selbstorganisation „*self-assembly*“ versteht man das Ausbilden supramolekularer Strukturen

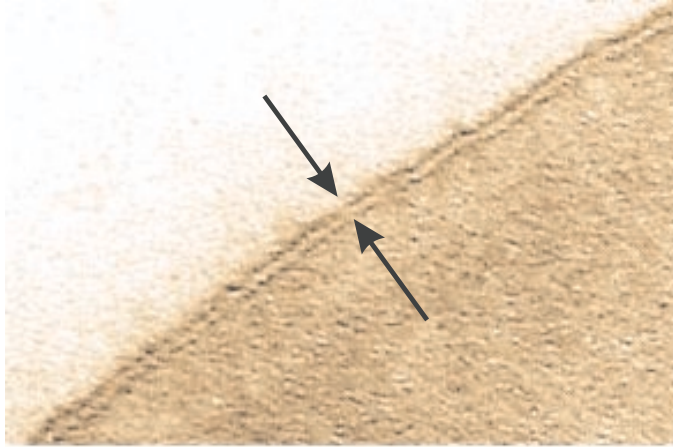


Abbildung 1.2: Elektronenmikroskopisches Bild einer Erythrozytenmembran. Mit dem Einsatz von elektronendichtem kontrastierendem Material, das sich sowohl von innen als auch von außen an die Membran anlagert, erscheint die Zellmembran als Doppelschicht. (J.D. Robertson, Duke University, Durham).

micelle concentration, CMC) ordnen sie sich in wässriger Lösung spontan in gleicher Orientierung nebeneinander und bilden Aggregate [Sil 85]. Für zweikettige Phospholipide ist die CMC sehr klein ($\approx 10^{-10}$), einkettige Tenside besitzen meist eine wesentlich größere CMC (Detergenzien bis zu $\text{CMC} \approx 10^{-2}$). Die treibende Kraft ist immer der hydrophobe Effekt, also das Bestreben der Lipidmoleküle die hydrophoben Ketten vor Wassermolekülen zu schützen und gleichzeitig der hydrophilen Kopfgruppe maximalen Kontakt mit Wasser zu ermöglichen. Die hydrophobe Energie ist direkt proportional zu der Fläche des Kohlenwasserstoff-Wasser Kontakts, ca. $10,5 \text{ kJ/mol} \cdot \text{nm}^2$ [Sil 85]. Nach dem Massenwirkungsgesetz läßt sich die relative Häufigkeit von Aggregaten der Aggregationszahl N als Funktion der Freien Energie pro Molekül $\mu(N)$ schreiben. Die Aggregation der Lipide wird also im wesentlichen von der Abhängigkeit $\mu(N)$ von der Gesamtkonzentration und der Temperatur bestimmt.

Die mikroskopische Physik geht dabei nur in $\mu(N)$ ein. Hier sind es geometrische Packungseffekte, die die Größen und Formen der Aggregate bestimmen (und damit auch die $\mu(N)$). Man kann dabei einen Packungsparameter aus dem Verhältnis zwischen dem Volumen der Fettsäureketten und dem Produkt aus Kettenlänge und Kopfgruppenfläche definieren.

Auf Grund der geometrischen Randbedingungen bilden sich für verschiedene Werte des Packungsparameters bevorzugt ganz bestimmte mesoskopische Aggregate mit verschiedener spontaner Krümmung, z.B. Mizellen, inverse Mizellen, kolumnare Phasen oder planare Doppelschichten [Isra 95]. Die Grundzüge der Aggregatbildung lassen sich also bereits durch sehr einfache Modelle verstehen [Sil 85]. Dieser sogenannte Polymorphismus der Lipide oder allgemein amphiphiler Moleküle, also die Tendenz in verschiedensten supramolekularen Aggregaten aufzutreten, ist mit den entsprechenden Phasendiagrammen und Phasenübergängen experimentell und theoretisch seit einigen Jahren Ziel intensiver Forschung.

durch verschiedene zwischenmolekulare Kräfte, im Gegensatz zu einem stückweisen Aufbau durch einen enzymatischen Prozeß oder durch eine vom Menschen entwickelte Mikrotechnik.

Um aber schon relativ einfache Phasendiagramme, wie das von 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DMPC) in Abbildung 1.3 quantitativ zu beschreiben, sind komplexere analytische und numerische Methoden der statistischen Physik erforderlich (z.B. Gompper und Schick 1994).

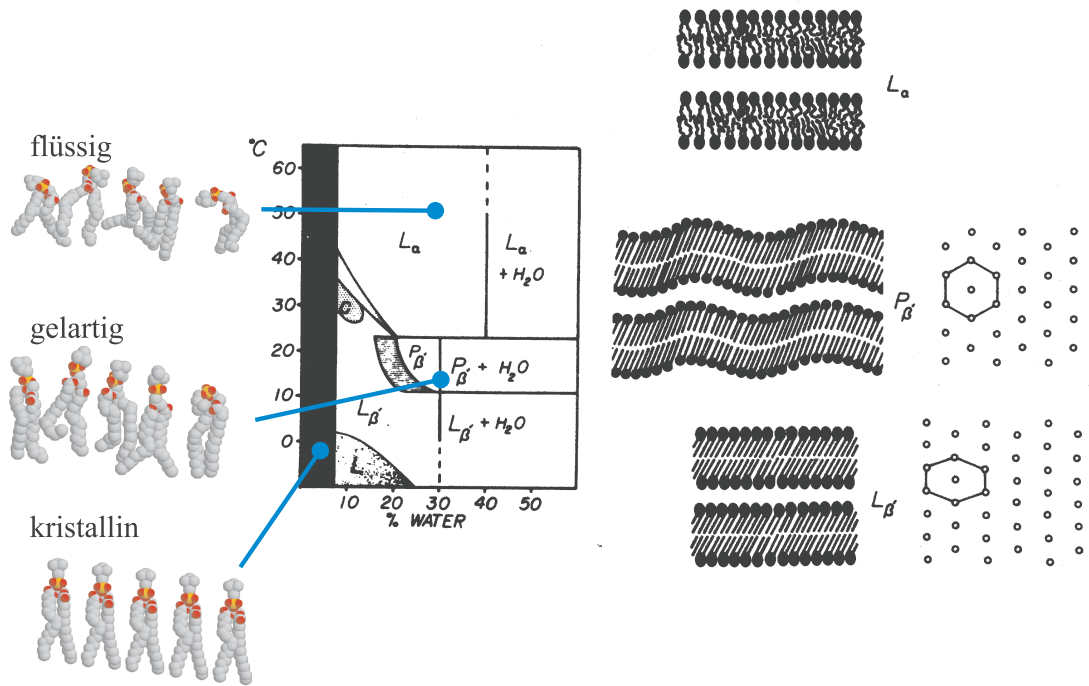


Abbildung 1.3: Phasendiagramm von 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DMPC) [Cevc 1]. Daneben sind drei typische Kettenkonformationen (POPC) aus Molekulardynamiksimulationen als Kalottenmodell dargestellt [Hel 93]. Die Darstellung der kristallinen Phase wurde wegen ihrer Ähnlichkeit zu kleinen Männchen mit Bäckerkmützen mit ‚the five bakers‘ betitelt.

Neben grundsätzlichen Fragestellungen treten in jüngerer Zeit auch vermehrt anwendungsorientierte Gesichtspunkte auf, z.B. in Bezug auf die Synthese organisch-anorganischer Kompositmaterialien, der Nutzung von Tensidphasen als Template (engl. *templating*) für die Mineralisation, oder für die Formulierung von Systemen zur intelligenten Verabreichung von Medikamenten (engl. *drug delivery*).

Darüberhinaus werden Lipidmembrane als wichtige Modellsysteme für die wesentlich komplexeren biologischen Membrane und als interessante, selbstorganisierte Materialien seit vielen Jahren intensiv erforscht. Dementsprechend detailliert ist heute unsere Kenntnis der molekularen Struktur, der Phasenübergänge, der Elastizitätseigenschaften, der Dynamik von Lipidmolekülen in der Membran und der mesoskopischen Selbstorganisation in wässrigen Lipidlösungen (Cevc und Marsh 1987, Cevc 1993). Nicht zuletzt hat die Forschung in den letzten Jahren von den Fortschritten in der Synthese von naturidentischen Lipidmolekülen profitiert, die heute in einer großen Zahl systematisch variiertes Kettenlängen und Kopfgruppen dargestellt werden.

Neben den Glykolipiden und Cholesterolen stellen Phospholipide die vorherrschende Molekülklasse dar. Der gemeinsame Aufbau von Phospholipiden besteht in einem Glycerolrückgrat an das jeweils durch Veresterung einerseits eine Phosphatkopfgruppe mit angehängtem Rest R (Cholin, Serin, etc.) und andererseits zwei Fettsäurereste gebunden sind. Diese Koh-

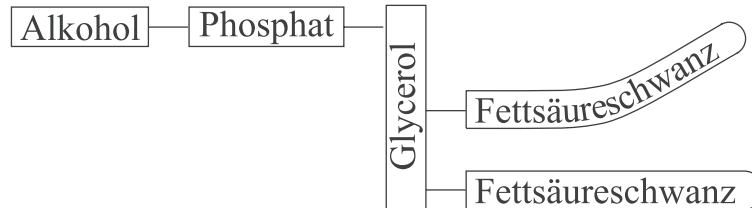


Abbildung 1.4: Schematischer Aufbau eines Phospholipid-Moleküls.

lenwasserstoffketten werden nach Kettenlänge und Zahl der gesättigten bzw. ungesättigten Bindungen durch eine systematische Nomenklatur klassifiziert (Alkylketten, die Kohlenstoffdoppelbindungen enthalten, bezeichnet man als ungesättigt). Physikalische Eigenschaften (wie z.B. Schmelzpunkt, Löslichkeit, Biegesteifigkeit,..) werden stark von der Kettenlänge und Zahl der Doppelbindungen in den Fettsäureresten bestimmt. Der polare Teil der Strukturlipide tritt ebenfalls in einer Vielzahl chemischer Gruppen auf, darunter ungeladene, zwitterionische, anionische und kationische Vertreter. Lipide können heute in hoher Reinheit und in großen Mengen naturidentisch und darüber hinaus auch *de novo* synthetisiert werden. In der nachfolgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Lipide (Avanti Lipids, Al. USA) aufgeführt.

Abkürzung	Name	R1	R2	Ladung
DLPC	Dilaureoyl-Glycero-Phosphatidylcholin	12:0	12:0	0
DMPC	Dimyristoyl-Glycero-Phosphatidylcholin	14:0	14:0	0
POPC	Palmitoyl-Oleoyl-Glycero-Phosphatidylcholin	16:0	18:1	0
DOPC	Dioleoyl-Glycero-Phosphatidylcholin	18:1	18:1	0
DMPG	Dimyristoyl-Glycero-Phosphatidylglycerol	14:0	14:0	-1
POPS	Palmitoyl-Oleoyl-Dimyristol-Glycero-Phosphoserin	16:0	18:1	-1

Tab. 1.1: Bezeichnungen (verkürzt) der hier verwendeten Lipide mit Kettenlänge und Nettoladung.

1.2 Multilamellare Lipidmembrane als smektische Phasen

Zur einfachen Beschreibung multilamellarer Membranstapel nimmt man in zwei Dimensionen homogene und isotrope Schichten an. Die Symmetrie senkrecht zu den Schichten ist gebrochen. Damit hat man weder eine Flüssigkeit, für die Invarianz gegenüber allen Rotationen und Translationen gefordert ist, aber auch keinen kristallinen Festkörper, weil die Invarianz gegenüber sämtlichen Symmetriegruppen fehlt. Man spricht von einem Flüssigkristall. In der biologisch relevanten, flüssigen Phase, der sogenannten L_α -Phase, sind die Lipidmoleküle lateral durch eine hohe Diffusionskonstante und durch eine lediglich kurzreichweitige Ordnung gekennzeichnet. Durch die laterale Mobilität verschwindet die Scherelastizität; es fehlen Rückstellkräfte. Dagegen ist die Biegeelastizität für die Konformation von Membranen wesentlich [Helf 73]. Eine gute Darstellung der Elastizität und statistischen Physik von Membranstapeln auf Lehrbuchebeine findet sich z.B. in [Saf 94]. Hier wird im Groben der zusammenfassenden Darstellung von Salditt [Salditt 99H] gefolgt.

Die Freie Energie pro Flächenelement einer Membran läßt sich in einer Entwicklung bis zur zweiten Ordnung der Krümmung schreiben als

$$f = 2\gamma + 0.5\kappa_s(A - A_o)^2/A_o^2 + 2\kappa(M - M_o) + \bar{\kappa}G . \quad (1.1)$$

Die mittlere Fläche pro Kopfgruppe A_o stellt sich nun so ein, daß f minimiert wird und damit der erste Term $\gamma := \partial_A f \simeq 0$ effektiv wegfällt. Die Kompressibilität der Lipide innerhalb der Membran ist mit typischerweise $\kappa_s \simeq 0.3k_B T/\text{\AA}^2$ so groß, daß der zweite Term ebenfalls vernachlässigbar ist. So bleiben die Terme der mittleren Krümmung $M = 0.5(1/R_1 + 1/R_2)$ und der Gaußschen Krümmung $G = 1/(R_1 R_2)$ mit den Hauptkrümmungsradien R_1 und R_2 . Die entsprechenden Koeffizienten κ und $\bar{\kappa}$ lassen sich wiederum aus dem molekularen Aufbau der Lipiddoppelschicht herleiten [Szl 88]. Für eine Membran der hydrophoben Kettenlänge δ_o und der mittleren Flächen pro Kopfgruppe A_o erhält man

$$\kappa \propto \frac{l_o^3}{A_o^5} , \quad (1.2)$$

plus einem elektrostatischen Anteil im Fall von geladenen Membranen [Gut 93]. Das Konzept der Biegeelastizität ist in den letzten Jahren durch quantitative Experimente an Membranen [Saf 89] und Vesikeln [Eva 91, Rad 95, Dob 95] experimentell gut bestätigt.

Nun verschwindet nach den Theorem von Gauß und Bonnet das Integral über jede geschlossene Oberfläche vom Genus 0, so daß man für Membrane ohne Ränder und Poren eigentlich nur den letzten Term von Gleichung 1.1 berücksichtigen muß. In der Regel bilden sich jedoch keine isolierten Lipiddoppelschichten. Vielmehr sind multilamellare Phasen lokal paralleler Membranen die thermodynamische stabile Phase, wenn die spontane Krümmung $M_o \simeq 0$ verschwindet, was bei symmetrischen Lipiddoppelschichten der Fall sein muß. Der Gleich-

gewichtsabstand d zwischen den Membranen ist dabei aus dem Gleichgewicht repulsiver und attraktiver Kräfte gegeben (siehe nächstes Kapitel). Thermische Fluktuationen führen im Stapel nun neben den Krümmungsmoden auch zu Dichteschwankungen, also zu lokaler Kompression und Dekompression durch Schwankungen des Membranabstandes.

In Analogie zum dreidimensionalen smektischen Flüssigkristall läßt sich dann in der sogenannten Monge-Darstellung im lokalen Koordinatensystem das linearisierte Freie Energie Funktional in Kontinuumstheorie schreiben als (siehe z.B. Chandrasekhar 1992 [Chan 92], de Gennes und Prost 1993 [Gen 93])

$$H/V = \frac{1}{2} B \left(\frac{\partial u}{\partial z} \right)^2 + \frac{1}{2} K (\nabla_{xy}^2 u)^2 \quad (1.3)$$

wobei $u(x, y, z)$ im lokalen Koordinatensystem die Auslenkung gegenüber dem eindimensionalen Gitter des perfekten Stapels bezeichnet. Im Kompressionsmodul $B[J/cm^3]$ und Biegemodul $K[J/cm]$ sind die elastischen Eigenschaften enthalten. Sie bestimmen als Koeffizienten die thermischen Anregungen von Dichte- bzw. Krümmungsfuktuationen. K ist proportional zur Biegesteifigkeit κ einer einzelnen Membran $K = \kappa/d$ mit der lamellaren Periode d als Proportionalitätsfaktor. In der xy -Ebene ist die Membran isotrop, so daß gilt $u(x, y, z) = u(r, z)$ mit $r := \sqrt{x^2 + y^2}$. Im Fourierraum lautet das entsprechende Funktional

$$F = \frac{1}{2} (Bq_{\parallel}^2 + Kq_x^4) u^2(\mathbf{q}) , \quad (1.4)$$

mit $q_{\parallel} := \sqrt{q_x^2 + q_y^2}$.

Eine Störung des smektischen Systems z.B. durch die statische Korrugation einer Schicht, also eine lokal entstandene Krümmung, kann nur durch Kompression des Stapels relaxiert werden, was zu einem relativ stark ausgedehnten Verzerrungsfeld um die Störung führt. Schreibt man die Störung als

$$u = u_o \exp(-z/\zeta) \cos(q_{\parallel} x) , \quad (1.5)$$

so ergibt das Einsetzen das Freie-Energie-Funktional Gl.1.3 eine Dämpfungslänge

$$\zeta = (\lambda q_{\parallel}^2)^{-1} , \quad (1.6)$$

mit $\lambda := \sqrt{K/B}$. Analog werden die Auslenkungen thermischer Anregungen relaxiert. Nach Anwendung des Gleichverteilungssatzes auf Gl. 1.4 bekommt man für das mittlere Auslenkungsquadrat $\langle u^2 \rangle$

$$\begin{aligned}
\langle u^2 \rangle &= \frac{kT}{(2\pi)^2} \int_{-q_o}^{q_o} dq_z \, 2 \int_{q_{min}}^{q_{max}} dq_{||} \, q_{||} (Bq_z^2 + Kq_{||}^4)^{-1} \\
&= \frac{k_B T}{4\pi \sqrt{BK} q_{min}} \ln[q_{max}L/(2\pi)] .
\end{aligned} \tag{1.7}$$

Aus dem Gleichverteilungssatz berechnet man für das lineare Funktional auch leicht die vollständige Korrelationsfunktion $g(r, z) := \langle \exp(iq_o[u(r, z) - u(0, 0)]) \rangle$, siehe z.B. (Als-Nielsen et al. 1980 [Als 80])

$$g(r, z) = \exp \left[-2\eta\gamma(4d^2/r^2)^\eta E_1 \left(r^2/(4\lambda z) \right) \right] , \tag{1.8}$$

mit den Konstanten $\lambda := \sqrt{K/B}$, und $\eta := kTq_o^2/(8\pi B\lambda)$, der Eulerzahl γ und der Exponentialintegralfunktion $E_1(z)$ (Gradshteyn und Ryzhik 1980 [Gra 80]).

1.3 Wechselwirkungen zwischen Membranen

Bisher wurde stillschweigend vorausgesetzt, daß sich gewisse Lipidmembrane in Kontakt mit Wasser zu Stapeln anordnen. Nun sollen die relevanten Wechselwirkungen vorgestellt werden, die erst zu deren Ausbildung führen und den Gleichgewichtsabstand $d = \delta_w + \delta_m$ bestimmen².

Als einzige attraktive Kraft gibt es die van-der-Waals-Kraft. Durch thermische Fluktuationen kommt es zu inhomogenen Ladungsverteilungen, die wiederum Ladungsverteilungen induzieren, so daß letztlich eine Anziehung resultiert. Die van-der-Waals-Wechselwirkung ist als frequenzabhängige Wechselwirkung im allgemeinen nicht additiv und zeigt Redardierungseffekte (Mahanty und Ninham 1976 [Mah 76]). Für kleine Abstände lassen sich jedoch näherungsweise nicht-retardierte paarweise Beiträge zur Freien Energie pro Flächenelement aufsummieren, und zwar im Fall von zwei planaren Lipiddoppelschichten zu [Fen 95]

$$f_{vdW} = -\frac{A}{12\pi} \cdot \left(\frac{1}{\delta_m^2} + \frac{1}{(\delta_m - 2\delta_w)^2} - \frac{2}{(\delta_m + \delta_w)^2} \right) , \tag{1.9}$$

Hierin ist δ_m die Membrandicke, $\delta_w := d - \delta_m$ die Dicke der Wasserschicht und $A = (\epsilon_w - \epsilon_m)^2/(\epsilon_w + \epsilon_m)^2 kT$ die sogenannte Hamakerkonstante³.

Der Ausdruck verhält sich für kleines δ proportional zu $1/\delta^2$ und für großes δ proportional zu $1/\delta^4$. Für große Abstände $\delta_w \geq 1\mu m$ dürfen Retardierungseffekte nicht mehr vernachlässigt

² δ_w ist die Dicke der Wasserschicht und δ_m die der Membran.

³Wegen des großen Unterschieds zwischen der Dielektrizitätskonstante von Wasser ϵ_w und Lipid ϵ_m ist sie von der Größenordnung $k_B T$.

werden, damit fällt die Kraft noch schneller, nämlich mit $1/\delta_m^5$ ab.

Die langreichweitige van-der-Waals-Wechselwirkung erstrebt ein vollständiges Verdrängen des Wassers zwischen den Membranen. Gerade dies wird nicht beobachtet. Bei kleinen Abständen dominiert nämlich die repulsive Hydratationswechselwirkung. Deren Ursprung ist bisher noch umstritten. Entropische Effekte in der dünnen Schicht der direkt an die hydrophilen Kopfgruppen der Membran gebundenen Wassermoleküle können ebenso sowie sogenannte Protusionskräfte (engl. *protusion forces*) durch senkrechte Molekülbewegungen der Lipide zu einer freien Energie (pro Flächenelement) führen. Die Hydrationskraft wird empirisch beschrieben wird durch

$$f_{Hyd} = H_o \cdot e^{-\frac{d}{\lambda_h}}. \quad (1.10)$$

$H_o \approx 4k_B T/\text{\AA}^2$ und $\lambda_h \simeq 2\text{\AA}$ sind Konstanten, die aus einer Auftragung des durch Beugung bestimmten Abstands d gegen den osmotischen Druck bestimmt werden können. Bereits die van-der-Waals- und die Hydratationskraft erzeugen für ungeladene Membrane ein Potentialminimum bei Abständen, die gut mit dem Experiment übereinstimmen.

Bei geladenen Lipiden kommen zusätzlich elektrostatische Kräfte hinzu. Zwischen den gleichnamig geladenen parallelen Flächenladungen der Membranen im Abstand δ_w befinden sich die, das Gesamtsystem neutralisierenden, dissoziierten Gegenionen. Die gemeinsame Berücksichtigung von statistischer Physik und Elektrostatik führt auf die Poisson-Boltzmann- Gleichung, die unter den gegebenen Randbedingungen zu lösen ist. In Molekularfeldnäherung und mit der Vereinfachung hoher Flächenladungsdichten und großem Abstand gilt [Lei 87]:

$$f_{el} = \frac{\pi k_B T}{4L_e d} \cdot \left(1 + \frac{e^-}{\Sigma L_e d}\right)^{-1}. \quad (1.11)$$

Für Wasser ist die Bjerruhlänge $L_e \approx 7 \text{\AA}$; Σ ist die Oberflächenladungsdichte der Membranen.

Wie man durch Vergleich mit Gl. 1.9 direkt sieht, dominiert diese abstoßende, langreichweitige Kraft im salzfreien Fall das Bild, so daß geladene Membrane (bei vollständiger Dissoziation hat man typischerweise $\sigma \simeq 0.2C/m^2$) soweit anschwellen, wie das vorhandene Wasser erlaubt. Diese Kraft sorgt zusammen mit der Hydrationskraft für das Verschwinden eines stabilen Gleichgewichtszustandes. Durch Zugabe von Fremdionen (Salz) kann man bewirken, daß die geladenen Lipidkopfgruppen abgeschirmt werden. Wenn die Debye'sche Abschirmlänge $\lambda_D = kT\epsilon_w/(4\pi\sqrt{c})$ kleiner wird als d_w ändert sich das Abstandsgesetz durch Abschirmungseffekte zu

$$f_{el} = \frac{\Sigma^2}{c} \exp(-d_w/l_D), \quad (1.12)$$

wobei c die molare Salzkonzentration bezeichnet⁴.

Die Energie einer durch thermische Fluktuationen verformten isolierten Membran steckt ausschließlich in der Krümmungsenergie. Bei Membranstapeln beschränken nun benachbarte Membrane den Konformationsraum der Membranfluktuationen. Die Fluktuationen tragen also selbst wieder in Abhängigkeit von d zur freien Energie bei. Dies führt im einfachsten Fall in Molekularfeldnäherung zu einer sterischen Repulsionswechselwirkung der Form [Helf 73]

$$f_s = \frac{2\pi^2}{128} \frac{(k_B T)^2}{\kappa} \frac{1}{d^2}, \quad (1.13)$$

wobei der Vorfaktor nicht exakt hergeleitet werden kann. Wichtig ist die Tatsache, daß die Fluktuationen in weichen Membranstapeln und amphiphilen Systemen zu einer langreichweitigen Kraft führen, wenn die laterale Systemgröße divergiert.

Nachdem nun die molekularen Potentiale bekannt sind, läßt sich der Gleichgewichtsabstand d_o durch Ableitung $\partial_d f(d)|_{d=d_o} = 0$ berechnen. Zur Veranschaulichung sind die Graphen der einzelnen Kräfte in Abb. 1.5 auf der nächsten Seite dargestellt. Dabei wurden mit ‚vernünftigen‘ Annahmen der Membrandicke, wie in der Abbildung angegeben, ganz realistische Werte für die Gleichgewichtszustände erhalten. Rein aus der Addition von van-der-Waals und der Hydrationswechselwirkung erhält man eine Periodizitätslänge von 62.45 Å. Die Hinzunahme einer sterischen Repulsionswechselwirkung führt auf 63.85 Å.

In harmonischer Näherung lassen sich dann auch die thermischen Dichtefluktuationen, deren Stärke wie üblich durch die Krümmung $B := \partial_d^2 f(d)|_{d=d_o}$ kontrolliert wird bestimmen. Setzt man nun B in das freie linearisierte Rreie Energie Funktional ein, so können auch die entsprechenden Korrelationsfunktionen berechnet werden.

⁴Für $c = 1 \text{ mol} / \text{l}$ ist $\lambda_D = 3.04 \text{ Å}$.

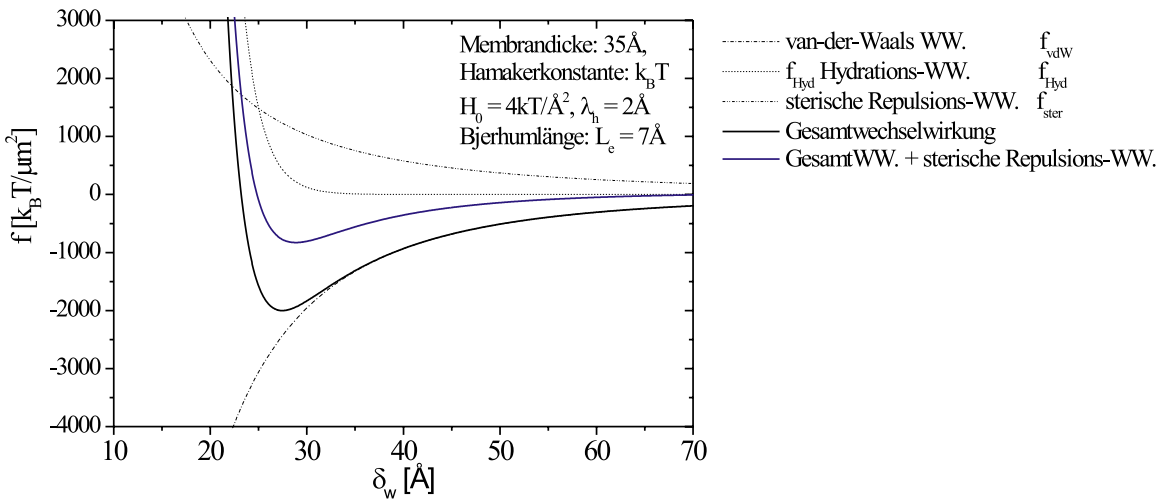


Abbildung 1.5: Potentialminimum durch (a) Überlagerung der molekularen Wechselwirkungen (Hydratisations- und van-der-Waals-Wechselwirkung) bei $\delta_m = 35\text{\AA}$, $l_h = 2\text{\AA}$, $H_o = 4kT$ und $A = kT$ (schwarze durchgezogene Linie) und durch Hinzuaddieren (in Molekularfeldnäherung) der sterischen Abstoßung bei Raumtemperatur (blaue durchgezogene Linie).

Kapitel 2

Peptide

2.1 Grundaufbau der Peptide

Grundlegend sei hier auf die sehr gute Darstellung von H.D. Jakubke [Jak 96] verwiesen. Peptide sind über Peptidbindungen polymerisierte Aminosäurebausteine. Franz HOFMEISTER erkannte das grundlegende Bauprinzip, nämlich die „Verknüpfung durch die Gruppe -CO-NH-CH=“ [F.Hofmeister, Naturw.Rdsch. 17, (1902) 529]. Der Name geht allerdings auf Emil FISCHER zurück [E.Fischer, Ber.dt.chem.Ges. 39 (1906) 530]; er leitet sich aus einer Zusammensetzung der Worte **Peptone**¹ und Polysaccharide² ab.

Die monomeren Grundbausteine der Peptide sind die 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren³. Sie sind durch Amidbindung zwischen der Aminogruppe eines Bausteins mit der Carboxylgruppe des folgenden Bausteins verbunden. Der Aufbau reicht von relativ einfach aufgebauten Dipeptiden bis hin zu supermolekularen Proteinen. Die formale Unterscheidung zwischen Peptiden und Proteinen wählt man heute bei 50 am Aufbau beteiligter Aminosäurebausteine. Es sei an dieser Stelle aber ausdrücklich betont, daß es keine strenge Grenze gibt. Die *Primärstruktur*, also die Anzahl und Abfolge der Aminosäurereste, hat entscheidende Bedeutung für die Spezialisierung eines Peptids. Speziesunterschiedliche Peptide mit gleicher Funktion besitzen homologe Aminosäuresequenzen. So unterscheidet sich z.B. das menschliche Insulin von dem eines Pferdes in nur einer Aminosäure; die Sequenz der übrigen ist aber unverändert.

Durch Wechselwirkung der am Polypeptidrückgrat (*peptide backbone*) gebundenen Aminosäureresiduen mit der Umwelt kommt es zusätzlich zu unterschiedlichen Konformationen. Periodische Kettenformationen, wie Helizes oder Faltblattstrukturen, werden als *Sekundärstruktur* bezeichnet. Die *Tertiärstruktur* umfaßt räumliche Anordnungen von Sekundär-

¹Peptone sind die Spaltprodukte des Proteinabbaus durch Pepsin; griech. *peptos* = verdaut

²Polysaccharide sind ebenfalls aus monomeren Bausteinen aufgebaut

³Der Aufbau der einzelnen Aminosäurebausteine ist, von zwei Ausnahmen (Glycin, Prolin) abgesehen, sehr ähnlich. Sie unterscheiden sich durch den am zentralen Kohlenstoffatom (C^α) substituierten Rest R.

strukturen; sie muß allerdings keine Periodizität der Faltungen aufweisen.

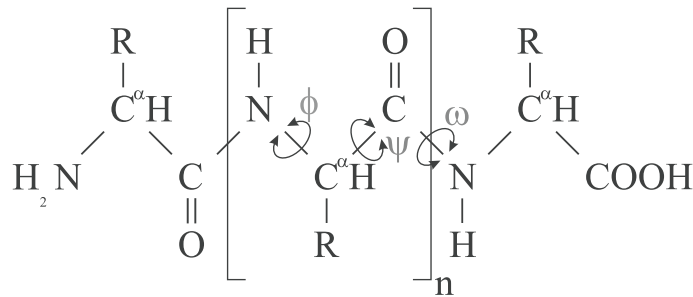


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau einer 3-Polypeptidkette ($n=1$). Um das Zentrale C^α -Atom gibt es zwei mögliche Torsionen (ϕ : Rotation der Stickstoffsäure (NH) um die C^α -Bindung; ψ : Rotation der C^α um die Carbonyl-Carbon-Bindung).

Die Konformation eines Polypeptidrückgates wird durch drei Torsionswinkel beschrieben (siehe Abb. 2.1). Am zentralen Kohlenstoffatom C^α gibt es zwei Einfachbindungen, um die Torsionen möglich sind (ϕ , ψ). Die *trans*-Peptidbindung ($\omega=180^\circ$) ist um ca. 4kcal/mol stabiler als die *cis*-Peptidbindung ($\omega=0^\circ$). Die möglichen Winkeleinstellungen für die zwei übrigen Winkel, ϕ für die Rotation der Amidgruppe (NH) um die C^α -Bindung und ψ für Rotation der Carbonyl-Carbon-Bindung, werden durch die vorhandenen Aminosäureresiduen limitiert. Die Bereiche der günstigsten Winkel wurden von Ramachandran [Ramachandran G.N., Sasi-sekharan V.: Adv. Protein Chem **23**,283 (1968)] für verschiedene Peptidbindungen ermittelt und in sogenannten Ramachandran-Diagrammen dargestellt. Man findet charakteristische, energetisch günstige Struktur motive, die jeweils durch eine ganz bestimmte geometrische Anordnung der Hauptkette, bzw. den entsprechenden Winkelkombinationen erzeugt werden. Die beiden wichtigsten Vertreter sind die β -Faltblattstruktur und die rechtsgängige α -Helix⁴. Die rechtsgängige α -Helix mit $\phi = -57^\circ$ und $\psi = -47^\circ$ ist besonders stabil, da hier Wasserstoffbrücken zwischen dem i^{ten} und $(i + 3)^{ten}$ Element der Kette nahezu spannungsfrei hergestellt werden können. Die Mannigfaltigkeit der Aminosäuresequenzen und deren Konformationsmöglichkeiten erzeugen ein riesiges, schier unvorstellbares Spektrum hochspezifischer Strukturen⁵.

⁴Die linksgängige α -Helix ist im Ramachandran-Diagramm nicht ausgeschlossen. Sie ist aber energetisch ungünstiger als die rechtsgängige und kommt daher nicht vor.

⁵Aus rein kombinatorischer Überlegung erhält man für ein Peptid der Länge n mit jeweils x_i gleichen Aminosäurebausteinen bereits $\prod x_i$ verschiedene Möglichkeiten der Sequenzierung. Hinzukommen noch die Freiheitsgrade in der Peptidkonformation.

2.2 Allgemeine Bedeutung in der Natur

Peptide tragen adressierte biologische Information und erfüllen damit spezielle Aufgaben innerhalb biologischer Prozesse. Einige Wichtige seien kurz genannt⁶:

In Drüsen und speziellen Zellen werden Hormone gebildet. Sie binden an spezifische Rezeptoren der Zielzelle und lösen damit eine zellspezifische Aktivität aus. *Peptidhormone* steuern physiologische Größen wie etwa Blutdruck, Ionen- und Glukosekonzentration und Körpertemperatur. Der weitläufig bekannteste Vertreter dieser Peptidklasse ist hier sicher das Insulin, das eine blutzuckerspiegel-senkende Wirkung ausübt.

Aus der Klasse der *Neuropeptide* legen körpereigene Morphine die Schmerzschwelle fest. Darüber hinaus wirken Neuropeptide in neuronalen und nichtneuronalen Strukturen des zentralen Nervensystems auf den physiologischen Schlaf, zeigen Einfluß auf den Lernprozeß und besitzen physiologisch analgetische Wirkung. *Peptidtoxine* werden auf Grund der niedrigen letalen Dosis (mg/kg Körpergewicht) als solche bezeichnet. Häufig werden Sie wegen ihrer lähmenden und später tödlichen Wirkung von Tieren beim Beutefang eingesetzt. Ebenfalls toxisch sind die sogenannten *Peptidantibiotika*. Es handelt sich hier um Stoffwechselprodukte von Bakterien und Pilzen. Sie hemmen das Wachstum oder die Vermehrung von Mikroorganismen. Das Immunsystem von Wirbeltieren nutzt ebenfalls antibiotische Peptide zur Abwehr körperfremder Mikroorganismen.

2.3 Peptide als Antibiotika

Hier wird der sehr prägnanten Darstellung von J. Blazyk gefolgt⁷. Antibiotika töten Bakterien über einen Zeitraum mehrerer Stunden und Tage. Antibiotische Peptide, wie sie von Tieren und Pflanzen zur Verteidigung ihres Organismus gegen eindringende pathogene Mikroorganismen verwendet werden, töten Eindringlinge innerhalb kürzester Zeit ab. Der Zeitrahmen liegt hier im Bereich weniger Minuten. Damit ist bereits ein wichtiger Aspekt eines antibiotischen Peptids genannt. Die Zeit, die das Peptid zum Wirken braucht sollte deutlich kürzer sein, als die Zellteilungsrate eines typischen Bakteriums (im Fall *Escherichia coli* sind das ca. 20 min). Das Zellinnere ist wegen der schnellen Wirkung als Ziel demnach weniger geeignet, als eine direkte Wechselwirkung mit dem Zelläußeren, also den Lipiden der Zellmembrane. Da Zellmembrane in lebenden Organismen allgegenwärtig sind, also auch in den Wirtszellen, muß das Peptid zwischen Wirts- und Mikrobenzellmembran unterscheiden können. Das Peptid sollte also seine Wirkung auf Moleküle entfalten, die in prokaryotischen Mikrobenzellen allgegenwärtig anzutreffen sind, aber nur selten oder nie in den eukaryotischen Wirtszellen. Denkbar ist eine Unterscheidung über die Lipidzusammensetzung der Zellmembran. Ein

⁶Einen guten Überblick über das weitreichende Gebiet der Peptide liefert das Buch Jakubke H.D., Peptide [Jak 96]

⁷<http://main.chem.ohiou.edu/blazyk/blazyk.html>, 18.01.2000

breites antimikrobielles Spektrum ist die direkte Folge. Es genügt eine einzige Peptidart um eine ganze Palette von Mikroorganismen zu bekämpfen. Außerdem ist keine schnelle Resistenzentwicklung zu erwarten, da die Zusammensetzung der Zellmembran so essentiell ist, daß eine Änderung nicht binnen kurzer Zeit möglich ist. Der Mechanismus von antibiotischen Peptiden funktioniert also grundlegend anders, als bei herkömmlichen Antibiotika⁸.

Es gibt eine ganze Reihe von antimikrobiellen Peptiden. Sie haben verschiedene chemische Sequenzen und Strukturen. Das gemeinsame Strukturmerkmal von membran-lytischen Peptiden ist die Ausbildung einer amphiphatischen Sekundärstruktur (hauptsächlich α -Helix oder β -Faltblatt), mit der sie direkt auf die Zellmembran einwirken. Es soll hier betont werden, daß diese Amphiphilität immer an eine spezielle Sekundärstruktur geknüpft ist. In der folgenden Arbeit wird speziell das antibiotische Peptid Magainin, aus der Klasse der membran-aktiven Peptide, vorgestellt. Das biochemische Verständnis im mikrobiologischen Kontext ist hier weit fortgeschrittener als das biophysikalische Verständnis der zu Grunde liegenden molekularen Strukturen und Wechselwirkungsmechanismen. Ein Schwerpunkt wird auf der Diskussion von Modellvorschlägen zur -bis dato ungeklärten- Wirkungsweise des Peptids liegen.

2.4 Magainin

Magainin1 wird 1987 von Zasloff in den Hautdrüsen und Eingeweiden des südafrikanischen Klauenfrosches *Xenopus laevis* entdeckt [Zas 87]. Dieses Peptid ist ein Bestandteil des Immunsystems. Der Name wurde in Anlehnung an das hebräische Wort für Schutzschild gegeben⁹. Magainine zeigen ein breites Spektrum antibiotischer Aktivitäten sowohl gegen Gram-negative (z.B. E.coli) als auch gegen Gram-positive (z.B. Streptokokken) Bakterien, darüberhinaus auch gegen Pilze und Protozoen. Bei Protozoen verursachen Magainine schon in sehr geringen Konzentrationen eine osmotische Lyse, was möglicherweise auf eine Unterbrechung des Flüssigkeitstransports durch die Zellmembran zurückzuführen ist (Jakubke [Jak 96], Anhang1, Kurzlexikon). Magainin erzeugt einen Ausfluß von intrazellulären K^+ -Ionen. Eine direkte Begleiterscheinung ist die Herabsetzung der Lebensfähigkeit der Zelle. Der eigentliche letale Effekt scheint, nach vorausgegangener Auflösung der äußeren Membran, die Depolarisierung der inneren Membran zu sein [Mats 97/1, Jur 89, Oht 92].

Darüberhinaus repräsentieren Magainine zusätzlich zum Immunsystem ein spezielles chemisches Abwehrsystem gegen Infektionen. Im Zusammenspiel mit ähnlichen Peptiden wie PGLa

⁸Das Antibiotikum Penicillin greift in den Stoffwechsel des Bakteriums ein. Es verhindert dabei die Vernetzung von Mureinmolekülen, die für die Festigkeit der Zellwand wichtig ist. Die Resistenz kommt daher, daß Bakterien das Enzym Penicillinase bilden können und somit einen Teil des Penicillins nämlich den β -Lactamring spalten können und es damit unwirksam machen.

⁹Ähnliche Stoffe (Defensine) finden sich auch beim Menschen [Bom 91, Mal 95]

oder β -Lactam zeigen sie einen Synergieeffekt. Das heißt, die Wirkung im Beisein des jeweils anderen ist gegenüber der gleichen alleinigen Wirkkonzentration verstärkt [Wes 95]. Die antibakterielle Wirkkonzentration gegen prokaryotische Bakterienzellen liegt in der Größenordnung von 10-100 $\mu\text{g/ml}$. Die selektive hämolytische Wirkung gegenüber eukaryotischen Wirtszellen beruht auf der deutlich höheren Wirkkonzentration von 1 mg/ml [Mal 95, Zas 87, Zas 88, Che 88, Bes 90, Mats 97/1]. Die meisten hämolytischen Peptide besitzen zusätzlich zur hämolytischen auch antimikrobielle Eigenschaften, wo hingegen die Menge der antibakteriellen Peptide selektiv gegen prokaryotische Zellmembrane wirkt [Wie 97D]. Pharmazeutisch interessant ist ferner die selektive, lytische Wirkung auf Tumorzellen [Cru 91, Ohs 92, Sob 95, Bak 93], die Gegenstand weiterer Untersuchungen ist [Hai 95].

2.4.1 Struktur von Magainin

Ein Magaininmolekül besteht aus 23 Aminosäureresten. Das natürlich vorkommende Magainin1 hat die Aminosäuresequenz GIGKF LHSAG KFGKA FVGEI MKS- CONH_2 . Magainin2 mit leicht veränderter homologer Aminosäuresequenz GIGKF LHSAK KFGKA FVGEI MNS- CONH_2 wird synthetisiert. Magainine treten in wäßriger Lösung als statistisches Knäuel auf [Ges 97, Hol 88, Sip 92]. Erst im Kontakt mit Phospholipiden bildet sich die amphiphatische α -helikale Sekundärstruktur [Mar 88] aus¹⁰. Der Nachweis erfolgte mit mehreren Untersuchungsmethoden wie zirkularem Dichroismus (CD) [Lud 94, Mats 89, Mats 91, Wie 96, Mats 97/2, Mats 98/1, Mats 98/2], Ramanspektroskopie [Wil 90, Jac 92, Hir 96] und magnetischer Kernspinresonanz [Bech 93]. Die Aminosäurereste sind auf einer rechtshändigen α -Helix so angeordnet, daß eine Seite hydrophob, die andere Seite aber hydrophil und positiv geladen ist (4 Nettoladungen pro Peptid bei neutralem pH). Das Peptid ist fast völlig α -helikal. Dieses Strukturmotiv tritt bei antibakteriellen Peptiden häufig auf und ist offensichtlich das entscheidende Strukturmotiv bei der cytotoxischen Lipidwechselwirkung von Magainin. Ersetzt man nämlich einige der Aminosäureresiduen durch deren D-Isomere, so wird die Helix nicht mehr ausgebildet und die antimikrobielle Eigenschaft geht verloren [Che 88]. Die Helix ist im mittleren und C-terminalen Bereich (9.-21. Aminosäuregruppe) sehr stabil und etwas schwächer im N-terminalen Bereich [Wie 96, Wie 97D]. Abbildung 2.2 auf der nächsten Seite zeigt schematisch ein Magainin2 -Molekül in der Frontansicht (*helical wheel representation*). Die hydrophoben/-philen Aminosäurereste sind in weißer bzw. grauer Farbe unterlegt. Die schwarzen Kreise zeigen kationisch geladene Reste an.

¹⁰Im organischen Lösungsmittel Trifluorethanol (TFE) hat es ebenfalls diese Sekundärstruktur [Buc 98], die der Struktur bei Anlagerung an die Membran ähnlich sein soll [Ges 97, Hol 88]

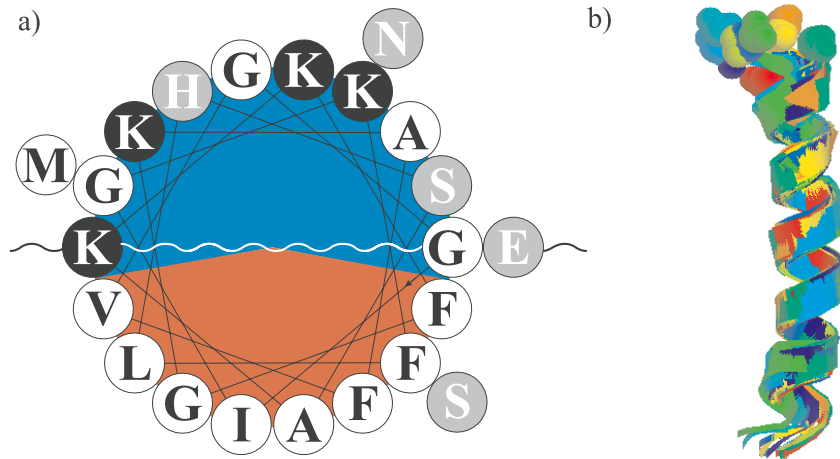


Abbildung 2.2: Verschiedene Darstellungen eines helikalen Magainin2 -Moleküls. a) Schematische Darstellung in der *helical wheel representation*. Für die Aminosäurereste wurde der Ein-Buchstabencode verwendet (siehe Anhang 5.26 auf Seite 92). Hydrophobe Reste sind weiß, polare Reste grau und kationische Reste schwarz dargestellt. Die rote Fläche stellt die hydrophobe Seite, die blaue entsprechend die hydrophile Seite des Magainin2 Moleküls dar [Mats 99, Dat 99]. Die wellige Linie deutet die Membranoberfläche an. b) Modell eines Magainin2 -Moleküls aus einer Protein-Datenbank (<http://trantor.bioc.columbia.edu/cgi-bin/STING/frame.pl?2mag>, 16.03.2000).

2.4.2 Wechselwirkungsmechanismen von Magainin

Die Wechselwirkung der amphiphatischen Magainin2 -Moleküle mit den amphiphatischen Lipiddoppelschichten aus hydrophiler Kopfgruppen- und hydrophober Kettenregion wird kontrovers diskutiert. Beim Wechselwirkungsmechanismus herrscht nur insoweit Übereinstimmung, daß Magainin2 nicht die Peptide und Proteine in der Lipidmatrix angreift, sondern vielmehr die Lipidmatrix an sich attackiert [Bes 90, Wad 90]. Hier gehen die Vorstellungen dann aber auseinander. Während die einen lediglich von einer Peptidanlagerung an die Membranoberfläche ausgehen z.B.[Bech 93], befürworten die anderen eine poren- oder kanalbildende Wirkung wie im Falle von Alamethicin z.B.[Lud 96]. Ausgangspunkt für letzteres sind Beobachtungen, daß künstlich hergestellte Membrane (z.B. Vesikel, planare Lipiddoppelschichten) bei der Einwirkung von Magainin2 durchlässig [Mats 89, Mats 91, Gom 93, Cru 92] werden. Es wird eine schrittweise Leitwerterhöhung beobachtet [Duc 89]. Außerdem steigt die Leckrate künstlicher Liposome; sie steigt linear mit der Peptidkonzentration an [Ep 99]. Es zeigt sich, daß der Ausfluß aus Liposomen stark an die Eigenschaften anionischer Lipide gekoppelt ist [Mats 98/1]. Liposome aus Phosphatidylglycerol -ein Hauptbestandteil von mikrobiellen Membranen - reagieren sehr viel empfindlicher auf die Einwirkung von Magainin als dies zum Beispiel bei Liposomen aus Phosphatidylserin - Hauptbestandteil von Membranen der Wirbeltiere- der Fall ist. Dies deutet möglicherweise darauf hin, daß auch andere Eigenschaften die Leckrate beeinflussen. Ein gewichtiger Faktor könnte die Membran-

krümmung sein [Mats 98/1, Ep 98, Pol 97/2].

Das *barrel stave* Modell

Zur Erklärung wird gerne das einfache Bild des *barrel stave* oder *helical bundle* Modells [San 91] herangezogen. Das klassische Modell geht davon aus, daß mehrere helikale Peptidmonomere sich zu oligomeren Kanälen oder Poren zusammenlagern. Die helikale Achse der Peptide steht mehr oder weniger senkrecht zur Membranoberfläche. Die hydrophilen Seiten der Peptide sind zum Poreninneren hin orientiert, die hydrophoben Seiten zeigen nach außen und sind zwischen den hydrophoben Lipidketten verankert. Der Begriff Kanal wird vorzugsweise bei Peptiden verwendet, die reproduzierbare, unterscheidbare Leitfähigkeitsstufen bei Membranen ausbilden. Das am besten studierte Peptid mit dieser Eigenschaft ist Alamethicin mit der Aminosäuresequenz *ac*-UPUAU AQUVU GLUPV UUEQF-*QH* aus der Familie der Peptaibolen¹¹. Die Alamethicin-Poren sind gut definiert und reproduzierbar schaltbar. Man spricht dagegen von Poren wenn die Reproduzierbarkeit nur dürftig gegeben ist. Im Falle von Magainin ist dies der Fall [Dat 96].

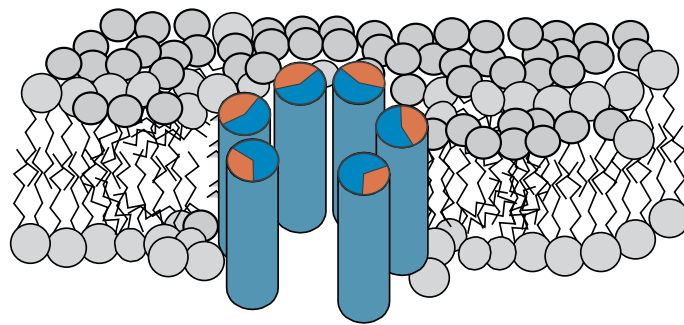


Abbildung 2.3: Beim *barrel-stave* Modell bilden mehrere Peptide eine oligomere Pore. Die hydrophilen Seiten zeigen zueinander, während die hydrophoben Seiten mit den Acylketten der Lipide in direktem Kontakt stehen. Der klassische Vertreter für diesen Wechselwirkungsmechanismus ist das Peptid Alamethicin .

Das *wormhole* Modell

Von Matsuzaki wurde für Magainin eine etwas modifizierte Porenbildung vorgeschlagen [Mats 95, Mats 96]. Dieses Modell tritt auch unter dem Namen *toroidal* Modell auf [Lud 96]. Die Pore hat nicht die einfache *barrel stave* Form. Allerdings ist das *wormhole* Modell dem *barrel stave* Modell sehr ähnlich. Im Gegensatz zum *barrel stave* Modell, bei dem nur Peptide an der Porenbildung beteiligt sind, besteht beim *wormhole* Modell die Pore aus Peptiden und Lipiden. Zwischen den Peptiden kommen zusätzlich Lipidkopfgruppen zum Vorschein.

¹¹Peptaibolen zeichnen sich durch ihren hohen Anteil an Aib aus. Der Name kommt daher, daß diese Gruppe einen 1,2 amino-Alkohol am C-terminus trägt. Die Sekundärstruktur ist 3_{10} helical [Ep 99].

Dieses Modell wird hauptsächlich von der Tatsache genährt, daß Magainin die transmembrane flip-flop Rate sowohl von Peptiden als auch Lipiden erhöht [Ep 99]. Der Durchmesser der Poren wird in der Größenordnung von 20-30 Å angegeben [Lud 96]. Darüberhinaus sollen die Poren als zweidimensionale, quasi-flüssige Phase wie harte Scheiben in der Membranebene korreliert sein [Lud 96].

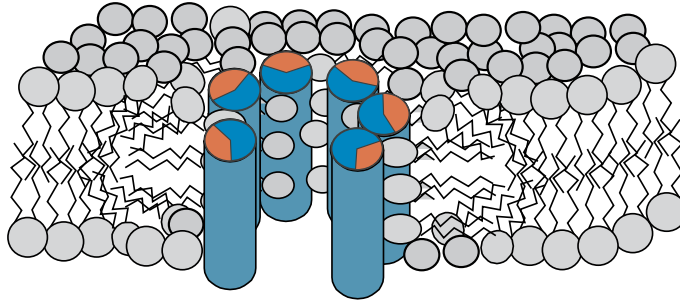


Abbildung 2.4: Das *wormhole* Modell ist dem *barrel-stave* Modell in seiner Struktur sehr ähnlich. Zusätzlich kommen zwischen den Peptidmonomeren einzelne Lipidkopfguppen zum Vorschein.

Diese Modelle erklären zwar in plausibler Form das Auftreten einer Leckrate können aber deren Sättigung nach etwa 10 Minuten [Mats 95] nicht erklären. Nicht zuletzt deshalb ist die Existenz morphologisch stabiler, oligomerer Poren als Hauptwirkungsweise ist nicht unangefochten. Matsuzaki schlägt daher folgenden Mechanismus vor z.B. in [Mats 99]: Magainin2 lagert sich zunächst parallel an die äußere Halbmembran an. Wegen der dadurch entstandenen Asymmetrie kommt es zu Instabilitäten und zu einer temporären Porenbildung, bei der Magainin2 das Konzentrationsgefälle zwischen innerer und äußerer Halbmembran etwa innerhalb 10 Minuten ausgleicht. Danach ist wieder die parallele Membranorientierung die Mehrheitspopulation. Ausdrücklich ist damit aber in keiner Weise eine Minderpopulation ausgeschlossen, die intermediäre transmembrane Poren ausbildet. Es ist aber wichtig im Gedächtnis zu behalten, daß ein gewisser Zustand unter Umständen nur eine Momentaufnahme darstellt [Mats 99].

Das *in-plane diffusion* Modell

Modelle mit transmembraner Orientierung der amphiphilen Peptide sind nur schwer mit experimentellen Beobachtungen von kurzkettigen Peptiden (8-22 Residuen) in Einklang zu bringen. Diese Peptide zeigen die stärkste antibiotische Aktivität, wenn sie vornehmlich aus 11-15 Leucinen und Lysinen bestehen [Blo 92]. Genau diese Peptide sind aber zu kurz um die Membran zu durchspannen. NMR und IR Spektroskopie bestätigen eine parallele Orientierung zur Membranoberfläche [Bech 99, Cas 99]. Das magainin-ähnliche Peptid LAH₄ hat eine deutlich höhere antibiotische Aktivität bei paralleler Orientierung (niedriger pH-Wert) als bei transmembraner Orientierung (pH=0) [Vog 99]. Außerdem zeigen spektroskopische

Messungen mit ^{15}N Festkörperkernspinresonanz an orientierten Phospholipidmembranen, daß sich Magainin bei Konzentrationen von 0.8 - 3 mol % parallel zur Membranoberfläche anlagert und dabei mit den Aminosäureresten 2 bis 20 in der Membrane verankert ist [Bech 92, Bech 93, Bech 96, Bech 98]. Darüberhinaus soll Magainin im membrangebundenen Zustand als Monomer vorliegen [Schue 97]. Fluoreszenz Energietransfer Messungen an Magainin-Analogen zeigen, daß das Peptid etwa 10 Å von der Mitte der Lipiddoppelschicht entfernt lokalisiert ist [Mats 94] und demnach in der Kopfgruppenregion liegt. Monte-Carlo Simulationen bestätigen dies [Mil 93]. Das Volumen wird aus Molekulardynamikrechnungen mit 3500 Å³ angegeben [Lud 95]. Bei einer Axiallänge von 34.5 Å erhält man damit einen effektiven Durchmesser von 10-12 Å. Durch das Anlagern von Magainin2 wird die hydrophile Kopfgruppenregion beiseite gedrückt. Das Peptid ist aber zu dünn, um wenigstens eine Hälfte der Doppelschicht vollständig zu füllen. Der entstandene Raum in der hydrophoben Kettenregion wird durch benachbarte Lipidketten aufgefüllt. Dadurch wird die Membran im Mittel dünner [Lud 95, Mue 99]. In [Lud 95] wird ein linearer Zusammenhang zwischen Peptidkonzentration und Membrandicke dargelegt.

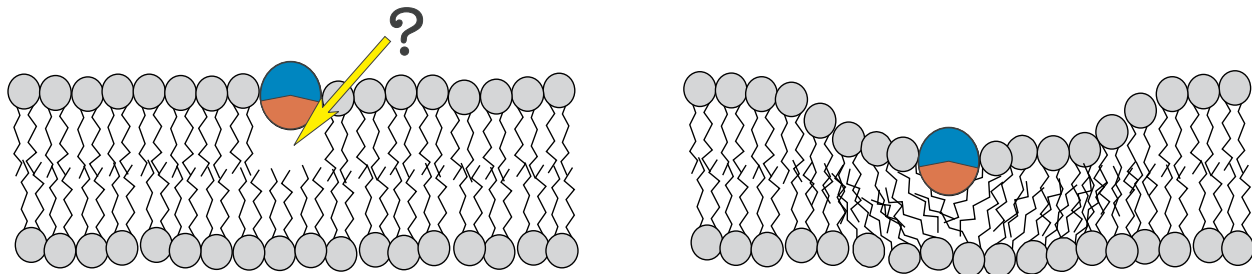


Abbildung 2.5: Das *in-plane diffusion* Modell geht von einer parallelen Anlagerung des Peptides an die Membran aus. Das Peptid ist in seinem Durchmesser zu klein, um wenigstens eine Hälfte der Doppelschicht vollständig zu füllen (siehe auch Abbildung 2.6).

Auf molekularer Ebene betrachtet sieht die Einbettung des Peptids wie eine konische Einbettung in die Lipidschicht aus. Die Lipide verhalten sich wie invertierte Kegel, um die peptidinduzierte Verspannung in der Membran zu kompensieren¹² [Mats 98/1, Wie 97]. Es entstehen um jedes Magainin2 -Molekül Verzerrungsfelder, die bis zu 100 Å Durchmesser haben können [Bech 97]. Wenn sich diese diffusen Einheiten innerhalb eines kritischen Radius annähern, können sich lokal Instabilitäten aufbauen, die dann zu durchgängigen Öffnungen in der Membrandoppelschicht führen [Jur 94, Gom 93]. Verschiedene Modelle der statistischen Physik von Membranstapeln, in denen Peptide als Einschlüsse (engl. *inclusions*) behandelt werden, sagen eine Zunahme der Fluktuationen durch veränderte Elastizitätseigenschaften voraus [Sens 97/1, Sens 97/2, Netz 97]. Das Fluktuationsspektrum bleibt der Theorie nach im Wesentlichen durch die Caillé-Theorie beschreibbar [Cai 72].

¹²Lokal wird eine positive Krümmung der Membran verursacht.

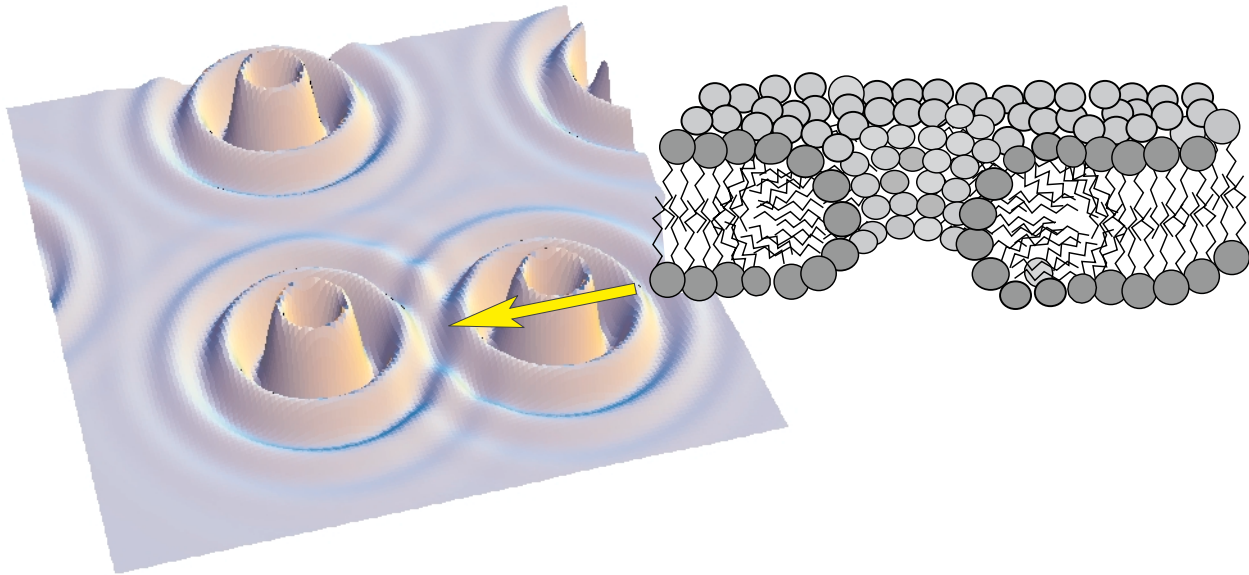


Abbildung 2.6: Durch die Fehlpassung des Peptids mit der Lipiddoppelschicht entstehen langreichweitige Verzerrungsfelder. Wenn solche Instabilitäten aufeinander treffen, können Membrandefekte entstehen.

Das *detergenz-like* und das *carpet* Modell

Bei hohen Konzentrationen läßt sich die cytolytische Wirkung auf Membrane am leichtesten mit der membranzerstörenden Wirkung von antibiotischen Peptiden erklären. Die Auflösung der Lipid-Doppelschicht hebt eine künstliche Barriere auf. Die zuvor existierenden elektrochemischen Gradienten steuern dem Gleichgewicht zu. Cytoplasmatische Bestandteile der Zelle werden freigegeben und der Energiehaushalt der Zelle wird massiv gestört. Dies bedeutet für die Zelle letztlich deren Tod. In ähnlicher Weise hängt der Ausfluß von Fluoreszenzfarbstoff aus künstlich hergestellten Vesikeln mit der membranauflösenden Wirkung von membranaktiven Peptiden zusammen. Der Startschuß fällt bei einer Konzentration von 3 mol % [Gra 92]. Bei dieser Konzentration entfalten auch Detergenzien wie etwa Triton X-100 oder Octylglycosid deren Wirkung [Gra 92, Mats 95]. Die Zugabe von Magainin2 über die Konzentration von 2 mol % hinaus zeigt eine Auflösung des Peptid-Membranverbundes und Membranteile orientieren sich senkrecht zur ursprünglichen Oberfläche. Der Nachweis erfolgte mit ^{31}P NMR [Wil 90, Bech 99]. Ein ähnliches Verhalten wird auch mit Lysolipiden [Ino 77] oder Detergenzien [Sand 90] beobachtet.

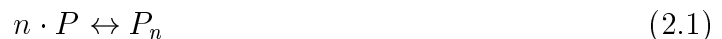
Darüberhinaus verbleibt als Alternative zu den vorgeschlagenen Modellen noch das *carpet* Modell. Manche Peptide (Dermaseptin, Creopin, Pardaxin [Pou 92, Gaz 94, Gaz 95, Ore 96]) verursachen eine unspezifische Auflösung der Membran bei hoher Peptidkonzentration. Der

carpet-like Mechanismus geht von einer parallelen Peptidanlagerung an die Membran aus. Durch die sehr hohe Peptidkonzentration (in der Größenordnung $P/L = 1:7$ [Gaz 95]) kann eine Peptidmonolage gebildet werden, die die Doppelschichtstruktur derart stört, daß sich durchgehende Fehlstellen bilden können. Bei Erreichen einer bestimmten Konzentration kann die Membran dann in Stücke zerreißen [Ore 98]. Als intermediäre Phase kann eine Porenbildung ähnlich dem wormhole Modell auftreten [Ore 98], die aber nicht sehr wahrscheinlich scheint [Pou 92].

2.5 Energiebetrachtungen der Membran-Peptid Wechselwirkung

Eine detaillierte Betrachtung aller Wechselwirkungsterme bei der Porenbildung ist nicht zuletzt durch den komplizierten Aufbau der Membrandoppelschicht und deren hochdynamisches Verhalten nahezu unmöglich. Trotzdem führt Bechinger [Bech 97] Überlegungen an, die ohne die genaue Kenntnis einzelner Details zumindest eine grobe Abschätzung freier Energiebeiträge liefern. Eine parallele Lage des Peptids befriedigt sowohl die hydrophobe, als auch die elektrostatische Wechselwirkung. Vom physiochemischen Standpunkt ist sie daher eine energetisch günstige Ausgangsposition. Im Gegensatz dazu steht der oligomere, kanalbildende Zustand mit vornehmlich hexameren Poren [Duc 89], der unter Umständen aber relativ instabil ist. (Als Peptidkonzentration wird, soweit nicht anders lautend, immer 1 mol % Peptid vorausgesetzt.)

Elektrophysiologische Experimente sind auf Flächendichten transmembraner Poren von einer Pore auf eine Fläche von $10^{-8} - 10^{-10} m^2$ empfindlich. Ausgehend von einer 1 mol % igen Peptidkonzentration errechnet man in dieser Fläche eine Peptidzahl von ungefähr $3 \cdot 10^8$. Aus der Beobachtung genau einer n-oligomeren Pore P_n schließt man, daß die Gleichgewichtskonstante K für das chemische Gleichgewicht der Gleichung



den Wert $1/[P]^n$ nicht übersteigen sollte. Für hexamere Poren ($K \leq 10^{51}$) erhält man damit für die freie Energie

$$\Delta G \leq RT \ln(K) = 300 kJ / (mol Hexamer). \quad (2.2)$$

Nun stellt sich die Frage, welchen Einfluß die hydrophobe Wechselwirkung bei der Bil-

dung einer Pore nehmen kann. Diese Wechselwirkung ist für die Bindung des Peptides an die Membran sehr wichtig. Die Umordnung von einem parallelen zu einem kanalformen- den transmembranen Bindungszustand mit einer wassergefüllten Pore sollte aber in erster Näherung nichts ändern. Die hydrophilen Seitenketten sind vor und nach der Umordnung in direktem Kontakt mit Wasser. Andererseits können sich Seitenketten dann in marginal veränderter Sekundärstruktur anordnen und es ist ein Energieverlust je nach Literaturquelle [Ben 96, Tan 90] zwischen $70 \text{ J}/(\text{mol } \text{Å}^2)$ und $125 \text{ J}/(\text{mol } \text{Å}^2)$ zu erwarten.

Dieser Wert ist aber unter dem Gesichtspunkt einzuordnen, daß er aus Tabellen stammt, die eine Wechselwirkung zwischen Wasser und Öl zu Grunde legen.

Wesentlich bedeutsamer ist die Betrachtung der elektrostatischen Energie. Jedes Magainin-Moleküle trägt eine vierfach-positive Ladung. Bei einer Peptidaggregation in Poren zeigen dann gleiche Ladungen der Magaininmoleküle zueinander. Durch elektrostatische Wechselwirkung stoßen sie sich ab. Die elektrostatische Energie kann abgeschätzt werden, indem man $(z \cdot e)$ Ladungen, die vorher willkürlich auf der Membranoberfläche verteilt waren, auf einem Zylinder mit der Länge l und dem Porenradius R_0 anordnet. Geometrische Überlegungen zeigen, daß ein hexamerer Kanal etwa 30 Å hoch ist und einen Radius R_0 von etwa $4\text{-}5 \text{ Å}$ hat. Unter der Annahme, daß die jeweils 4 Lysine und der N-Terminus geladen bleiben und die Hystidine ihre Ladungsneutralität beibehalten, würde bei Magainin2 solch ein Kanal dann aus 30 positiven und 6 negativen Ladungen bestehen. Dies führt damit zu einer abstoßenden elektrostatischen Energie von:

$$W = (ze)^2 / 2l\pi\epsilon_0\epsilon_r \cdot \ln\left(\frac{R_{GG}}{R_0}\right) \approx 1000 \text{ kJ}/(\text{mol Hexamer}). \quad (2.3)$$

ϵ_0 und ϵ_r haben ihre gewöhnliche Bedeutung. R_{GG} ist der Abstand gleichmäßig auf der Membranoberfläche verteilter Peptide. Der Wert hängt also vom molaren Verhältnis der membrangebundenen Peptide ab.

Natürlich kann der Wert der elektrostatischen Energie durch Umladung der Aminosäurere-siduen während der Aggregation entsprechend der Gleichung



herabgesetzt sein. Damit erhöht sich aber die freie Energie:

$$\Delta G = n_i RT \ln(r) + 2.3 RT \sum_i (pK_i - pH). \quad (2.5)$$

n_i ist die Anzahl geladener Seitenketten vom Typ i , r ist das kleinste Verhältnis geladener

Seitenketten, bei dem ein Aufenthalt zwischen den Lipiddoppelschichten noch denkbar ist. Die Energie ändert sich linear mit der Differenz zwischen pH und pK-Wert der Aminosäure. Bei neutralem pH ist die Energie pro Lysin (pK=10) 30 kJ/mol und für den N-Terminus (pK=8.5) 20 kJ/mol. Unter der Annahme, daß in einer hexameren Pore ein Magainin2 - Molekül geladen bleibt macht das dann nur etwa 60 % der elektrostatischen Energie aus.

Eine treibende Kraft für Porenbildung kann aus der Fehlanpassung zwischen der hydrophoben Peptidseite mit der Lipiddoppelschicht abgeleitet werden. Es wurde gezeigt daß ein zu großer Unterschied zu Aggregation und Domänenbildung führt [Bech 96/2, Lud 95, Mou 84, Pol 97]. Es bleibt aber unklar, ob dieses Verhalten etwas mit der antibakteriellen Eigenschaft zu tun hat [Ep 99]. Die Energien sind hier im Bereich einiger kJ/mol.

Bei der Peptidaggregation werden nun auch Freiheitsgrade der Peptide beschnitten. Im Gegensatz zum transmembranen, oligomeren Bindungszustand hat man im parallel gebundenen Zustand wenigstens zwei Freiheitsgrade der Bewegung in der Membranoberfläche und einen Rotationsfreiheitsgrad mehr. Durch eine Verminderung der Freiheitsgrade wird die entropische Energie erhöht. Für n Magainin2 -Moleküle bedeutet dies

$$\Delta G = (n - 1) \cdot 100 \text{kJ/mol}. \quad (2.6)$$

Die Dipol-Abstoßung zwischen parallel-angeordneten Helizes trägt ebenfalls einige kJ/mol bei, die eine Peptidaggregation unwahrscheinlich machen [Edm 85, Eis 91, Gil 89].

Die Wechselwirkung des helikalen Dipolmoments μ mit einem transmembranen elektrischen Feld E wirkt hingegen für eine Umordnung förderlich. Der Energiegewinn ist dabei:

$$-\Delta G = N_A \cdot \mu \cdot E = N_A \cdot 15 \text{e}\text{\AA} \cdot 200 \text{mV}/30 \text{\AA} = 10 \text{kJ/mol}. \quad (2.7)$$

N_A ist die Avogadro'sche Zahl und $\mu = 15 \text{e}\text{\AA}$ ist ein typischer Wert für kanalbildende Polypeptide.

Ebenfalls zu einer Senkung der Energiebilanz in der Größenordnung von -25 kJ/mol trägt die Ausbildung intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Helizes in einer Pore bei [Eng 86, San 92]. Der Nettogewinn ist aber vernachlässigbar, da für deren Ausbildung Wasserstoffbrückenbindungen von Ketten mit dem Wasser aufgegeben werden müssen. Für Alamethicin wurden solche Wasserstoffbrücken zwischen Glx-Aminosäureresten vorgeschlagen siehe z.B. [San 93].

Die Summe aus hydrophoben und elektrostatischen Termen liefert für Magainin2 die ungünsti-

ge Energie von 1100 kJ/mol für den transmembranen Bindungszustand. Bechinger betont aber weiter [Bech 97], daß auf Grund fehlender Daten keine Aussagen über van-der-Waals Wechselwirkungen¹³ getroffen werden konnte. Selbst wenn man sich für die weitere Betrachtung der Werte von Alamethicin bedient ($< 600 \text{ kJ/mol}$) und auf Magainin2 überträgt, bleibt die Abschätzung zu grob. Eine Porenbildung scheint zwar energetisch nicht besonders günstig zu sein, kann aber auch nicht explizit ausgeschlossen werden.

Zusätzlich zu den angestellten Überlegungen ist dann noch der Beitrag elastischer Verspannungen zu berücksichtigen [Hua 95]. Für eine völlig glatte Lipiddoppelschicht, die aus zwei identischen Monolagen (im Gleichgewichtsabstand $2a$) besteht wird die Deformationsenergie bei der Auslenkung aus der mittleren Ruhelage $M(x,y)$ mit

$$f = aB\left(\frac{D}{2a}\right)^2 + \frac{K_c}{8}(\Delta D)^2 + \frac{K_c}{2}(\Delta M - C_0(x, y))^2 \quad (2.8)$$

angegeben. Die elastischen Konstanten sind wie üblich mit B und K_c berücksichtigt. $D(x,y)$ ist die Gesamtschichtdicke und $C_0(x, y)$ die spontane Krümmung. Die Deformation der Doppelschicht muß der Bedingung

$$\frac{B}{a}D + \frac{K_c}{2}(\Delta D)^2 = 0 \quad (2.9)$$

genügen. Der eindimensionale (aber hier wenig hilfreiche) Fall wird explizit gelöst. Beim 3-dimensionalen Fall wird eine kurze Energiebetrachtung angestellt, die zwei Teile umfaßt. Die Deformationsenergie $-\epsilon_B$ bei gegebener Peptidkonzentration und die Energie für die Bindung an die Membranoberfläche f_M müssen in der Summe kleiner sein, als die freie Energie für den transmembranen Einbau $\epsilon_{Insertion}$:

$$-\epsilon_B + f_M < -\epsilon_{Insertion} \quad (2.10)$$

Zur Klärung der Frage nach einer Porenbildung wird letztlich lediglich eine empirische Bestätigung für eine Porenbildung angeführt. Dazu benutzt der Autor Huang [Hua 95] die Beobachtung daß bei einer Peptidkonzentration von $P/L = 1/150$ mit einer Deformationsenergie $f_M = F^{(1)}$ noch kein transmembraner Bindungszustand beobachtet werden konnte. Dementsprechend ist

¹³In Lipiddoppelschichten trägt nur der Unterschied der van-der-Waals Wechselwirkung zwischen Peptid-Peptid und Peptid-Lipid zu einer Aggregation bei [See 91].

$$-\epsilon_B + F^{(1)} < -\epsilon_{Insertion} \quad (2.11)$$

noch nicht erfüllt und es gibt hauptsächlich den oberflächengebundenen Zustand. Die Deformationsenergie nimmt dann aber linear mit der Konzentration zu und die Deformationsenergie erreicht schließlich einen Wert, bei dem

$$-\epsilon_B + c\left(\frac{P}{L}\right)F^{(1)} < -\epsilon_{Insertion} \quad (2.12)$$

erfüllt wird und schließt daraus, daß ab einer bestimmten Konzentration ein transmembraner Zustand der Peptide energetisch günstiger ist.

Im Ergebnis kann festgehalten werden, das der zu Grunde liegende Mechanismus der Wirkung von Magainin2 noch weitgehend ungeklärt ist.

Kapitel 3

Untersuchungsmethoden

Die experimentelle Untersuchung erfordert Methoden, die sensitiv auf den entsprechenden Längenskalen (nm-Bereich) sind. Bei dem zu untersuchenden System handelt es sich um ein biologisch relevantes System, das auch in einem biologisch relevanten Zustand untersucht werden sollte. Bei biologischen Membranen ist dies der fluide L_α - Zustand. Typischerweise untersucht man hier unter Normaldruck, hoher Luftfeuchtigkeit um 100 % relative Luftfeuchte und Temperaturen um 40 °C. Auf Grund der Weichheit dieser Materie scheiden rasterkraftmikroskopische Methoden aus. Es wurde versuchsweise eine DMPC-Probe untersucht. Im Gel-Zustand P'_β wurden brauchbare Daten gewonnen, die im Abschnitt AFM 3.4 auf Seite 43 gezeigt werden. Der Wechsel in die fluide L_α Phase gelang hingegen nicht mehr. Bei elektronenmikroskopischen Methoden muß Kontrastierungsmaterial eingesetzt werden, das das zu untersuchende Membransystem entscheidend verändert. Die biologische Relevanz wird also fraglich. Die Streuung von Neutronen- oder Röntgenstrahlung ist berührungsfrei und in situ möglich. Sie ist die klassische Untersuchungsmethode zum Studium struktureller Eigenschaften kondensierter Materie. In diesem Kapitel werden nun die Grundlagen der in dieser Arbeit verwendeten Röntgen- und Neutronenstreuungsmethoden dargestellt. Grundsätzlich sind beide Methoden gleichwertig verwendbar. Erst in der Zusammensetzung ihrer Komplementarität sind weitergehendere Aussagen möglich, als jede Methode für sich allein bieten könnte. Die physikalische Natur beider Methoden ist verschieden. Röntgenbeugung findet an Elektronen statt. Entsprechend benötigt man für die Herleitung die Maxwell Gleichungen. Neutronen werden am Kern gestreut. Der Ansatz erfolgt daher über die stationäre Schrödingergleichung. Trotzdem kann der Streuformalismus für beide Methoden gleichermaßen verwendet werden, wenn entsprechende Analogien berücksichtigt werden.

Strahlenschäden, die das System während der Messung verändern, wurden nicht beobachtet. Das liegt zum einen daran, daß dies bei thermischer Neutronenstreuung einfach kein Problem darstellt. Zum anderen wurde bei Röntgenstrahlung eine hohe Photonenenergie gewählt (typischerweise 20keV). Der wellenlängenunabhängige Thompsonstreuungsquerschnitt bleibt dabei gegenüber niedrigeren Photonenenergien erhalten; der Absorptionskoeffizient,

der für die Ionisierung und damit für die Zerstörung der Probe verantwortlich ist, nimmt mit der verwendeten Wellenlänge zur dritten Potenz (λ^{-3}) ab.

3.1 Streugeometrie

In diesem Abschnitt werden die grundlegenden Definitionen bezüglich des Koordinatensystems und der verwendeten Winkelbezeichnungen festgelegt. Abbildung 3.1 veranschaulicht den nachfolgenden Text.

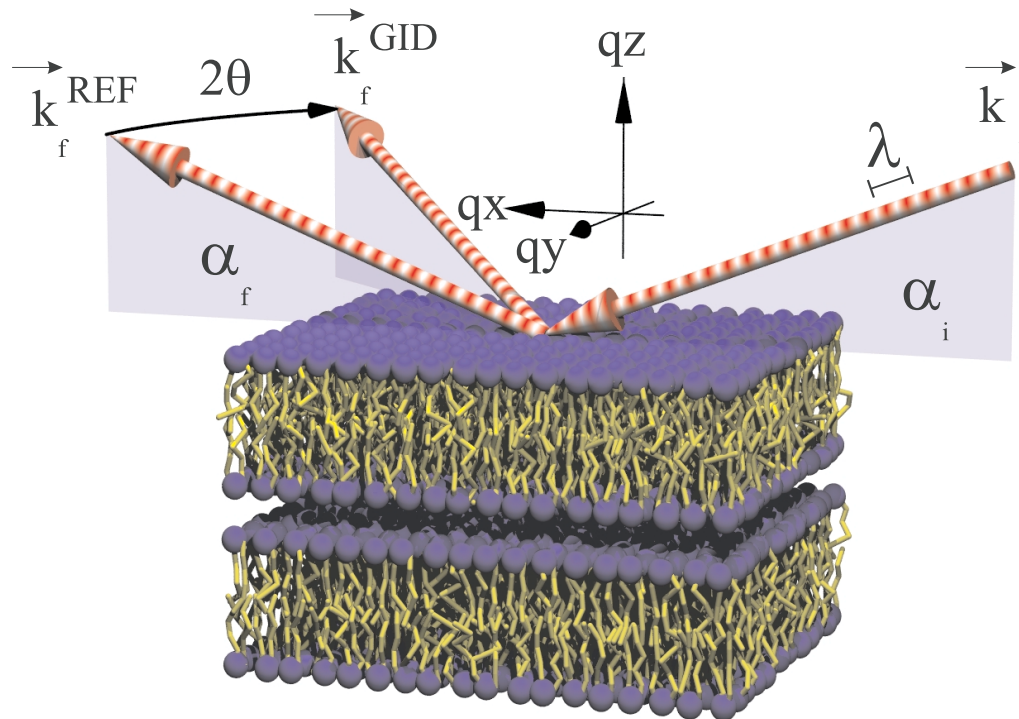


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Streugeometrie an Lipiddoppelschichten. Ein einziges Lipidmolekül ist hier mit blauer Kopfgruppe und gelber Kettenregion symbolisiert. Die rot-weißen Pfeile stellen den einfallenden Strahl \vec{k}_i , bzw. ausfallende Strahlen in Reflexions- (\vec{k}_f^{REF}) und ‚grazing incidence diffraction‘- Geometrie (\vec{k}_f^{GID}) dar.

Das Koordinatensystem wird so gewählt, daß die positive z-Achse parallel zur Probennormale zeigt. Die x-Achse steht dazu senkrecht und zeigt in Richtung des einfallenden Strahls. Zusammen mit der y-Achse ergibt sich ein rechtshändiges Koordinatensystem. Ein einfallender Strahl der Wellenlänge λ entsprechend dem Wellenvektor \vec{k}_i definiert zusammen mit der Oberflächennormale der Probe die Einfallsebene. Der Strahl trifft unter dem Winkel α_i auf die Oberfläche und wird von der Probe unter einem Winkel α_f zur Oberfläche

und einem Winkel 2θ senkrecht zur Einfallsebene gestreut. Dabei wird die durch den Streuprozeß verursachte Impulsdifferenz \vec{Q} zwischen Anfangszustand $|\vec{k}_i\rangle$ und Endzustand $|\vec{k}_f\rangle$ der Röntgenquanten ausgenutzt, um die Strukturamplitude des zu untersuchenden Systems mit Hilfe der gestreuten Intensität $I(\vec{Q})$ zu bestimmen:

$$I(\vec{Q}) \sim |F(\vec{Q}')|^2 \quad \text{mit} \quad F(\vec{Q}') = \int_{dV} e^{i\vec{Q}'\vec{r}} \rho(\vec{r}) d\vec{r} \quad (3.1)$$

und $\vec{Q} = \vec{k}_f - \vec{k}_i$ bzw. $\vec{Q}' = \vec{k}'_f - \vec{k}'_i$.

Der außerhalb der Probe ermittelte Impulsübertrag \vec{Q} ist dabei nicht in jedem Fall identisch mit dem Impulsübertrag \vec{Q}' in der Probe. Die durch Brechung der ein- und ausfallenden Wellen verursachten Abweichungen werden dann signifikant, wenn Ein- oder Ausfallswinkel der Strahlung auf die Probenoberfläche in der Größenordnung des kritischen Winkels der Totalreflexion sind. Ist hingegen keiner der verwendeten Winkel in der Größenordnung des kritischen Winkels so kann $\vec{Q}' = \vec{Q}$ angenommen werden.

In Komponentenschreibweise stellt sich der Impulsübertrags- oder Streuvektor \vec{Q} folgendermaßen dar ¹:

$$\begin{aligned} q_x &= \frac{2\pi}{\lambda} (\cos(2\theta) \cos(\alpha_f) - \cos(\alpha_i)) \\ q_y &= \frac{2\pi}{\lambda} \cos(\alpha_f) \sin(2\theta) \\ q_z &= \frac{2\pi}{\lambda} (\sin(\alpha_f) + \sin(\alpha_i)) \end{aligned} \quad (3.2)$$

$$\text{Der laterale Impulsübertrag ist } q_{||} := \sqrt{q_x^2 + q_y^2}. \quad (3.3)$$

Die Strukturamplitude $F(\vec{Q}')$ stellt gemäß Gleichung 3.1 die Fouriertransformierte der Ortsraumelektronendichte $\rho(\vec{r})$ dar. Wie üblich analysiert die Fouriertransformation die Periodizitäten der Ladungsverteilung im Ortsraum, aber auch Abweichungen davon.

Unter der spekulären (spiegelnden) Bedingung in der Reflexionsebene (Einfallswinkel $\alpha_i =$ Ausfallswinkel α_f) ist die gemessene Intensität in der Regel am höchsten. Im Idealfall eines einfallenden Strahls mit verschwindender Divergenz (perfekte, ebene Welle) und eines lateral völlig homogenen Schichtsystems ist die q_z Richtung der einzige Träger endlicher Intensität im reziproken Raum. Die regelmäßige lamellare Struktur (Wiederholungsabstand d) führt bei $q_z = n 2\pi/d$ zu den Bragg-Maxima (bzw. quasi Bragg-Maxima). Erst die Existenz lateraler Unordnung, wie sie z.B. durch eine räumlich fluktuierende Grenzflächen gegeben ist führt zu einer diffusen Intensitätsverteilung in die beiden übrigen Richtungen (q_x, q_y). Kor-

¹Dies gilt zunächst nur im (Vakuum-) Laborsystem. Beim Wechsel in das Probensystem sind Brechungseffekte zu berücksichtigen. Entsprechend dem Snelliusschen Gesetz müssen die gemessenen Einfalls- und Ausfallswinkel dann relativ zur Probe berechnet werden. In Kapitel 5.1 wird dies explizit verwendet.

relierte Fluktuationen der Membranstapel verschmieren die Intensitätsverteilung in diffusen Ebenen um die eigentlichen Bragg-Maxima (engl. *Bragg sheets*). Aus der diffusen Streuung erhält man Aussagen über laterale Strukturgrößen der fluktuierenden Grenzfläche, das heißt über die Höhenkorrelationsfunktion. Die spekuläre Richtung hingegen gibt Auskunft über Strukturgrößen wie etwa Schichtabstände und Dichteinhomogenitäten der Schichten.

Abb. 3.2 zeigt schematisch den reziproken Raum eines multilamellaren Membranstapels.

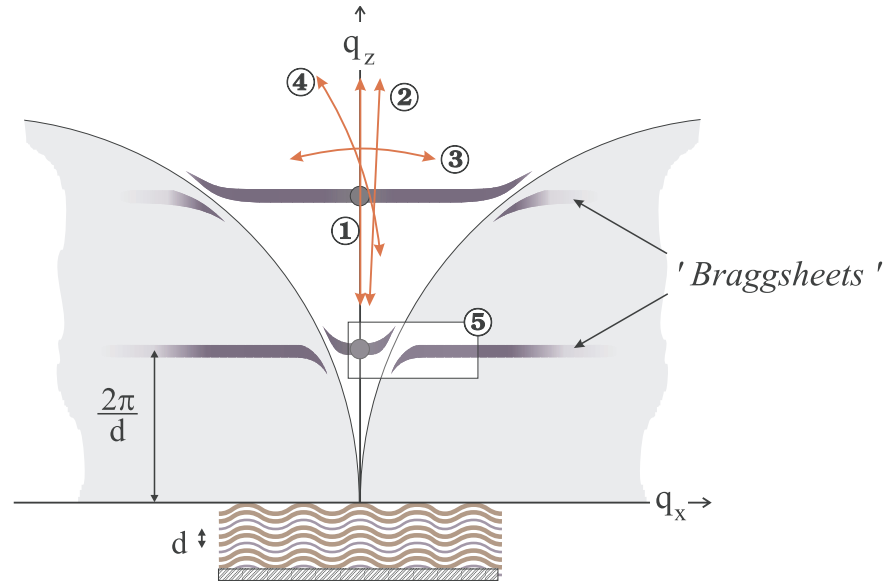


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Intensitätsverteilung von multilamellaren Membranstapeln im Reziproken Raum. Die periodische Struktur der Membranen mit Abstand d im Realraum führt bei $q_z = n \cdot 2\pi/d$ zu den sogenannten Bragg-Maxima. Lateral fluktuierende Grenzflächen verschmieren die zunächst deltaförmige Intensitätsverteilung entlang der q_z -Achse zu den sogenannten *Bragg sheets* in q_x und q_y -Richtung. In der Umgebung der beiden halbkugelförmigen Laue-Bereiche ($\alpha_i \leq 0$ oder $\alpha_f \leq 0$) ist die Intensitätsverteilung durch Brechungseffekte nach oben, bzw. nach unten verbogen. Die rot eingezeichneten Spuren stellen spezielle Meßmodi dar. Sie werden im Text erläutert.

Idealerweise würde man nun in einem Beugungsexperiment den gesamten reziproken Raum mit beliebig guter Auflösung vermessen, um einen vollständigen Datensatz zu erhalten. Neben den zu Verfügung stehenden Meßzeiten limitieren physikalische Überlegungen dieses Vorhaben: Der zugängliche Bereich des Impulsübertrags ist durch mehrere Tatsachen eingeschränkt. Zunächst kann nach der Ewaldkonstruktion der Absolutbetrag trivialerweise höchstens gleich dem doppelten Eingangsimpuls $4\pi/\lambda$ sein. Bei Absorption im Substrat, werden zusätzlich die beiden durch die Randbedingungen $\alpha_i \leq 0$ und $\alpha_f \leq 0$ definierten Laue-Halbkugeln zu 'verbotenen' Bereichen. Dadurch lassen sich bei kleinen q_z Werten in der Einfallsebene keine hohen Werte von $q_{||}$ erreichen. Durch Detektorpositionen außerhalb der Einfallsebene werden hohe laterale Impulsüberträge möglich, allerdings durch eine end-

liche Winkelauflösung unter Verlust der außergewöhnlich hohen Auflösung, durch die die Einfallsebene ausgezeichnet ist. Neutronen bieten durch eine meist vernachlässigbare Absorption im Substrat einen Vorteil, der sich z.B. für Rastermessungen der diffusen Streuung nutzen läßt.

Darüberhinaus beschränken auch noch die jeweiligen Signal- zu Untergrund-Verhältnisse jedes reale Experiment. Kompromisse müssen durch experimentelle Lösungen gefunden werden. Hierbei kommt der Streugeometrie eine besonders wichtige Rolle zu, da sie in starkem Maße den zugänglichen Bereich wie auch die Auflösung im reziproken Raum bestimmt.

Die gebräuchlichsten Meßmoden sind durch ihre eindimensionale Bahn im reziproken Raum charakterisiert (siehe rote Spuren in Abbildung 3.2 auf der vorherigen Seite).

Der *Reflektivitäts-Scan (1)*, mit dem man den unter der Bedingung $\alpha_i = \alpha_f$ den spekulär reflektierten Strahl mißt, zeichnet die Intensitätsverteilung entlang der q_z -Achse auf.

Im *Offset-Scan (2)* wird die α_i/α_f -Eichung absichtlich um einen *offset*-Winkel $\Delta\alpha_i$ dejustiert. Auf diese Weise läßt sich der diffuse Streubeitrag neben der spekulären Reflektivität messen und für den Streuuntergrundabzug unter der spekulären Reflektivität extrapolieren.

Im *Rocking-Scan (3)* steht der Detektor fest, die Probe wird um eine Drehachse senkrecht zur Reflexionsebene gedreht, so daß die Summe $\alpha_i + \alpha_f$ konstant bleibt. Mit dieser Messung läßt sich die Orientierungsverteilung, also die Mosaizität, der Probe bestimmen. Häufig wird mit einem eindimensionalen ortsauflösenden Detektor (PSD) gemessen. Der PSD mißt gleichzeitig die Intensitätsverteilung entlang einer *Detector-Scan (4)*. Mit Diffraktometersteuerprogrammen können auch beliebige andere Bahnen durch den reziproken Raum gelegt werden. Mehrdimensionale Rastermessungen (engl. *reciprocal space mappings (5)*) stellen nur einen Spezialfall dar.

Die verschiedenen Bahnen unterscheiden sich nicht nur durch ihre Lage im reziproken Raum, sondern auch drastisch in der Auflösung, da die nichtlinearen Gleichungen 3.2 die durch die Blendeneinstellungen, Einfallsdivergenz, Monochromator usw. vorgegebenen Winkелеlemente jeweils ganz unterschiedlich in den Reziproken Raum transformieren [Jeu 96, Sen 99]. So führt die hohe Auflösung im *Rocking-Scan* dazu, daß sich laterale Strukturen auf Längenskalen von einigen μ untersuchen lassen, wie es in klassischer Kleinwinkelstreuung unmöglich ist [Salditt 96]. Gleichzeitig erlaubt die nichtspekuläre Meßgeometrie den Zugriff auf Längenskalen bis hinunter zur Wellenlänge λ . Dieser hohe dynamische Bereich ist eine direkte Folge der Nichtlinearität der Gleichungen für q_x und q_y aus 3.2². Beispielsweise führt im *Rocking-Scan* eine kleine Änderung im Einfallswinkel $\alpha_i = \alpha \pm \Delta\alpha$ (bzw. $\alpha_f = \alpha \mp \Delta\alpha$) zu folgenden

²Wegen der zu geringen Primärstrahlintensität bei Neutronenstreuexperimenten läßt sich diese Dynamik faktisch allerdings nur mit Röntgenstreuungsmessungen außerhalb der Einfallsebene erreichen

Änderungen im parallelen und senkrechten Impulsübertrag

$$\Delta q_x = \pm \frac{4\pi}{\lambda} \sin \alpha \sin(\Delta\alpha) \simeq \pm \frac{4\pi}{\lambda} \alpha \Delta\alpha , \quad (3.4)$$

$$\Delta q_z = -\frac{4\pi}{\lambda} (\sin \alpha \cos(\Delta\alpha) - \sin \alpha) \simeq -\frac{2\pi}{\lambda} (\Delta\alpha)^2 . \quad (3.5)$$

Der *Rocking-Scan* wirkt in Hinblick auf q_{\parallel} gewissermaßen wie ein Vergrößerungsglas. Ähnlicherweise ergibt sich im *Detector-Scan* aus einer Änderung des Ausfallwinkels nur eine sehr geringe Änderung in q_{\parallel} , die jetzt jedoch mit einer großen Änderung in q_z verbunden ist, gemäß

$$\Delta q_x = -\frac{2\pi}{\lambda} \sin \alpha \sin(\Delta\alpha) \simeq -\frac{2\pi}{\lambda} \alpha \Delta\alpha , \quad (3.6)$$

$$\Delta q_z = -\frac{2\pi}{\lambda} \cos \alpha \sin(\Delta\alpha) \simeq -\frac{2\pi}{\lambda} \Delta\alpha . \quad (3.7)$$

Im q_y -Scan oder *GID-Scan* hingegen führt eine kleine Änderung $\Delta 2\theta$ bei konstantem q_z zu

$$\Delta q_y = \pm \frac{2\pi}{\lambda} \sin(\Delta 2\theta) \simeq \pm \frac{2\pi}{\lambda} \Delta 2\theta . \quad (3.8)$$

3.2 Meßaufbau für Streumessungen

Diffractionsstreuexperimente, wie sie in der Arbeit vorgestellt werden, haben alle einen ähnlichen Messaufbau, der sich von Kleinwinkelstreuexperimenten ein wenig unterscheidet. Es wird daher lediglich eine Prinzipskizze gezeigt:

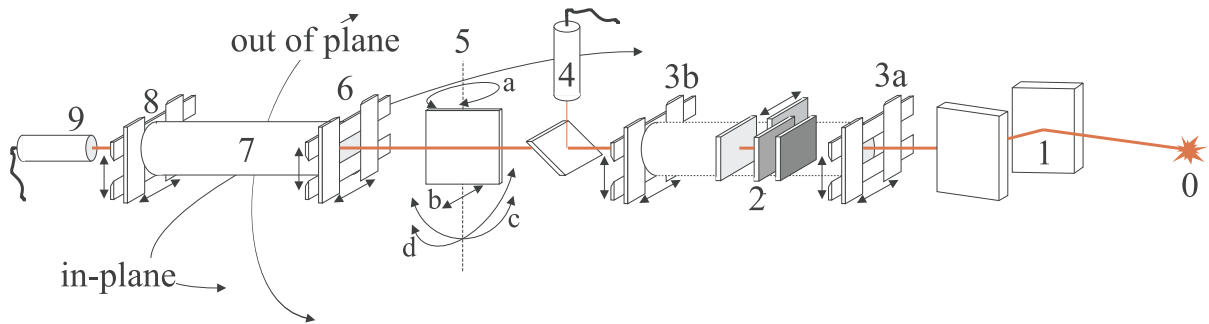


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung eines typischen Meßaufbaus bei Diffractionsstreuexperimenten.

Nach der Quelle (0) befindet sich eine Doppelkristallanordnung zur Monochromatisierung der einfallenden Strahlung (1). Durch leichtes Verstimmen der beiden Kristalle zueinander werden höhere harmonische der Strahlung, für die die Braggbedingung ebenfalls erfüllt ist,

eliminiert³. Über Absorber kann anschließend die Strahlintensität abgeschwächt werden(2). Damit bleibt man im linearen Bereich der Detektorzählstatistik und vermeidet außerdem eine Schädigung der Detektoren. Ein oder mehrere Blenden(3a,b) definieren den Strahl und eliminieren gegebenenfalls Streustrahlung von strahlaufwärtsstehenden Blenden. Ab jetzt befindet sich der Strahl nicht mehr im Vakuum. Als letztes Element vor der Probe befindet sich immer der Monitordetektor(4). Er detektiert die auf die Probe einfallende Intensität (5). Die Probe selbst ist auf einem Goniometer montiert, das mehrere Translations- und Rotationsfreiheitsgrade 5(a-d) aufweist. Nach der Probe hat man nur noch den Detektoraufbau. Er setzt sich aus der Gesichtsfeldblende (6), einem evakuierten Kollimatorrohr (7) und abschließender Detektorblende (8) vor dem Detektor (9) zusammen. Bei den sogenannten ‚in-plane‘-Messungen wird die Probe mit α_i und der Detektor mit α_f nur in der Einfallenebene gedreht (die Drehachse steht jeweils senkrecht in der Zeichenebene). Die ‚out-of-plane‘-Messungen erfordern Detektorpositionen, bei denen der Detektor in der Zeichenebene sozusagen nach oben oder unten bewegt wird ($2\theta_{out-of-plane}$ steht senkrecht zur Zeichenebene).

3.3 Strukturfaktor

3.3.1 Statistische Beschreibung einer selbstaffinen rauhen Grenzfläche

Eine einzelne Membran wird als fluktuierende rauhe Grenzfläche betrachtet, die sich mit der Höhenfunktion $h(x, y)$ parametrisieren lasse. Zur statistischen Beschreibung verwendet man im einfachsten Fall entweder die Höhendifferenzfunktion $g(\mathbf{r}=(x,y))$.

$$g(\mathbf{r}) \equiv \langle [h(0) - h(\mathbf{r})]^2 \rangle \quad (3.9)$$

oder die äquivalente Höhen-Höhen-Selbstkorrelationsfunktion $C(\mathbf{r})$

$$C(\mathbf{r}) \equiv \langle \delta h(0) \delta h(\mathbf{r}) \rangle. \quad (3.10)$$

Aus der Definition dieser beiden Korrelationsfunktionen folgt die Beziehung

³Die Braggreflexe dieser höherenergetischen Strahlung besitzen auf Grund von dynamischen Effekten eine mit zunehmender Energie abnehmende Winkelbreite (die sogenannte Darwinbreite). Sie reagieren folglich sehr viel empfindlicher auf Verstimmung der Braggbedingung.

$$g(\mathbf{r}) = 2\sigma^2 - 2c(\mathbf{r}). \quad (3.11)$$

σ ist die mittlere quadratische Rauigkeit der Grenzfläche. Im Falle einer Replikation der Morphologie über mehrere Grenzflächen hinweg, wird analog die Höhen-Höhen- Kreuzkorrelationsfunktion

$$c_{ij}(\mathbf{r}) \equiv \langle \delta h_i(0) \delta h_j(\mathbf{r}) \rangle \quad (3.12)$$

eingeführt. Aus der Höhen-Höhen-Selbstkorrelationsfunktion ($i = j$) kann die laterale Korrelationslänge ξ bestimmt werden. Diese gibt an, welche charakteristische Länge die größte, sich wiederholende Struktureinheit in der Ebene hat. Die Höhen-Höhen-Kreuzkorrelationsfunktion ($i \neq j$) enthält die Information über welche vertikale Längen, Strukturen bestimmter lateraler Größen korreliert sind. Beide können aus dem Strukturfaktor der diffusen Streuung bestimmt werden.

3.3.2 Strukturfaktor der diffusen Streuung

Eine allgemeine Darstellung findet sich in [Tolan 99] oder [Salditt 95D]. Mit der Annahme einer Gaußverteilung für h lautet der diffuse Anteil des differentiellen Streuquerschnitts in Bornscher Näherung:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} \sim (L_x L_y) \frac{\exp[-(q_z)^2 \sigma^2]}{(q_z)^2} \int_0^{L_x} dx \int_0^{L_y} dy (\exp[(q_z)^2 c(r)] - 1) \exp[-i(q_x x + q_y y)]. \quad (3.13)$$

$L_x L_y$ ist die durch den Strahl beleuchtete Fläche .

Für den Fall, daß das System auf großen Längenskalen als glatt angesehen werden kann, wenn also $c(r) \rightarrow 0|_{r \rightarrow \infty}$ kann man den spekulären und den diffusen Anteil zum Strukturfaktor trennen

$$S(q) = S_{spek.}(q) + S_{diff.}(q). \quad (3.14)$$

Die kinematische Beschreibung der Streuung ist nur für geringen Streuwirkungsquerschnitt und große Winkel $\alpha_i, \alpha_f \gg \alpha_c$ gültig, insbesondere wenn Brechungseffekte vernachlässigt werden können. Die erste Näherung stellt im realen Experiment kein Problem dar, die zwei-

te Bedingung ist hingegen häufig nicht erfüllt. Die Fresnelsche Transmissionsfunktion $t(\alpha_{i,j})$ beeinflußt im Bereich $\alpha_i, \alpha_f \approx \alpha_c$ den Intensitätsverlauf erheblich und führt auf Grund der resonanten Feldüberhöhung zu den sogenannten Yoneda-Maxima der diffusen Streuung [Yon 63]. Als reines Brechungsphänomen ist darin letztlich keine Information über die Grenzflächenstruktur enthalten. S. Sinha hat gezeigt [Sin 88], daß im Rahmen der *distorted-wave Born approximation (DWBA)* der differentielle Streuquerschnitt für kleine Winkel neben einigen Vorfaktoren im wesentlichen in die Fresnelschen Transmissionsfunktionen für den einfallenden bzw. ausfallenden Wellenvektor $t(\alpha_{i,f}) = (2 \sin \alpha_{i,f}) / (\sin \alpha_{i,f} + n \sin \alpha'_{i,f})$ und den Strukturfaktor $S(\mathbf{q}')$ faktorisiert:

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} \sim (L_x L_y) |t(\mathbf{k}_i)|^2 |t(\mathbf{k}_f)|^2 S(\mathbf{q}') . \quad (3.15)$$

Der Strukturfaktor $S(\mathbf{q}')$ enthält die für die Höhenkorrelationsfunktion $c(r)$ relevante Information

$$S(q'_z, q_x, q_y) = \frac{\exp[-\text{Re}(q'_z)^2 \sigma^2]}{|q'_z|^2} \int_0^\infty dr r (\exp[|q'_z|^2 c(r)] - 1) J_0(q_{\parallel} r) , \quad (3.16)$$

wobei J_0 die Bessel Funktion erster Art und nullter Ordnung bezeichnet⁴.

Der Strukturfaktor ist sowohl in Bornscher, als auch DWBA Näherung proportional zur Hankeltransformierten der normierten Höhenkorrelationsfunktion $c(r)$. Im Grenzfall kleiner Rauigkeiten $(q_z \sigma)^2 \leq 1$) reduziert sich die Gleichung 3.16 zur Fouriertransformierten der normierten Höhen-Höhen-Korrelationsfunktion. Durch Rücktransformation kann sie aus dem Strukturfaktor bestimmt werden [Salditt 95D].

Für die Beschreibung von Membranstapeln kann man auf den Strukturfaktor auf Multischichtsysteme verallgemeinern [Sin 94]:

$$S(\mathbf{q}) = \frac{L_x L_y}{q_z^2} \sum_{i,j}^N \Delta\rho_i \Delta\rho_j e^{-\frac{1}{2} q_z^2 (\sigma_i^2 + \sigma_j^2)} e^{-iq_z (h_i - h_j)} \epsilon_{ij}(\mathbf{q}) , \quad (3.17)$$

mit

$$\epsilon_{ij}(\mathbf{q}) = \int dx \int dy \left(e^{q_z^2 c_{ij}(r)} - 1 \right) e^{-i(q_x x + q_y y)} , \quad (3.18)$$

wobei $\Delta\rho_i$ der Streukontrast und σ_i^2 die mittlere quadratische Rauigkeit der i -ten Grenzfläche bezeichnet.

⁴Im Gegensatz zu Gl.3.13 ist hier Isotropie der Funktion $c(r)$ angenommen worden, so daß sich die zweidimensionale Fouriertransformation mit Hilfe der Besselfunktion schreiben läßt. Dies ist im Falle von 2D smektisch-flüssigkristallinen Strukturen eine sinnvolle Annahme

Im Ergebnis sieht man also bei einem lateralen Impulsübertrag von $q_{\parallel} \ll 1/\xi_i$ im wesentlichen N statistisch äquivalente Grenzflächen. Im Falle vollständig unkorrelierter Grenzflächen ($c_{ij}(r) = 0$), werden die gestreuten Wellen inkohärent überlagert und man erhält den N -fachen Streuquerschnitt einer einzelnen Grenzfläche. Im Falle partiell korrelierter Grenzflächen, bei denen die Kreuzkorrelationen nicht verschwinden, ergibt dies eine Modulation der diffusen Intensität entlang q_z mit charakteristischen Maxima an den Positionen $q_z = 2\pi/d$, den sogenannten diffusen *Bragg sheets*. Die Intensität dieser Braggebenen (kohärente Streuung) stammt vom korrelierten Anteil der Grenzflächenrauhigkeit, die Intensität zwischen den Braggebenen (inkohärente Streuung) entsprechend vom unkorrelierten Anteil.

Kreuz- und die Selbstkorrelationen lassen sich getrennt bestimmen [Salditt 94, Salditt 96]. Die über eine Brillouinzone der Multischicht $\Delta q'_z = 2\pi/d$ gemessene Intensitätsverteilung wird auf zwei verschiedene Arten ausgewertet. Für die Bestimmung der Höhen-Höhen-Korrelation (in einer Grenzschicht) wird die integrierte Intensitätsverteilung, die dann bereits ein Maß für den Strukturfaktor darstellt in Abhängigkeit vom lateralen Impulsübertrag ausgewertet. Kohärente und inkohärente Anteile der diffusen Streuung werden gleichermaßen aufsummiert. Dadurch ergibt sich im wesentlichen der N -fache Streuquerschnitt einer Einzelschicht. Es müssen keine Annahmen über spezielle Kreuzkorrelationen getroffen werden. Zur Bestimmung der Kreuz-Höhen-Höhen-Korrelation (über mehrere Grenzflächen) wird die Halbwertsbreite der diffusen Streuung entlang einer Brillouinzone der Multischicht $\Delta q'_z = 2\pi/d$ in Abhängigkeit des lateralen Impulsübertrags ausgewertet.

In Kapitel 5.1 werden Messungen vorgestellt, die dieses Konzept verwenden. Mit nicht-spekulärer diffuser Neutronenstreuung wurden hochorientierte multilamellare Phospholipidmembranen (DMPC) mit und ohne Zusatz des antibiotischen Peptids Magainin2 untersucht und dabei neutronenspezifische Vorteile explizit neu verwendet.

3.4 AFM

Neben Streumethoden wurde auch die Oberflächentopographie der Proben auf der Nanometerskala mit einem kommerziellen *Bioscope* Rasterkraftmikroskop (*Atomic Force Microscope AFM*) abgebildet. Beim AFM tastet eine feine Spitze am Ende einer empfindlichen Blattfeder, dem sogenannten *Cantilever* (Microlever, Park Scientific, Santa Barbara, CA; nominelle Federkonstante 0.03 N/m) auf einem quadratischen 2^n Raster Teile der Probe ab. Die Messungen wurden im *Contact-Mode* Verfahren durchgeführt. Mittels Piezo-Nachregelung wird die Auflagekraft der Abtastspitze auf der Probe konstant gehalten. Die am Piezokristall angelegte Spannung wird in ein Höhensignal umgerechnet und aufgezeichnet (Abbildung 3.4 a)). Die Feinkorugationen oder scharfe Kanten der Oberfläche können nicht mit der Piezoregelung ausgeglichen werden. Deshalb wird zusätzlich die Auslenkung eines auf dem Lever reflektierten Laserstrahls mit einer ortsempfindlichen Photodiode ausgewertet (Abbildung 3.4 b)). Die Abbildungen 3.4 und 3.5 zeigen Ausschnitte der Oberfläche einer multilamellaren

DMPC-Probe in der P'_β -Phase. Die Abtastrichtung verläuft parallel zum unteren Bildrand. Auffällig ist vor allem die Oberflächentopographie. Die Höhe der Domänen entspricht hier immer einigen 10 Lipiddoppelschichten.

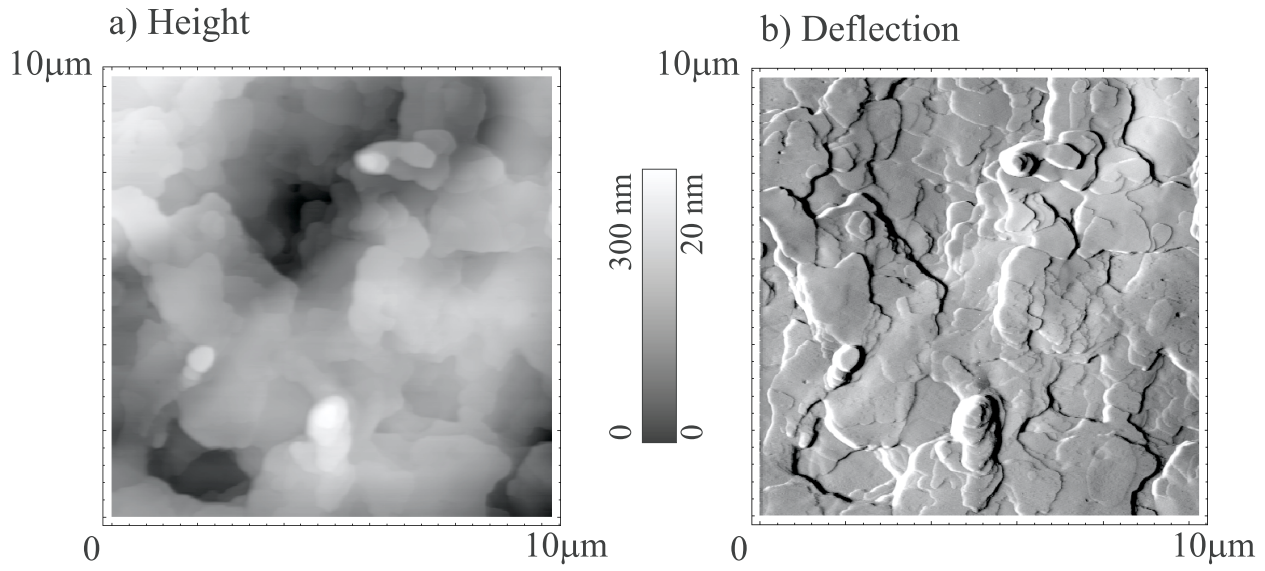


Abbildung 3.4: Kraftmikroskopische Rastermessung an einer multilamellaren DMPC Probe in der gelartigen P'_β -Phase. Die Abtastrichtung verläuft parallel zum unteren Bildrand. (Die Bilder wurden freundlicherweise von J.Domke, Arbeitsgruppe Prof. Gaub, CENS aufgenommen.)

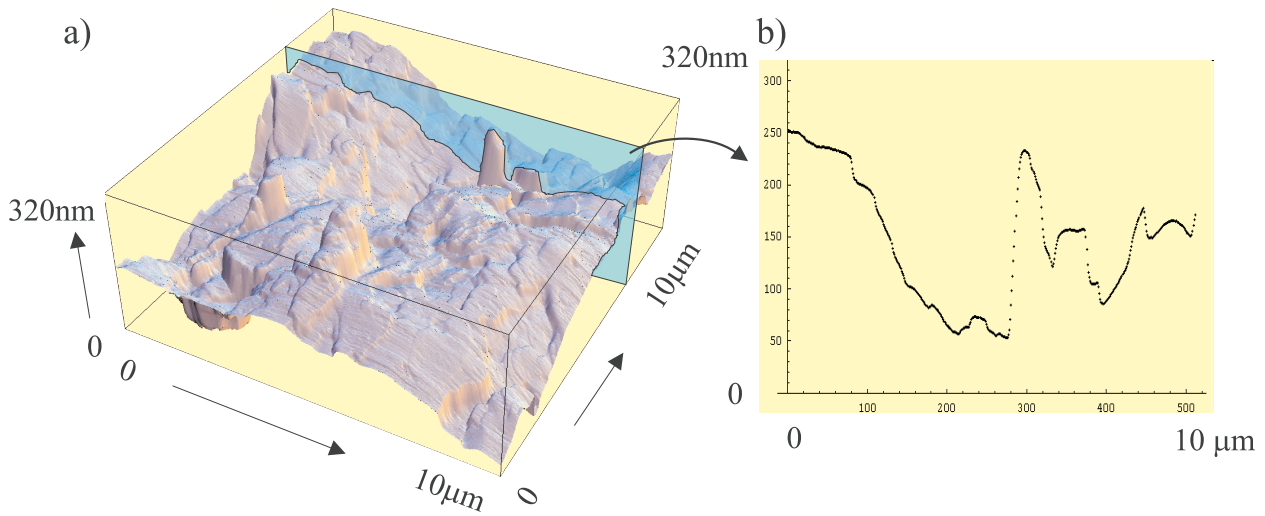


Abbildung 3.5: a) Die in Abbildung 3.4 gezeigte AFM-Messung im 3-dimensionalen Profil. b) Schnitt durch das gemessene Höhenprofil.

Um das Vorhandensein einer Vorzugsrichtung zu überprüfen wurde die Höhendifferenzfunktion $g(\mathbf{r})$ bestimmt. Als Pattersonfunktion trägt sie keine Phaseninformation. Sie ist sehr leicht durch zweimalige Fouriertransformation zu bestimmen. Lediglich zwischen Fourierhin-

und Fourierreücktransformation bildet man den Absolutwert und erreicht damit den Phasenverlust.

$$g(\mathbf{r}) \propto \mathcal{F}ourier^{-1}(|\mathcal{F}ourier(Datenmatrix)|) \quad (3.19)$$

Es war keine Vorzugsrichtung auszuweisen. Die Höhendifferenzfunktion $g(\mathbf{r})$ des Deflection-Bildes enthält damit ein direktes Abbild der Abtastspitze (Abbildung 3.6).

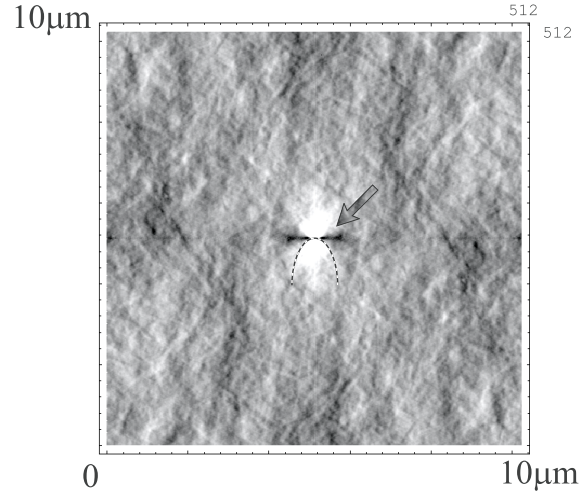


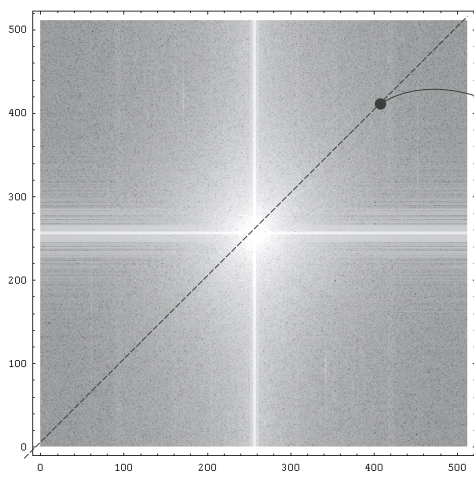
Abbildung 3.6: Aus einem gleichmäßigen Bild, ohne Vorzugsrichtung, wie es das Deflection-Bild aus Abbildung 3.4 b) darstellt, wird in der Höhendifferenzfunktion $g(\mathbf{r})$ ein direktes Abbild der Abtastspitze sichtbar (Pfeil) (Die Abtastrichtung verläuft parallel zum unteren Bildrand.).

Darüberhinaus konnte der Strukturfaktor des Lipidsystems aus der einfachen, diskreten Fouriertransformation bestimmt werden. Der Abfall wurde mit $S(q) \propto q^{-2.54 \pm 0.06}$ bestimmt (Abbildung 3.7).

Da das System aber letztlich für Untersuchungen im Bezug auf die Lipid/Peptidwechselwirkung in der fluiden L_α -Phase zu weich war⁵, fehlte die nötige Auflösung. Es wurden keine weiteren Experimente durchgeführt.

⁵Wegen der Weichheit des Systems konnte nur in der Gelphase untersucht werden. Beim Übergang in die fluide L_α -Phase verklebten mitgeführte Teile der Probe mit der Abtastspitze. Wegen der veränderten Spitzeneigenschaften konnte nicht weiter gemessen werden.

a)



b)

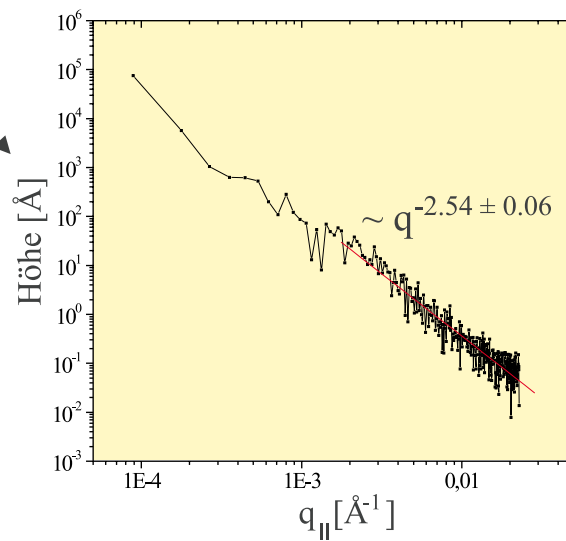


Abbildung 3.7: a) Zweidimensionale, diskrete Fouriertransformation des Datensatzes aus Abbildung 3.4. Die hellen gekreuzten Streifen sind Artefakte der diskreten Fouriertransformation und haben nichts mit der Struktur der Probe zu tun. b) Der aus dem Schnitt in a) bestimmte Strukturfaktor.

Kapitel 4

Probenpräparation

4.1 Probenpräparation

Die Membranstapel werden nach einer Methode präpariert, wie sie von Seul und Sammon vorgeschlagen wurde [Seul 90]. Die zu untersuchenden Systeme sollen dazu auf eine glatte Trägersubstanz aufgebracht werden. Es eignen sich hierzu Floatglas oder industriell gefertigte, einkristalline, polierte Silizium Wafer. Diese sind dem Glassubstrat vorzuziehen, da sie durch ihre Kristallinität bei Streuexperimenten deutlich weniger Streuuntergrund verursachen. In einem Standardreinigungsverfahren werden die Substrate gereinigt. Ziel ist es letztlich das Substrat zu säubern und hydrophil zu machen. An dieser Stelle seien zwei Verfahren genannt, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Nach mehrmaliger Anwendung von Methanol werden die Substrate mit Reinstwasser (MQ, Millipore, $\rho \geq 18 \text{ M } \Omega$) gewaschen; anschließend ätzt man mit 5M Kaliumhydroxid (KOH) in Ethanol (C_2H_5OH) (hier ist Vorsicht geboten, da das KOH die Oberfläche aufrauen kann und somit störende Streubeiträge durch Substratrauhigkeit hervorgerufen werden). Danach wird mehrmals mit Reinstwasser gereinigt.

Alternativ eignet sich auch das industriell eingesetzte sogenannte RCA Reinigungsverfahren. Dabei werden die Substrate in nur einem Reinigungsschritt in eine Lösung aus Wasserstoffperoxid, Ammoniak und Reinstwasser $H_2O_2 : NH_3 : H_2O = 1 : 1 : 5$ gelegt. Abschließend wird mehrmals mit Reinstwasser gespült.

Danach beginnt der Trocknungsvorgang. Die gereinigten Wafer werden mit handelsüblichem Stickstoff trockengeblasen und auf eine absolut waagerechte Unterlage für den eigentlichen Spreitvorgang bereitgestellt. Jetzt werden definierte Lipid-Peptid Mischungen in organisches Lösungsmittel (Isopropanol, Chloroform, Methanol, Trifluorethanol) gebracht und auf die Silizium Wafer gespreitet. Dieser einfache Sachverhalt wird aber in der praktischen Durchführung dadurch erschwert, daß man ein Lösungsmittel finden muß, das zum einen das Substrat vollständig benetzt und andererseits das Lipid-Peptidsystem vollständig und zerstörungsfrei auflöst. Nach dem Spreiten ist darauf zu achten, daß das Lösungsmittel sehr

langsam verdunstet, um dem Lipid- Peptid System die Möglichkeit zu geben sich langsam und somit möglichst gut zu ordnen. Die Substratfläche soll nach dem Trocknungsvorgang möglichst vollständig mit Lipid bedeckt sein. Aus dem so hergestellten Zwischenprodukt wird abschließend in einem Exsikkator das Lösungsmittel über mindestens 24 Stunden extrahiert. Die anschließende Hydrierung und Temperierung um den Gel-Flüssig Hauptphasenübergang herum soll mögliche Defekte in den Membranstapeln ausheilen helfen und zu der guten benötigten Orientierung beitragen. Dabei wurden Mosaizitäten von besser als 0.02° reproduzierbar erreicht.

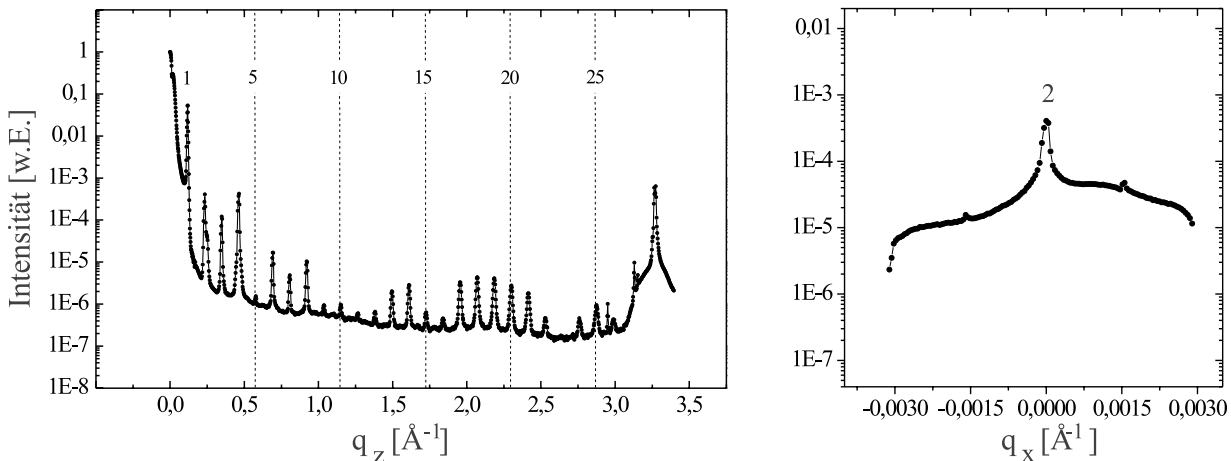


Abbildung 4.1: Der hohe Grad der Orientierung wird an dieser Probe aus reinem DMPC-Lipid deutlich. In einer Reflexivitätsmessung zur Probenvorcharakterisierung wurden bei Raumtemperatur (23°C) und einer Luftfeuchtigkeit um 60 % mehr als 25 Braggmaxima beobachtet. Am Ende der Reflexivitätskurve werden bereits Ausläufer des Substrat-Silizium-Reflexes sichtbar. In einer typischen angularen Messung am 2. Braggmaxima hat die spekuläre Richtung eine Breite von 0.00012 \AA^{-1} , bei Mo $K_{\alpha 1}$ -Strahlung entsprechend einer Mosaizität der Probe von 0.02° .

Typische Mengen von 0.1 ml Lösung mit 4 mg bis 20 mg gelöstem Lipid ergaben auf einer $15 \times 15 \text{ mm}^2$ großen Substratfläche eine mittlere Filmschichtdicke von $D \approx 10 \text{ \mu m}$.

Die verwendeten Chemikalien sowie das Peptid Alamethicin wurden von Sigma Aldrich (Deisenhofen) geliefert. Die Lipide stammen von Avanti Lipids (Alabama, USA); sie wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Das Peptid Magainin2 wurde in der Gruppe von B.Bechinger am Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) durch *solid-phase* Peptidsynthese hergestellt. Der automatische Peptidsynthetisierer Millipore 9030 verwendet das chemische Fmoc-Verfahren. Die Peptide wurden anschließend durch HPLC (high pressure liquid purification column) in einer Nucleosil 300-7 C4 Säule (Macherey and Nagel, Düren, Germany) und einem Wasser / Acetonitril Gradient unter Beisein von 0.1 % Trifluoressigsäure gereinigt. Die Identität und Reinheit des Peptids wurden durch *matrix-assisted laser desorption mass spectrometry* (MALDI-MS) analysiert.

4.2 Probenumgebung

Membrane aus Lipiden machen einen wesentlichen Bestandteil biologischer Systeme aus. Entsprechend ist es die Grundvoraussetzung, diese Systeme in biologisch relevanter Umgebung zu untersuchen (fluide L_{α} -Phase). Die Experimente finden unter Atmosphärendruck statt. Außerdem benötigt man eine hohe Luftfeuchtigkeit und „warme“ Temperaturen. Die Temperatur soll kontrollierbar sein. Zumindest aber soll die Probe bei einer bestimmten Temperatur konstant gehalten werden können. Die Proben werden bei stabiler Temperierung entweder in einer vollgesättigten Wasserdampfatmosfera (partiell hydratisiert) oder in direktem Kontakt mit Exzeßwasser (vollständig hydratisiert) vermessen. Dazu war es notwendig eine Probenumgebung zu konstruieren, die beide Bedingungen erfüllt. Zur stabilen Temperierung während der Streumessungen wurde die in Fig 4.2 dargestellte Kammern entworfen.

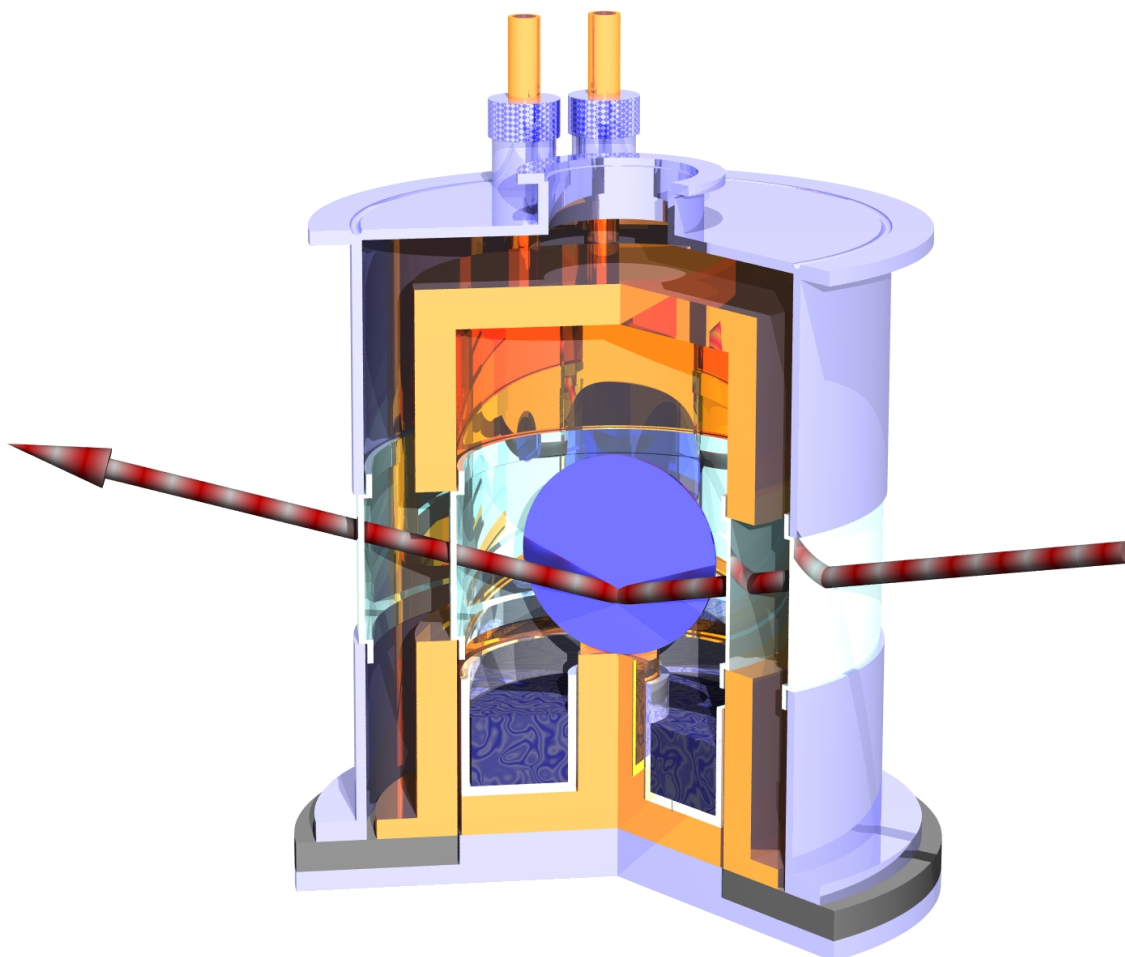


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Hydrier- und Temperierkammer. Eine Beschreibung findet sich im Text.

Sie besteht aus innerem (orange) und äußerem (stahlblau) Kammerteil. Die innere Kammer

wird gleichmäßig von einem Temperierflüssigkeitskreislauf durchströmt, der von einem handelsüblichen Kühl- und Heiztemperiergerät der Firma JULABO aufrecht erhalten wird. Ein Platin-Dünnschichtwiderstand (Pt100) zur Temperaturrückkopplung ist direkt am Öleinflaß zur inneren Kammer befestigt. Zur Steuerung verwendet das Gerät iterativ gefundene Regelparameter (PID-Regelung), die Wärmeverluste der Zuleitungen und die Temperaturträgheit der Kammer kompensieren. Der Zwischenraum zwischen innerer und äußerer Kammer wird evakuiert ($5 \cdot 10^{-3}$ mbar) um Wärmeverluste durch Konvektion und Wärmeleitung zu minimieren. Durch diese Konstruktion konnte die erreichte Temperaturstabilität am Probenort in einer Temperaturmessung über mehrere Tage mit $\pm 0.01^\circ \text{C}$ bestimmt werden. Temperaturänderungen in dieser Größenordnung führen zu einer geringfügigen Reduzierung des Sättigungsgrades des Wasserdampfes, was wiederum signifikant das Quellverhalten der multilamellaren Stapel beeinflusst [Kat 98]. Bei dieser Kammer kann man die Strahleintritts- und Strahlaustrittsfenster je nach Bedarf für Röntgen- bzw. Neutronenstreuung auswechseln. Während im Röntgenfall Kaptonfenster zum Einsatz kommen, verwendet man bei Neutronenstreuung Fenstern aus Reinstaluminium. Mit dieser Kammer hat man nun die Möglichkeit Proben partiell hydratisiert bei stabiler Temperierung zu vermessen. Dabei wird die Probe (hier als blaue Scheibe) frei über einem Feuchtigkeitsreservoir gehalten, um freien Ein- und Austritt des Strahls zu gewährleisten. Mit verschiedenen gesättigten Salzlösungen im Feuchtigkeitsreservoir kann dabei der Grad der partiellen Hydratisierung eingestellt werden (z.B. NaCl 76.9 % , siehe z.B. J.Scientific Instr. 25 (1948)).

Bei der vollständigen Hydratisierung wird die Probe in einer eigenen Kammerung in direktem Kontakt mit Exzeßwasser vermessen. Diese Kammerung wird dann von der Kammer aufgenommen und ebenfalls stabil temperiert. Die Temperaturstabilität liegt hier wegen der Trägheit des Wasserreservoirs im Bereich von $\pm 0.005^\circ \text{C}$.

Kapitel 5

Auswertungen

Hochorientierte multilamellare Membranstapel kamen in der Streuung bisher nicht in breitem Umfang zum Einsatz. Vergleichende Messungen zu den Peptid-Lipidsystemem konnten sich also immer nur auf Lipide in wässriger Lösung beziehen, oder auf Lipidmonoschichten, die an der Luft-Wassergrenzfläche untersucht wurden. Deshalb wurden zuerst Referenzmessungen an reinen Lipiden durchgeführt.

Speziell für Neutronendiffraktometrie wurde ein neues Konzept zur Messung des Struktur factors vorgestellt, das dann später als Voraussetzung für Untersuchungen an DMPC/Magainin Proben verwendet wurde. Bei der Röntgenstreuung wurde neben Reflektivitätsmessungen die Beugung unter streifenden Winkeln verwendet.

5.1 Diffuse Neutronenstreuung an reinen Lipiden

Diffuse (nichtspekuläre) Neutronenstreuung ist ein ideales Werkzeug zum Studium hochorientierter multilamellarer Phospholipidmembrane. Durch den niedrigen Absorptionskoeffizienten von Silizium kann das Substrat, auf dem die Membrane orientiert sind, als transparent angenommen werden. Ein Wechsel von Transmissions- in Reflexionsgeometrie kann also nahtlos erfolgen, ohne durch den Probenhorizont, wie dies bei Röntgenstreuung leicht der Fall sein kann, limitiert zu sein. Im Gegensatz zur diffusen Röntgenstreuung außerhalb der Einfallsebene (*out-of-plane*) kann hier mit Neutronen innerhalb der Einfallsebene (*in-plane*) gemessen werden. Dadurch ist ein großer lateraler Impulsübertrag mit hoher Auflösung zugänglich, der mit Röntgenstrahlen nicht erreichbar ist. Bei der Reflexion unter streifenden Winkeln sind sowohl der einfallende als auch der ausfallende Winkel positiv. In Transmission nimmt entweder der einfallende oder der ausfallende Wellenvektor mit der Probe einen negativen Winkel ein. Beim Übergang von Reflexions- in Transmissionsgeometrie gibt es damit zwangsläufig einen Bereich, in dem der ausfallende oder der einfallende Strahl mit der Probe einen Winkel in der Größenordnung des kritischen Winkels α_c der Totalreflexion einschließt.

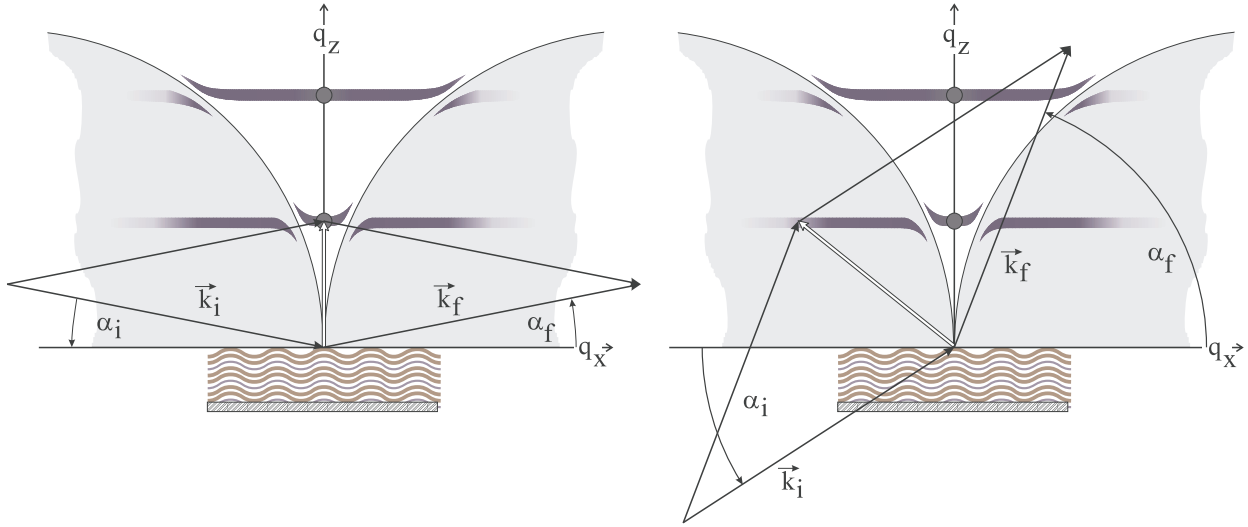


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des Streuexperiments im reziproken Raum in Reflexions- bzw. Transmissionsgeometrie. Bei der Reflexionsgeometrie nehmen sowohl der einfallende als auch der ausfallende Strahl mit der Probe einen positiven Winkel ein. Die beiden grauen halbkugelförmigen Bereiche sind jene bei denen ein Winkel negativ wird.

Dabei treten dynamische Brechungseffekte auf, die rein optischer Natur sind und nichts mit der eigentlichen Struktur der Probe zu tun haben¹. Sie können verstanden werden, wenn man die einfallenden und ausfallenden Winkel im Vakuumsystem in das Probensystem überträgt.

$$\alpha_i := 0.5 \arccos\left(1 - \frac{qx^2 + qz^2}{2k^2}\right) + \arctan\left(\frac{qx}{qz}\right) \quad (5.1)$$

$$\alpha_f := 0.5 \arccos\left(1 - \frac{qx^2 + qz^2}{2k^2}\right) - \arctan\left(\frac{qx}{qz}\right)$$

$$\alpha'_i := \operatorname{Re}\left(\sqrt{-\alpha_c^2 + \alpha_i|_{vacuum}(qx, qz)^2}\right) \operatorname{Sign}(\alpha_i|_{vacuum}(qx, qz)) \quad (5.2)$$

$$\alpha'_f := \operatorname{Re}\left(\sqrt{-\alpha_c^2 + \alpha_f|_{vacuum}(qx, qz)^2}\right) \operatorname{Sign}(\alpha_f|_{vacuum}(qx, qz)),$$

hierin ist $k = 2\pi/\lambda$ der Vakuumwellenvektor. Die verwendeten Größen für den Einfallswinkel α_i bzw. Ausfallswinkel α_f sind im Probensystem mit einem Strich versehen. Linien mit konstantem vertikalem Impulsübertrag im Medium können nun berechnet werden.

$$q'_z = k \left(\sin(\alpha'_f(qx, qz)) + \sin(\alpha'_i(qx, qz)) \right), \quad (5.3)$$

¹Im Übergangsbereich fehlt außerdem gestreute Intensität durch die Anregung der evaneszenten Welle im Medium.

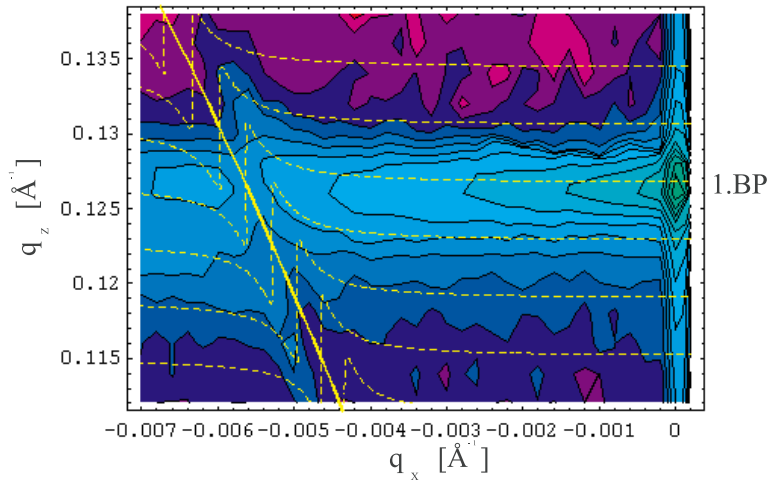


Abbildung 5.2: Reziproke Rastermessung an einer multilamellaren, partiell hydratisierten DMPC Probe im fluiden L_α -Zustand. Zu sehen ist der Bereich um das 1.Braggmaximum in den Grenzen $q_z \in \{0.112 \text{ \AA}^{-1}, 0.138 \text{ \AA}^{-1}\}$ und $q_x \in \{-0.007 \text{ \AA}^{-1}, +0.0002 \text{ \AA}^{-1}\}$. Durch lateral fluktuierende Grenzflächen ist die Intensitätsverteilung um das Braggmaximum zu sogenannten Braggsheets ausgeschmiert. Die durchgezogene gelbe Linie stellt einen Teil der *Laue*-Kugel dar. In deren unmittelbarer Umgebung werden die besprochenen Brechungseffekte sichtbar. Die gestrichelten Linien stellen Linien mit konstantem vertikalem Impulsübertrag im Medium dar.

Eine wichtige Größe, die direkt aus den Daten bestimmt werden kann, ist die Halbwertsbreite eines Schnittes entlang q_z als Funktion des lateralen Impulsübertrags q_x . Die Halbwertsbreite ist indirekt proportional zur vertikalen Korrelationslänge ξ_\perp . Sie ist ein Maß, über welche Länge ξ_\perp sich die Morphologie (z.B. korrelierte Fluktuationen) einer unteren Grenzfläche in die darüberliegende abbildet. Nach dem Caille Modell [Cai 72] wird eine quadratische Abhängigkeit der Halbwertsbreite als Funktion des lateralen Impulsübertrags erwartet

$$\omega = \lambda q_\parallel^2. \quad (5.4)$$

Die Proportionalitätskonstante $\lambda := \sqrt{K/B}$ ist eine Funktion der elastischen Konstanten des Systems. Dieses Verhalten konnte im allgemeinen nicht beobachtet werden. Überraschend tritt bei großen Impulsüberträgen q_x eine Sättigung ein. Im partiell hydratisierten Fall einer DMPC Probe entspricht der Sättigungswert etwa 700 \AA , das sind ungefähr 14 Membrandoppelschichten. Außerdem wird bei kleinen Impulsüberträgen statt des quadratischen Zusammenhangs mit q_\parallel ein exponentielles Verhalten beobachtet. Im vollständig hydratisierten Fall kann der Bereich kleiner lateraler Impulsüberträge quadratisch mit $\lambda = 130$ angepaßt werden (roter Graph in Abbildung 5.3 a). Allerdings tritt auch bei großen lateralen Impulsüberträgen eine Sättigung ein. Der Wert hierfür ist im Vergleich zum partiell hydratisierten Fall ungefähr doppelt so groß.

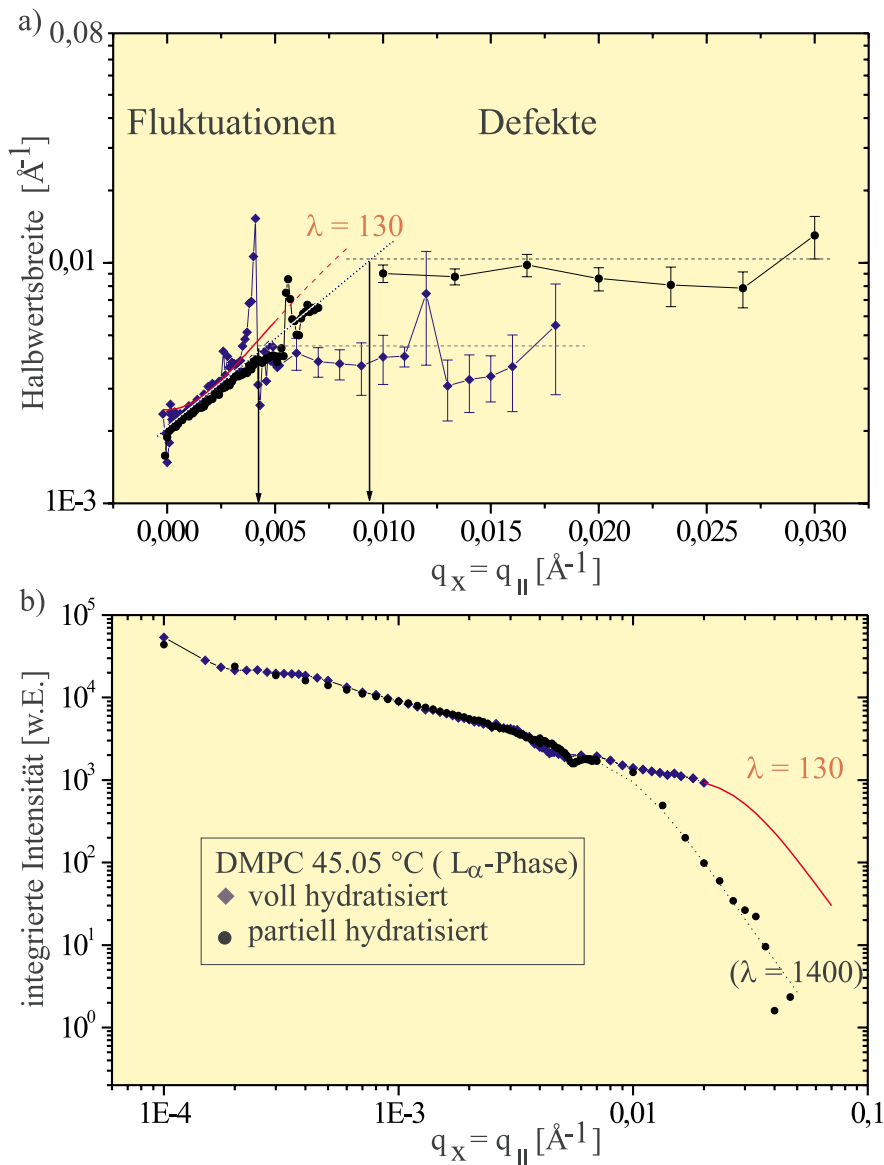


Abbildung 5.3: Aus der Reziproken Rastermessung Abb.5.2 ausgewertete a) Halbweitsbreite als Maß für die Kreuz-Höhen-Höhenkorrelationsfunktion und b) integrierte Intensität als Maß für die Höhen-Höhenkorrelationsfunktion. Die schwarzen Kreise zeigen eine partiell hydratisierte Messung, die blauen Diamantsymbole stehen für dieselbe Messung im voll hydratisierten Zustand an einer multilamellaren DMPC Probe in der fluiden L_α -Phase. Die Kurven wurden mit Gleichung 5.8 angepaßt.

Der Einfluß der durch das Substrat erzwungenen Randbedingung könnte ein möglicher Ansatzpunkt sein. Bei einer Gesamtschichtdicke von $10 \mu\text{m}$ scheint aber eine Beeinflussung der Fluktuationen im Bereich einiger hundert \AA doch unwahrscheinlich. Untersuchungen an Systemen mit deutlich niedrigerer Biegesteifigkeit könnten den Sachverhalt erhellen.

Bisher wurde implizit nur von fluktuierenden Membranen als Ursache für die diffuse Streuung ausgegangen. Die auftretenden Fluktuationen werden im Caille Modell [Cai 72] als hinreichend klein vorausgesetzt, sodaß nichtlineare Terme in der Freien Energie vernachlässigbar bleiben. Außerdem muß die Annahme erfüllt sein, daß die thermische Unordnung über die statische, topologische Unordnung dominiert. Statische Defekte und Poren in Membranstapel kommen für die diffuse Streuung ebensogut in Frage. Punkt- oder Liniendefekte führen in smektischen Systemen zu langreichweitigen Verzerrungsfeldern. So führt z.B. ein Punktdefekt an dem lokal der Membranabstand auf \tilde{d} fixiert ist, zu einem Verzerrungsfeld [Sens 97/2]

$$u(r, z) = -\frac{(d - \tilde{d})d}{4z} \exp[-r^2/4\lambda|z|] . \quad (5.5)$$

Die Störung wirkt also auf einen Bereich, der durch die Parabel $r^2 = 4\lambda z$ definiert ist. Vertikal fällt die Störung sehr langsam mit $1/z$ ab. Damit ist klar, daß Defekte nicht mehr wie üblich vernachlässigt werden dürfen. Tatsächlich sind reale Systeme sind nicht frei von Defekten. Sie entstehen zwangsläufig bei der Präparation hochorientierter Filme². Sie wurden bislang in der Literatur nur kaum beachtet. Das mag mit daran liegen, daß Defektstreuung ohne die Voraussetzung der Hochorientierung der Membranstapel nicht beobachtet werden kann, weil der Defektring der Poren genau mit den lamellaren Braggmaxima zusammenfällt (siehe dazu die Abbildung 5.4). Bei Pulvermessungen an Membranen in wäßriger Lösung oder schlecht orientierten Proben entzieht er sich damit der Betrachtung. Bei der Untersuchung hochorientierter Proben unter streifendem Einfall sieht man dagegen folgendes: Die diffusen Braggebenen, die von fluktuierenden Schichten kommen, werden in einem ringförmigen Streubild fortgesetzt, das allerdings von statischen Defekten in Membranstapeln herrührt.

Einen weiteren wichtigen Hinweis auf die These von Streuung durch Membrandefekten erhält man aus der Auswertung des Strukturfaktors. Dazu wird die über eine Brioullin-Zone entlang q_z integrierte Intensität als Funktion von q_x bestimmt. Wie in Kapitel 3.3.2 bereits erwähnt fallen nach dem Strukturfaktor in Gleichung 3.17 damit alle kreuzkorrelierten Terme heraus und man erhält die Höhen-Höhen-Selbstkorrelationsfunktion. Der erhaltene Strukturfaktor kann als der einer, im Mittel fluktuierenden, Grenzfläche angesehen werden. Im Experiment sehen wir bei 0.0094\AA^{-1} einen Übergang von einer flachen in eine steile Steigung, die für große q_x mit $q^{-(3.79\pm 0.12)}$ abfällt. Wiederum entspricht das Verhalten nicht dem von Caille vorhergesagten Modell [Cai 72]. Nach diesem Modell divergiert die laterale Höhendifferenz zwischen zwei beliebigen Punkten einer Membran logarithmisch. Der Strukturfaktor sollte mit

$$S(q_z = q_{z_n}, q_{||}) \propto q^{-2+\eta_n} \quad (5.6)$$

²Die Defektdichte ist hier grundsätzlich kleiner als bei Kapillarproben. Hochorientierte, gespreitete Proben sind daher zunächst als die bestmögliche Realisierung idealer Stapel anzusehen.

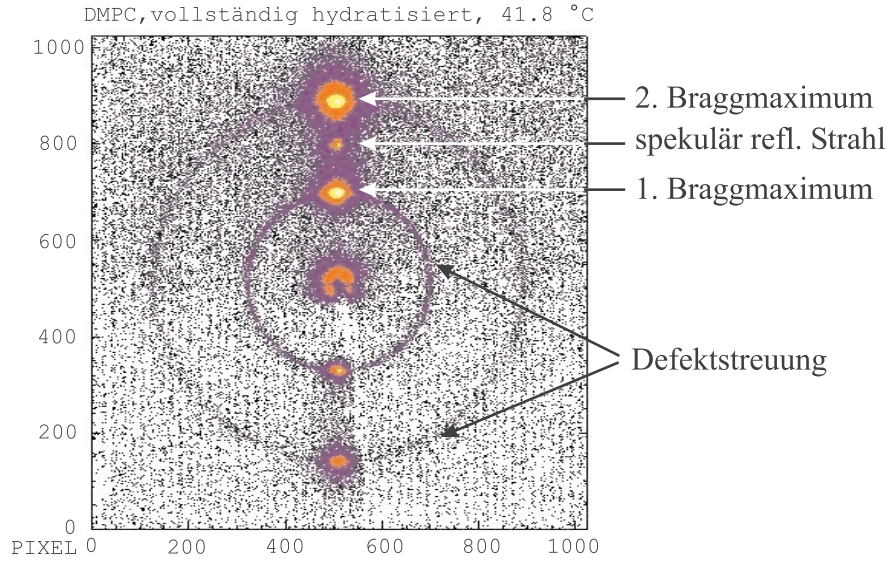


Abbildung 5.4: Logarithmisch skalierte 2-dimensional gemessene Intensitätsverteilung einer vollständig hydratisierten DMPC-Probe bei 41.8 °C. Es wurde unter streifendem Einfall ($\alpha_i = 5\alpha_c$) gemessen. Der spekulär reflektierte Strahl ist genau zwischen die ersten beiden Bragg Ebenen plaziert. Da das Substrat bei $E_{\text{photon}} = 20$ keV semitransparent ist, beobachtet man auch die zugehörigen negativen Beugungsordnungen. Wichtig ist zu vermerken, daß die diffusen Bragg Ebenen nahtlos in Ringe übergehen, die von Beugung an multilamellaren Membrandefekten [Vog 2000] herrühren.

beschreibbar sein. In η sind die elastischen Eigenschaften des Systems über

$$\eta_n = n^2 \cdot \eta_0 = n^2 \cdot \frac{\pi k_B T}{2d^2 \sqrt{BK}} \quad (5.7)$$

enthalten. Typische Werte liegen zwischen 0.01 und 0.3. Da DMPC eine sehr große Biegesteifigkeit im Bereich von $K \simeq 25k_B T$ besitzt, nimmt η einen entsprechend kleinen Wert an.

Theorien, die Wechselwirkungen von einzelnen Einschlüssen wie Poren in Membranen behandeln [Tur 97] sagen dagegen einen Strukturfaktor der Form

$$S(\mathbf{q}) \propto \frac{q_{zn}^2}{q_{zn}^2 + \lambda q_{\parallel}^4} \quad (5.8)$$

voraus. Die elastischen Konstanten sind in λ enthalten. Im wesentlichen behandelt diese Theorie ein renormiertes Caille Modell. Der Strukturfaktor der partiell hydratisierten DMPC Probe (Abbildung 5.3 b)) kann damit im Bereich großer lateraler Impulsüberträge gut angepaßt werden ($\lambda = 1400$). Der erhaltene Parameter λ kann dann aber über das exponentielle Verhalten der Halbwertsbreite im Bereich kleiner lateraler Impulsüberträge

nicht hinwegtäuschen. Bei Messungen an einer DMPC-Probe im voll hydratisierten Zustand konnte dann zumindest der Verlauf der Halbwertsbreite bei kleinen Impulsüberträgen eine Übereinstimmung mit dem Caille Modell [Cai 72] gesehen werden. Dazu wurde $\lambda = 130$ gewählt. Mit demselben Wert für λ wurde auch versucht das Verhalten im Strukturfaktor nach Gleichung 5.8 zu erfassen. Der rote Graph in Abbildung 5.3 verdeutlicht den Strukturfaktor aus Gleichung 5.8 für die aus der Halbwertsbreite gefundene Anpassung. Leider entzog sich der Abfall im Strukturfaktor der Messung.

Zusammenfassend ist die beschriebene Meßmethode geeignet um Fluktuationen über einen Bereich des lateralen Impulsübertrags zu verfolgen, in dem die Defektstreuung noch nicht dominiert. Der neutronenspezifische Vorteil eines transparenten Substrats erlaubt hier Messungen in der Einfallsebene, die durch eine hohe Auflösung gekennzeichnet ist.

Im nachfolgenden Kapitel wird dieses Meßverfahren auf DMPC/Magainin2 -System angewandt.

5.2 Erweiterung auf Lipid/Peptidsysteme

Verschiedene Modelle der statistischen Physik behandeln Peptide als Einschlüsse in Membranen. Entsprechend können sie als lokale Defekte betrachtet werden. Von Magainin2 wird außerdem berichtet, daß es mit dem zweiten bis zwanzigsten Residuum in der Membran verankert ist [Bech 92]. Dadurch werden die Elastizitätseigenschaften des Systems beeinflusst. Damit einhergehend ändert sich die diffuse Streuung. In einer Fehlfarbandarstellung der Intensität von Rastermessungen am 1. Braggmaximum wird dies direkt sichtbar.

Die Datenauswertung kann hier ähnlich, wie in Abschnitt 5.1 beschrieben, erfolgen. Bei der Auswertung der Halbwertsbreite sollte man allerdings beachten, daß insbesondere der Teil großer lateraler Impulsüberträge durch Defektstreuung dominiert sein kann. Die Zunahme der Defektstreuung kann zwar peptidinduziert sein, die eigentliche Information über veränderte Elastizitätseigenschaften findet sich aber im vorderen Teil der Kurve. Die Halbwertsbreite nimmt exponentiell zu und nicht nicht algebraisch. Damit zeigt sie kein skaleninvarianten Verhalten. Ein theoretisches Modell, das den beschriebenen Verlauf erfaßt, fehlt. Die charakteristischen Längen können in einer logarithmischen Auftragung der Halbwertsbreite aus der Steigung angegeben werden.

Der Strukturfaktor kann mit dem analytischen Ausdruck

$$s(q) \propto \frac{\sigma^2 \xi^2}{(1 + uq^2 \xi^2)^{1+H}} \quad (5.9)$$

der spektralen Leistungsdichte angepaßt werden. H hängt mit der Dimension des Systems D und dem Steigungsabfall γ des Strukturfaktors bei großen lateralen Impulsüberträgen über

$$\gamma = D + 2H \quad (5.10)$$

zusammen. Das Verhältnis von kleinster und größter erfaßbarer Systemlänge (cutoff) ist bei unserem Probensystem groß und es kann daher für $u = 1/(2H)$ angenommen werden [Salditt 96]. Die übrigen freien Parameter sind dann geeignet an den Strukturfaktor anzupassen. Daraus kann dann analytisch die von Palasantzas [Pal 93] vorgeschlagene K-Korrelationsfunktion

$$c(r) = \frac{\sigma^2}{u\Gamma(1+H)} \left(\frac{2}{2\xi\sqrt{u}}\right)^H Bessel_K\left(H, \frac{2}{\xi\sqrt{u}}\right) \quad (5.11)$$

ermittelt werden ($Bessel_K$ ist die modifizierte Besselfunktion zweiter Art und der Ordnung

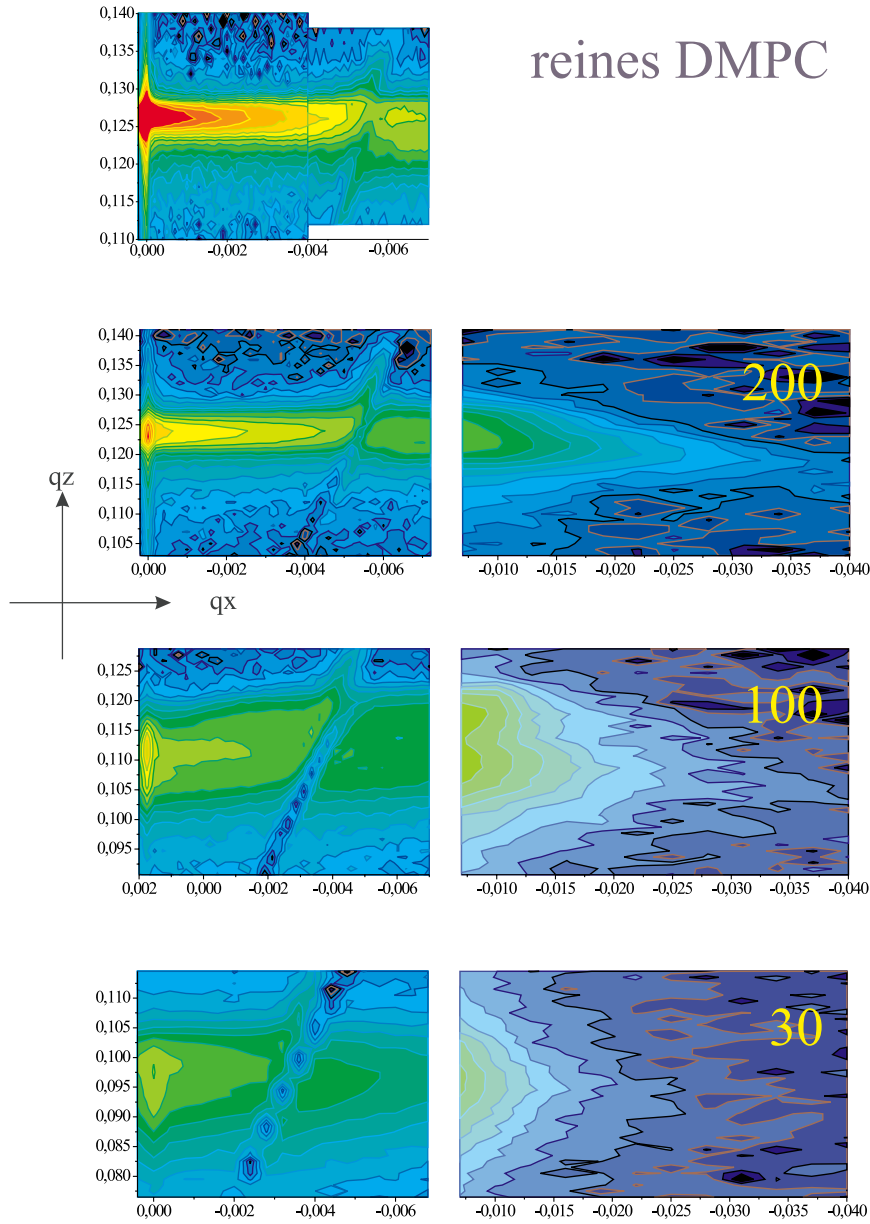


Abbildung 5.5: Rastermessungen im Reziproken Raum um das 1. Braggmaximum. Es handelt sich um ein System aus DMPC und Magainin2 im partiell hydratisierten Zustand in der L_α -Phase. Die Peptidkonzentration nimmt von oben nach unten zu ($P/L=1/x$).

H. Γ ist die Gammafunktion.). Der Zusammenhang mit der normierten Höhen-Höhenkorrelationsfunktion ist durch

$$\hat{g}(r) = 1 - \hat{c}(r) \quad (5.12)$$

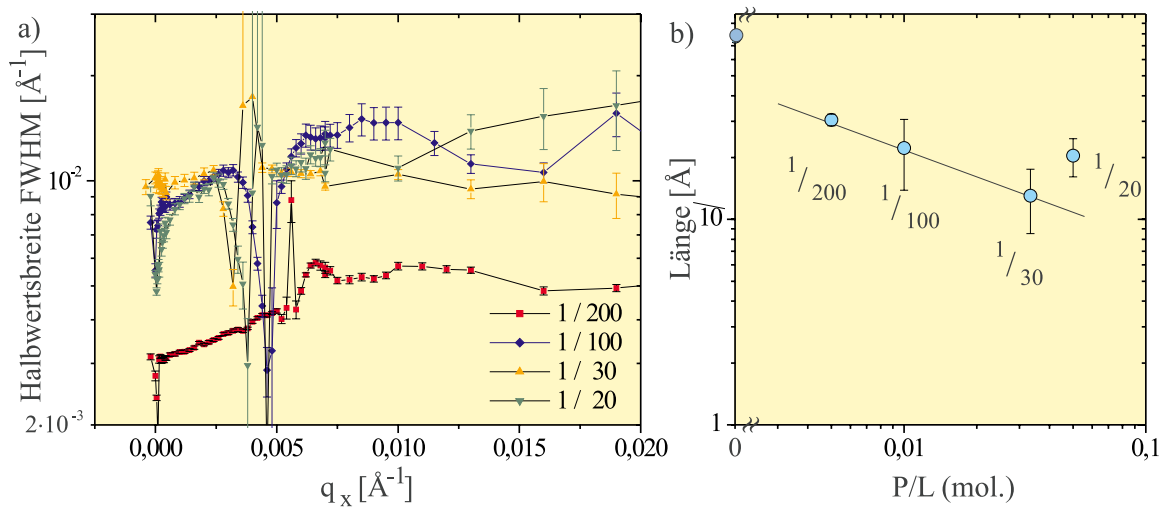


Abbildung 5.6: Aus den Reziproken Rastermessungen in Abbildung 5.5 ausgewertete a) Halbweitsbreiten als Funktion des lateralen Impulsübertrags. Aus dem exponentiellen Verhalten im Bereich kleiner Impulsüberträge wurde die charakteristische Länge in Abbildung b) bestimmt.

gegeben. Die Auswertung ergab folgenden Zusammenhang:

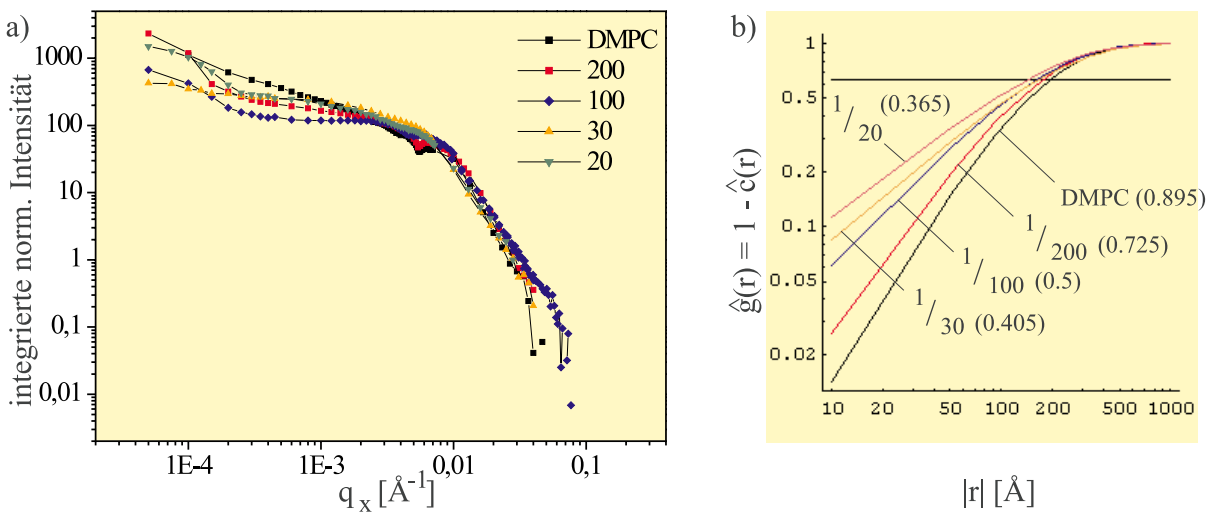


Abbildung 5.7: a) Integrierte Intensität der diffusen Streuung am 1. Braggmaximum als Funktion des lateralen Impulsübertrags q_x . Die Normierung ist so gewählt, daß jeweils das Integral unter der Kurve gleich eins ist. b) normierte Höhen-Höhen-Korrelationsfunktion $\hat{g}(r)$. In der Klammer sind die jeweiligen H-Werte (siehe Gleichung 5.11) angegeben.

5.3 Beugung unter streifendem Einfall an reinen Lipidsystemen

In der diffusen Streuung ist prinzipiell laterale Strukturinformation im Bereich einiger nm bis μm enthalten. Während die eben vorgestellte diffuse Neutronenstreuung den oberen Bereich abdeckt, eröffnet die Beugung unter streifendem Einfall (engl. *grazing incidence diffraction*, GID) die Untersuchung lateraler Ordnung auf molekularer Skala. Diese Streumethode ist für die Untersuchung von Festkörperober- und Festkörpergrenzflächen mittlerweile ein gängiges Verfahren [Dosch 92].

Die Anwendung von GID auf intakte Langmuir-Monoschichten an der Wasser-Luft Grenzfläche hat erheblich zum Verständnis der molekularen Struktur verschiedener Lipidsysteme beigetragen [Als 94]. Es handelt sich hier aber um Lipidmonoschichten, die sich in der Regel schlecht mit intakten Doppelschichten vergleichen lassen. Außerdem ist das Streuvolumen einer einzelnen Monoschicht sehr gering. Kurzreichweitig geordnete Strukturen, etwa das Ketten-Ketten-Korrelationsmaximum bei Lipiden in der fluiden L_α -Phase sind deshalb kaum aufzulösen. Hochorientierte Stapel bieten den Vorteil einer Verstärkung des Signals um ein bis zwei Größenordnungen.

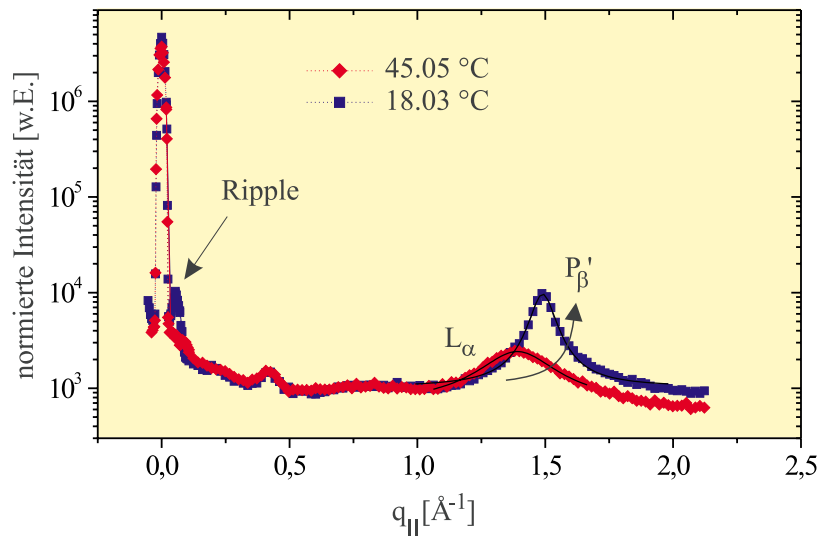


Abbildung 5.8: GID-Messung an reinem DMPC um das Ketten-Ketten-Korrelationsmaximum in der L_α -Phase bei 45.05 °C und nach dem Hauptphasenübergang bei 18.03 °C. In der Nähe des spekulären Pfades wird in der P'_β -Phase das Maximum der Ripple-Struktur sichtbar (Pfeil).

In Abbildung 5.8 ist eine eindimensionale GID-Messung an reinem DMPC vor und nach

dem Hauptphasenübergang gezeigt. Das breite Ketten-Kettenkorrelationsmaximum in der L_α -Phase bei $q_z=1.39\text{\AA}^{-1}$ deutet auf einen mittleren Kettenabstand von 4.52\AA hin. Aus der Anpassung der Halbwertsbreite durch eine Lorentzkurve bestimmt man die nur sehr kurzreichweitige Korrelation der Ketten zu $\xi=3.3\text{\AA}$. Nach dem Hauptphasenübergang in die P'_β -Phase ist das Maximum nach $q_z=1.4899\text{\AA}^{-1}$ gewandert. Der Kettenabstand beträgt jetzt 4.21\AA . Gleichzeitig nimmt die Halbwertsbreite ab, was einer vergrößerten Korrelation der Ketten mit $\xi=10.5\text{\AA}$ entspricht³. Diese Phase ist bekanntermaßen durch geneigte Lipidketten und eine wellige Ripplebildung gekennzeichnet. Die Korrugation führt zu den ausgeprägten Satellitenreflexen (Pfeil in Abbildung 5.8). Die Neigung ϕ der Ketten läßt sich ganz analog zu den Arbeiten an Fettsäureketten in Monoschichten [Kja 94] aus dem α_f -Profil (oder *rodscan*) bestimmen, wobei das Produkt aus Molekülformfaktor und Strukturfaktor zu einem Maximum bei endlichem q_z führt (siehe Abbildung 5.9 P'_β). In der semi-kinematischen Näherung der DWBA läßt sich der Wechselwirkungsquerschnitt schreiben als

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} \propto |T_i(\alpha_i)T_f(\alpha_f)|^2 S(q_{\parallel}, q_z) , \quad (5.13)$$

wobei $T_{i/f}$ die Fresnelschen Transmissionsfunktionen bezeichnet, die bei $\alpha_i = \alpha_c$ und $\alpha_f = \alpha_c$ zu den charakteristischen Vinyard-Maxima führt. Im Gegensatz zu den optischen Effekten ist die Strukturinformation im Strukturfaktor enthalten

$$\begin{aligned} S(q_{\parallel}, q_z) &= \left\langle \left| \int_{\Lambda}^0 dz \int_A dx dy \rho(x, y, z) e^{iq_x x + iq_y y + izq_z} \right|^2 \right\rangle \\ &\simeq \int_0^\infty dr \langle \rho(r)\rho(0) \rangle_z J_o(rq_{\parallel}) \times \left| \int_{\Lambda}^0 dz \langle \rho(z) \rangle_{xy} \exp[izq_z] \right|^2 , \end{aligned} \quad (5.14)$$

mit der durch die Winkel kontrollierbaren vertikalen Streutiefe $\Lambda(\alpha_i, \alpha_f)$. Die laterale Dichtekorrelationsfunktion $c(r) = \langle \rho(r)\rho(0) \rangle$ kann innerhalb der Membran als isotrop angenommen werden. Die Faktorisierung des Integrals in radialer Richtung $r := \sqrt{x^2 + y^2}$ und z ist für den Strukturfaktor gerechtfertigt, wenn die Korrelation zwischen Molekülkoordinaten in verschiedenen Doppelschichten verschwinden. Allerdings bleibt der Formfaktor der Moleküle in der Doppelschicht nicht faktorisiert. Hier können die relevanten Informationen (der nicht-orthogonalen Struktur im Reziproken Raum) experimentell aus Rastermessungen wie in Abbildung 5.9 bestimmt werden.

In Abbildung 5.9 ist jeweils das $\{11\}$ Kettenkorrelationsmaximum sichtbar. Das $\{20\}$ Maximum der P'_β -Phase ist gerade nicht mehr am äußeren Bildrand erfaßt. Es kündigt sich aber bereits durch erhöhten Streuuntergrund an, der in der Rastermessung der L_α -Phase nicht vorhanden ist. In der P'_β -Phase überwiegt das Dipolmoment der Lipidkopfgruppen gegenüber der thermischen Anregung, die diese Ordnung wieder zerstört. Dadurch werden Rotationsfreiheitsgrade der Ketten eingeschränkt. Vorzugsweise ordnen sich die Ketten auf

³Die temperaturabhängige Entwicklung kann in der Grafik im Anhang 2 verfolgt werden

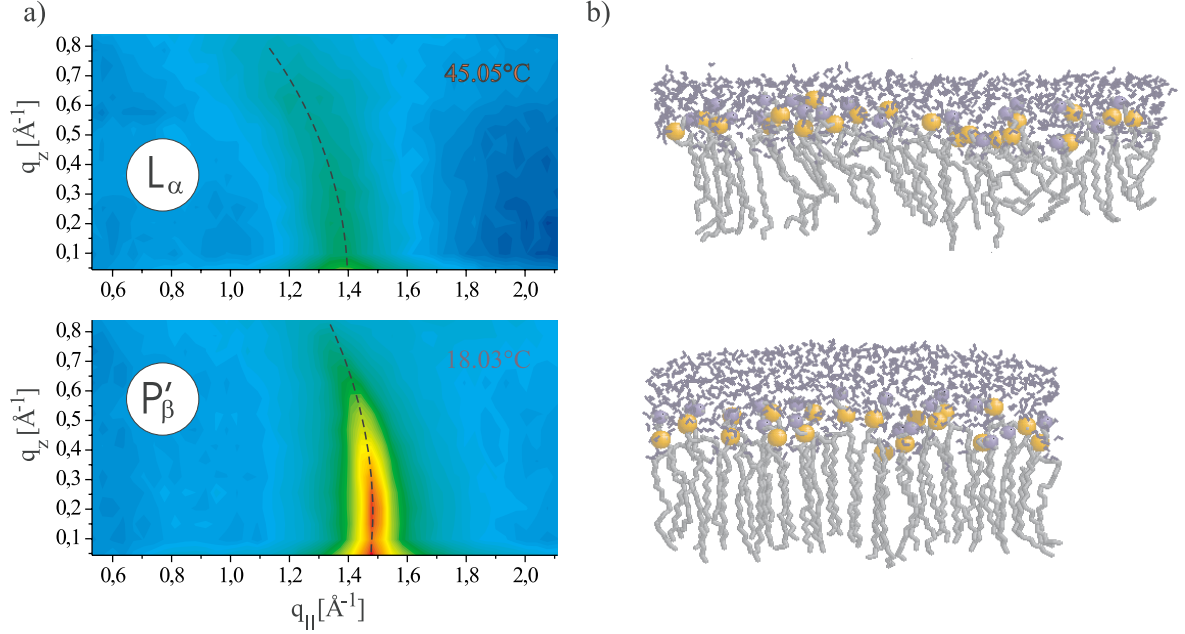


Abbildung 5.9: a) GID-Rastermessung an reinem DMPC in der L_α -Phase bei 45.05°C und nach dem Hauptphasenübergang in der P'_β -Phase bei 18.03°C . Die gestrichelte Linie entspricht jeweils einem Kreis um den Ursprung mit einem Radius, der das Korrelationsmaximum beinhaltet. b) Molekulardynamische Rechnungen von Heller [Hel 93] mit 200 POPC-Molekülen illustrieren die L_α - bzw. P_β -Phase.

einem hexagonalen Gitter an und nehmen mit der Probennormalen einen *tilt*-Winkel ϕ ein. Dieser Winkel errechnet sich aus dem reziproken Gittervektor G_{hk} und der Maximumposition in q_z aus der nachfolgenden Gleichung [Als 89].

$$\tan(\phi) \cdot G_{hk} \cos(\psi_{hk}) = q_z^{hk}. \quad (5.15)$$

Der Winkel ψ_{hk} berücksichtigt eine Mißweisung des Polarwinkels der Ketten von der direkten Verbindung zum nächsten bzw. übernächsten Nachbarn. In unserem Fall zeigen die Projektionen der Ketten (von oben betrachtet) im Mittel in Richtung des übernächsten Nachbarn ($\psi_{hk} = 0$). q_z^{hk} ist der Wert auf der q_z -Achse, bei dem das Ketten-Kettenkorrelationsmaximum wegen des endlichen *tilt*-Winkels des Formfaktors sein Maximum hat (siehe Abbildung 5.10 c)). Aus dem Wert des $\{11\}$ Maximums in $q_{||}$ -Richtung und dem zugehörigen Maximum in q_z errechnen wir daraus eine Verkippung der Ketten zu $\phi = (6.2 \pm 0.1)^\circ$.

Im Streubild der hochorientierten Membranen ist nicht nur dieses Detail wesentlich direkter und detaillierter quantifizierbar als im Pulver, Rastermessungen zeigen auch Details der Kettenkonformation. In der L_α -Phase sind die Ketten hochbeweglich. Die einzelnen Kettenabschnitte kommen deshalb in nahezu allen Neigungswinkeln ω vor. Ein Scherrer-Ring

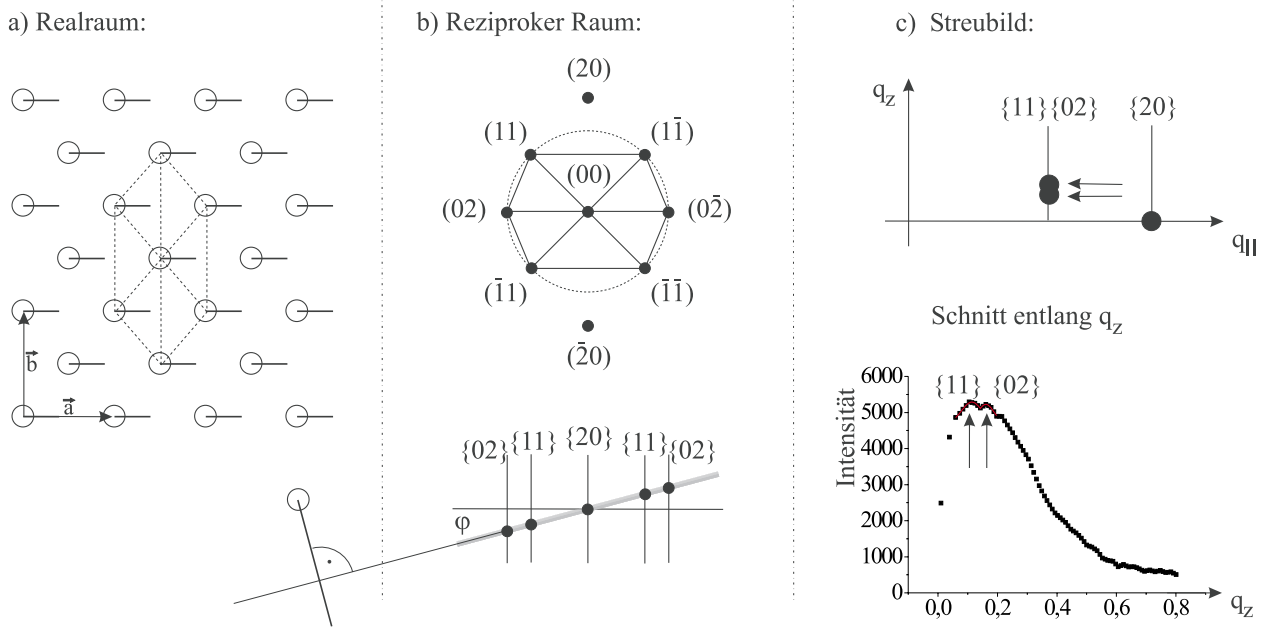


Abbildung 5.10: Zum Verständnis des Streubildes der P'_β -Phase werden hier Überlegungen analog zu [Kja 94] angestellt. a) Im Realraum befinden sich die Lipidmoleküle auf einem Hexagonalen Gitter. Die Ketten zeigen in Richtung des übernächsten Nachbarn und sind gegen den Probenhorizont geneigt. b) Dadurch befindet sich das Streumaximum des Kettenkorrelationsmaximums wegen des ebenfalls gekippten Formfaktor in der Regel bei endlichen q_z -Werten. c) Durch Mittelung über verschiedene Domänen können ein oder mehrere Korrelationsmaxima entarten. Der Schnitt entlang q_z aus Abbildung 5.9 in der P'_β -Phase deutet mit zwei Pfeilen eine solche Stelle an.

des Ketten-Ketten-Korrelationsmaximums zeigt dies an. Im Gegensatz dazu steht die P'_β -Gelpphase. Die Beweglichkeit ist hier eingeschränkt. Entsprechend können nicht mehr sämtliche Neigungen mit gleicher Wahrscheinlichkeit eingenommen werden. Aus radialen Schnitten des Ketten-Ketten-Korrelationsmaximums kann die Korrelationslänge bei einem bestimmten Neigungswinkel ω aus der Halbwertsbreite ermittelt werden. Gleichzeitig gibt die normierte integrierte Intensität an, welcher Anteil der Ketten im Mittel um einem bestimmten Neigungswinkel gekippt ist.

In Abbildung 5.11 ist die laterale Korrelationslänge und die Verteilungsfunktion als Funktion der Kettensegmentneigung im System DMPC dargestellt.

In gleicher Weise erfolgt der Vergleich verschiedener Lipide in der fluiden Phase jeweils bei 45.05 °C. DLPC besitzt im Vergleich zu DMPC wegen der kürzeren Acylkettenlänge eine geringere Steifigkeit. Wegen der Doppelbindung in einer Acylkette verhält sich POPC im Vergleich zu DMPC in gleicher Weise. Die geneigten Kettensegmente kommen daher im Vergleich zu DMPC, bei dem es einen Einbruch gibt, im gemessenen Winkelbereich in allen Neigungen mit derselben Wahrscheinlichkeit vor (Abbildung ?? b)). Die Korrelationen sind

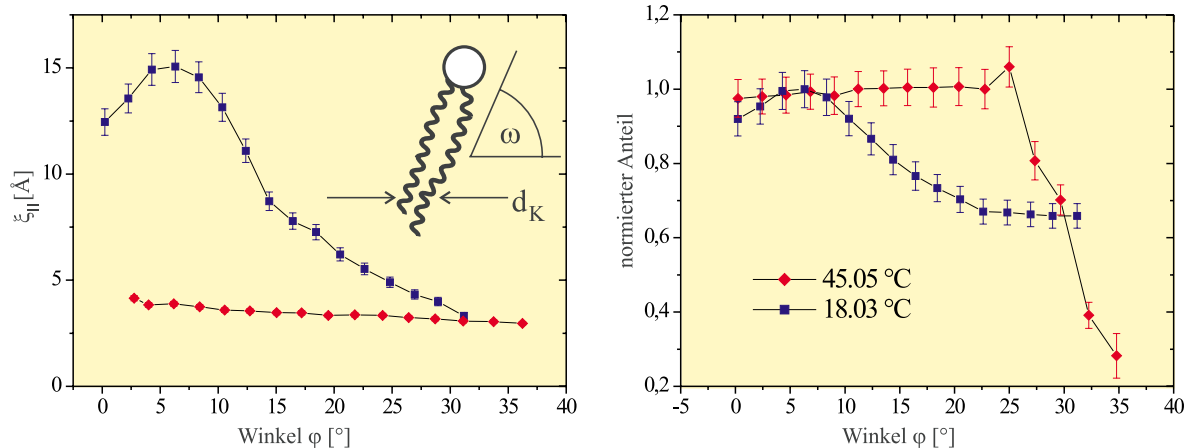


Abbildung 5.11: a) Laterale Korrelationslänge der DMPC-Ketten als Funktion der Ketten-segmentneigung. b) Verteilungsfunktion der Neigungswinkel ϕ .

dagegen gerade bei DMPC stärker, als bei den übrigen. Auf Grund der Weichheit sind sie bei DLPC erwartungsgemäß am geringsten.

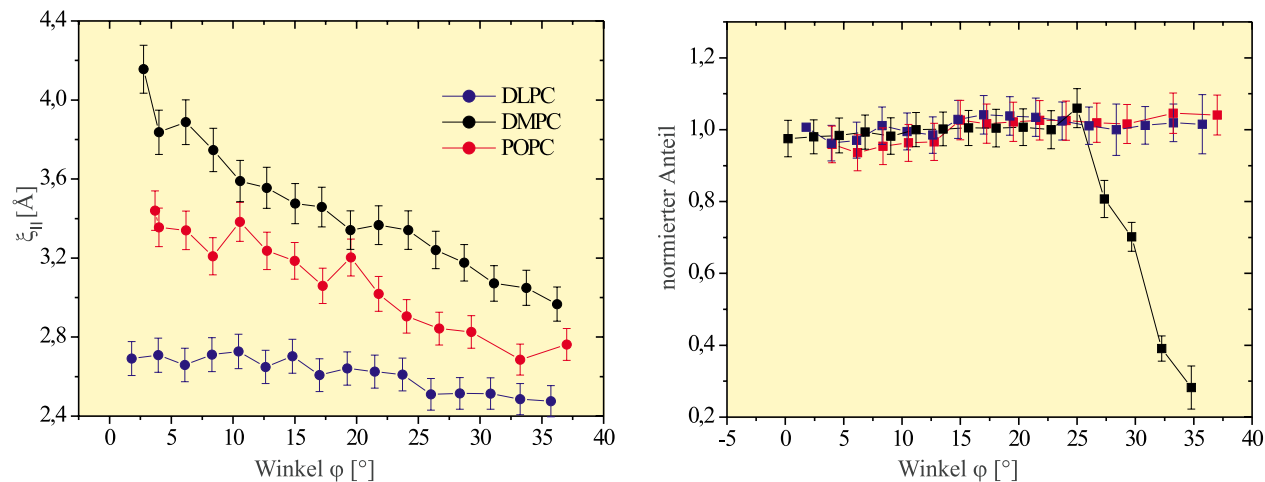


Abbildung 5.12: a) Laterale Korrelationslänge und b) Verteilungsfunktion wie in Abbildung 5.11 für verschiedene Lipide (alle in der fluiden Phase bei 45 °C).

5.4 Beugung unter streifendem Einfall an Lipid/Peptid-systemen

Nachdem das Streuverfahren für reine Lipide aus Kapitel 5.3 nun hinreichend bekannt ist, soll diese Art der Streuung nun dazu verwendet werden, um den Einfluß des antibiotischen Peptides Magainin2 zu klären. Zum einen nutzen wir den 'Wirtsgittereffekt' aus. Peptide als kleine ungeordnete Moleküle müssen bei kleinen Konzentrationen nicht unbedingt direkt sichtbar werden. Man kann aber von den Peptid-veränderten Eigenschaften der Lipide im Bezug auf selbstaggregierte Schichtbildung und Ketten-Ketten-Korrelation auf die Peptide zurückzuschließen. Zum anderen ist zu erwarten, daß das Peptid zumindest bei hoher Konzentration selbst einen beobachtbaren Streubeitrag liefert. Es soll hier insbesondere die Frage geklärt werden, welche Orientierung das helikale Peptid Magainin zur Membranoberfläche einnimmt. Dazu wurden mehrere Rastermessungen an einem System aus DMPC und Magainin2 bei verschiedener Peptidkonzentration aufgenommen.

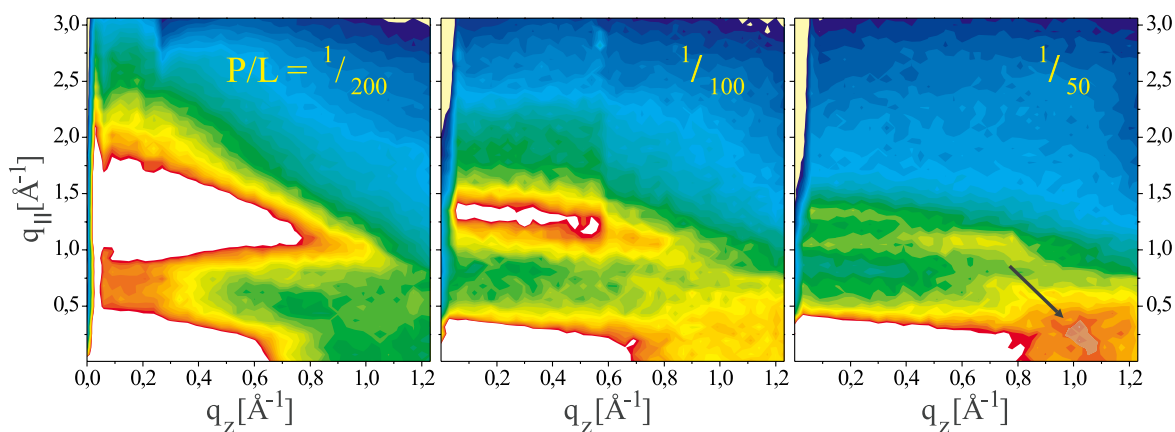


Abbildung 5.13: Rastermessung im Reziproken Raum um das Lipidketten-Ketten-Korrelationsmaximum bei verschiedener Peptidkonzentration (P/L). Der Pfeil deutet auf eine Intensitätserhöhung, die einer transmembranen Orientierung der Magainin2 - Helix zugeschrieben wird (vgl. Abbildung 5.17). Der dargestellte Bereich umfaßt $q_z \in \{0 \text{\AA}^{-1}, 0.123 \text{\AA}^{-1}\}$ und $q_{\parallel} \in \{0.01 \text{\AA}^{-1}, 3.06 \text{\AA}^{-1}\}$. Anmerkung: Die maximale dargestellte Intensität wurde in dieser Falschfarbendarstellung begrenzt, um das Streusignal der Helix zu betonen.

Rastermessungen und deren zweidimensionale Darstellung als (q_{\parallel}, q_z) -Fläche sind hervorragend geeignet um schwache, zusammenhängende Intensitätserhöhungen optisch zu erfassen. Bei einfachen Schnitten würden diese manchmal einfach als erhöhter Streuuntergrund unbeachtet bleiben. Auf der anderen Seite werden genau aber diese Schnitte benötigt um quan-

titative Aussagen zu treffen. Abbildung 5.14 zeigt laterale Schnitte durch Rastermessungen am System DMPC/Magainin2 .

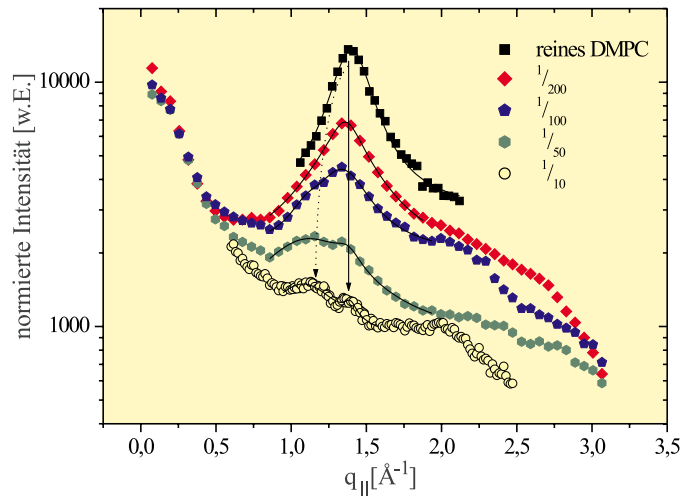


Abbildung 5.14: Eindimensionale Schnitte durch die in Abbildung 5.13 dargestellten Rastermessungen entlang $q_{||}$ bei $q_z = 0.15 \text{ \AA}^{-1}$ in Abhängigkeit verschiedener Peptidkonzentrationen. Das Ketten-Kettenkorrelationsmaximum wird durch die Peptide stark beeinflusst. Das zusätzlich bei hoher Peptidkonzentration entstehende Maximum kommt vom Windungsabstand (Pitch) der Helix.

Das Ketten-Ketten-Korrelationsmaximum der Lipide wird durch die Peptide stark beeinflusst. Außerdem sieht man mit steigender Peptidkonzentration neben dem Ketten-Ketten-Korrelationsmaximum ein weiteres Maximum entstehen. Aus der Position bei $q_z=1.077 \text{ \AA}^{-1}$ kann es direkt dem Windungsabstand (Pitch $P = 5.84 \text{ \AA}^{-1}$) der helikalen Magainin2-Moleküls zugeordnet werden. Die Orientierung der Helixachse ist parallel zur Membranoberfläche. Fraglich ist, ob auch eine transmembrane Orientierung und damit eine eventuelle Porenbildung der Peptide direkt beobachtbar ist. Für das Verständnis des gesamten Streubildes aus einer Rastermessung ist es wichtig, zunächst den Streubeitrag des helikalen Peptids Magainin zu kennen. Dazu wurden mehrere Simulationen zur Bestimmung des Struktur factors einer Helix durchgeführt.

5.5 Strukturfaktorberechnungen einer Helix

Der Strukturfaktor $S(q_x, q_y, q_z)$ einer beliebigen Anordnung von Streuern ist allgemein in kinematischer Näherung durch

$$s(q_x, q_y, q_z) = \left(\sum_{\text{alle Atome}} f_i e^{-i(x \cdot q_x + y \cdot q_y + z \cdot q_z)} \right) \quad (5.16)$$

$$S(q_x, q_y, q_z) = s(q_x, q_y, q_z) \cdot s^*(q_x, q_y, q_z)$$

gegeben. Die radiale Mittelung erreicht man durch Berechnung und Summation mehrerer diskreter Positionen des Strukturfaktors entlang eines Kreises:

$$\sum_{\phi \in 0..2\pi} S(q_r \sin(\phi), q_r \cos(\phi), q_z). \quad (5.17)$$

q_r ist in diesem Fall der radiale Abstand zur q_z -Achse.

Eine α -Helix ist eindeutig durch ihren Durchmesser und die Ganghöhe bei einer Windung (Pitch) festgelegt. Aus der Anzahl der Aminosäurereste kann man die Gesamtlänge berechnen, da entlang der Helix pro Windung 3.6 Aminosäurerückgrate zurückgelegt werden. Ausgehend von einer geraden Helix mit 23 gleichstarken Streuern, Pitch = 5.8 Å und Durchmesser = 5 Å wurden mehrere Simulationsrechnungen durchgeführt. Tyisch für den Strukturfaktor einer α -Helix ist die Intensitätserhöhung bei $q_z = 3.9 \text{ Å}^{-1}$ auf der q_z -Achse und bei $q_z = 1.077 \text{ Å}^{-1}$ (1/Pitch) mit paralleler Impulsübertragskomponente (siehe Abbildung 5.15).

Das gemessene Streubild in Abbildung 5.13(Pfeil) hat in der Nähe des spekulären Pfades genau bei dem richtigen reziproken Pitchabstand einer Magainin-Helix eine Intensitätserhöhung. Wenn sie einer Populaion von Helizes mit transmembraner Orientierung zugeschrieben werden soll, ist die Frage zu klären, warum diese aber deutlich näher an der Achse zu finden ist, als man es von obiger Simulation erwarten würde. Zusatzannahmen sollen den Sachverhalt erhellen. Zum einen ist die Längsachse des Magaininmoleküls leicht gebogen (siehe Abb. 2.2 auf Seite 24) und die Ladungsverteilung der Aminosäurereste muß wegen ihrer Verästelung weg vom Peptidrückgrat berücksichtigt werden. Die Abbildung 5.16a) zeigt den Einfluß einer axialen Biegung der Helix auf das Streubild, in Abbildung 5.16b) wird der Einfluß von vier Streuern mit größerem Abstand von der helikalen Achse als die übrigen Streuzentren, berücksichtigt. Sie liegen alle auf einer Seite, um die Asymmetrie des echten Magainin-Peptids zu betonen. In beiden Annahmen wandern die beiden Stellen erhöhter Intensität bei $q_z = 1.077 \text{ Å}^{-1}$ auf die q_z -Achse zu.

Neben diesen einfachen helikalen Modellen wurden Daten aus einer Proteindatenbank direkt für die Simulation benutzt (<http://pdb.gmd.de>⁴, 03.04.2000). Hierin ist nicht nur die Aminosäuresequenz des ganzen Moleküls enthalten, vor allem finden sich hier die einzelnen

⁴Speziell für Magainin: <http://pdb.gmd.de/pdb-bin/opdbshort?oPDBid=2mag>

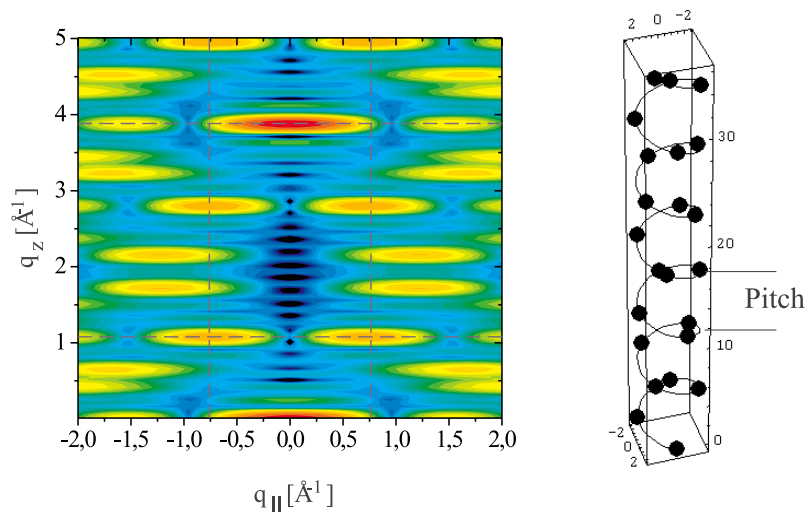


Abbildung 5.15: zeigt eine Simulation des radial gemittelten helikalen Strukturfaktors. 23 Streuer gleicher Streustärke wurden für die Berechnung auf einer geraden Helix mit Durchmesser 5 \AA und Pitch 5.8 \AA aufgereiht.

Atompositionen mit der jeweiligen Streustärke tabelliert. Daraus konnte das in Abbildung 5.17 dargestellte, radial gemittelte Streubild berechnet werden.

Ein direkter Vergleich des berechneten Strukturfaktors mit dem gemessenen Streubild ist nun möglich. Die Pfeile in den Simulationen 5.17 zeigen auf die typischen achenfernen Streumaxima einer Helix. Der Bereich der Vorwärtsstreuung ist bei der Simulation mit einem einzigen Magaininmolekül etwas überbewertet. Tatsächlich muß noch der Strukturfaktor für die Anordnung mehrerer Moleküle berücksichtigt werden (Abbildung 5.17). Im gemessenen Streubild wird bei großen Konzentrationen von Magainin2 ebenfalls in Nähe der q_z -Achse eine Intensitätserhöhung sichtbar. Das Peptid kann sich bei hohen Konzentrationen senkrecht zur Membranoberfläche orientieren. Es sei aber an dieser Stelle ausdrücklich betont, daß eine Korrelation dieser Poren nicht beobachtet wurde (siehe dazu Kapitel 5.8 auf Seite 79).

5.6 Abschätzung des kritischen Verzerrungsradius

Die Intensität des Ketten-Ketten-Korrelationsmaximums bei der reinen Lipidprobe kann als Maß für die zur Streuung beitragenden Lipide angesehen werden. Bei steigender Peptidkonzentration sinkt die Intensität drastisch (siehe Abbildung 5.14). Der Intensitätsabfall ist deutlich stärker, als man nur durch den Ersatz von Lipiden durch Peptide im gleichen Streuvolumen erwarten würde. Der prozentuale Flächenanteil der Lipide bzw. Peptide beträgt für eine molare Konzentration $P/L = 1/x$:

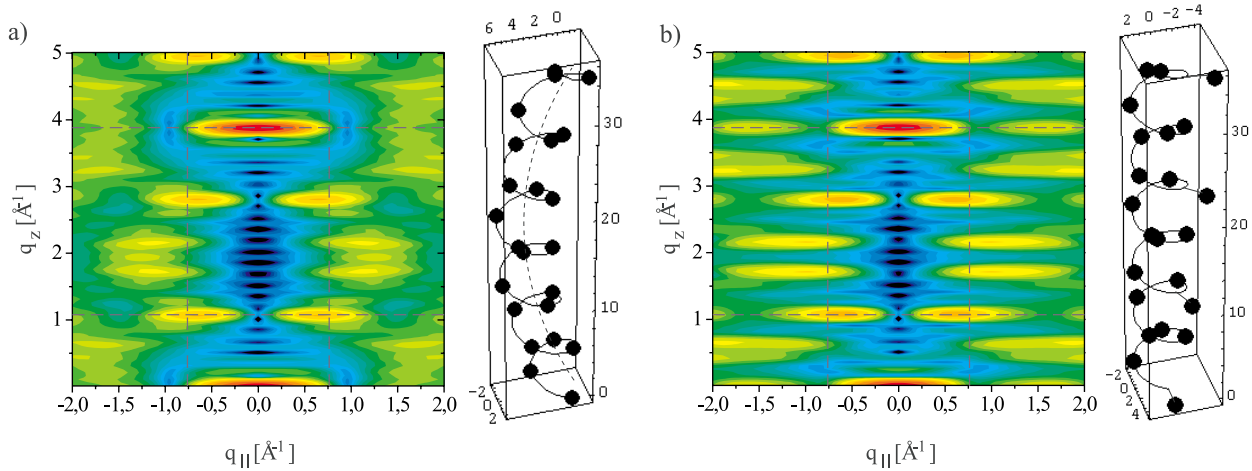


Abbildung 5.16: Radial gemittelter helikaler Strukturfaktor wie in Abbildung 5.15. In Abbildung a) ist eine zusätzliche Biegung der helikalen Achse berücksichtigt, in Abbildung b) wurden vier Streuer asymmetrisch zur Helixachse zu einem vergrößerten radialen Abstand verschoben. (Die gestrichelten Linien wurden für die vorige Abbildung 5.15 auf die Maximumsposition der beiden achsenfernen Maxima bei $q_z = 1.077 \text{ \AA}^{-1}$ gesetzt und dienen hier zur Orientierung.)

$$\hat{A}_{Lipid} = \frac{x A_{KopfgruppeLipid}}{A_{Peptid} + x A_{KopfgruppeLipid}} \quad \hat{A}_{Peptid} = \frac{A_{Peptid}}{A_{Peptid} + x A_{KopfgruppeLipid}}. \quad (5.18)$$

Selbst wenn man hinreichend große Peptidkonzentrationen ($P/L = 0.02 \text{ mol.}\%$) wählt, kann damit nur das Fehlen von lediglich 10 % der Intensität erklärt werden. Tatsächlich beobachtet man aber bei Verdopplung der molaren Peptidkonzentration einen Intensitätsrückgang in der Größenordnung um 50 %. Damit sind auch mehr Lipide durch die Peptideinwirkung betroffen, als man durch den bloßen Kontakt zum Peptid in der nächsten und übernächsten Nachbarschaft erwarten würde. Es handelt sich um ein kollektives Phänomen. Jedes Peptid verursacht in seiner Umgebung ein Verzerrungsfeld, das deutlich weiter reicht, als nur bis zu den unmittelbar angrenzenden Lipiden (nächste Nachbarn). Innerhalb dieses kritischen Radius ist die Kettenordnung der Lipide gestört. Die, nach Abzug des Peptidersatzes im Streuvolumen, fehlende Intensität wird deshalb alleine der gestörten Ketten-Ketten-Korrelation der Lipide zugeschrieben. Aus der Differenz der nach dem verbleibenden Streuvolumen theoretisch zu erwartenden Intensität und der tatsächlich gemessenen Intensität läßt sich der kritische Radius für den Einfluß des Peptids bestimmen. In einem vereinfachten Modell wird eine hexagonale Anordnung der Peptide vorausgesetzt. Tatsächlich wird es eine statistische Verteilung geben. Die hexagonal dichteste Packung stellt unter ihnen aber den günstigsten Fall mit der geringsten Flächenüberdeckung dar. Die Abschätzung des kritischen Verzerrungs-

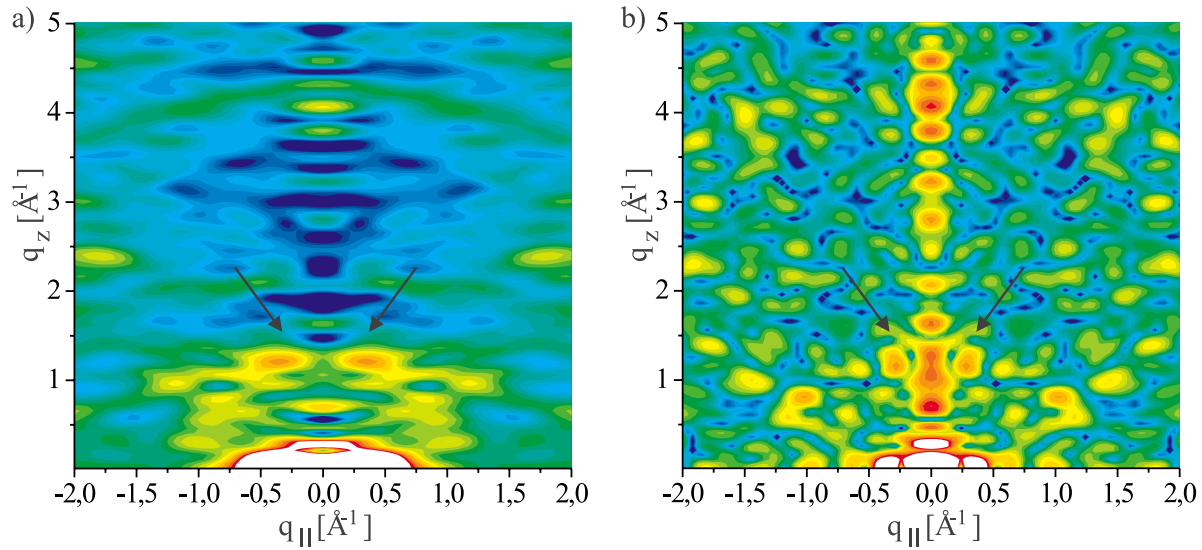


Abbildung 5.17: Berechnete Strukturfaktoren mit atomistischen Daten eines Magainin2 - Moleküls aus einer Proteindatenbank: a) Einzelnes Molekül. b) Hexamere Pore aus sechs Molekülen. (Die beiden Pfeile zeigen jeweils auf die typischen achsenfernen Streumaxima einer Helix.)

feldradius ist damit also nur eine Mindestabschätzung. In gleicher Weise ist zu bewerten, daß die Lipidkettenkorrelationen selbst durch die Anwesenheit hoher Peptidkonzentrationen nicht vollständig gestört sind, sodaß selbst hier noch ein Korrelationsmaximum beobachtet werden kann.

Aus dem Flächenbedarf A für x Lipide und jeweils ein Peptid ($P/L = 1/x$) kann der Abstand benachbarter Peptide berechnet werden.

$$d_{PP} = \sqrt{2 \cdot A / \sqrt{3}} \quad (5.19)$$

$P/L = 1 / x$	200	100	50	10
Abstand d_{PP} in \AA	123	88.3	64.1	33.9

Der kritische Verzerrungsfelddurchmesser eines Peptids wird als konzentrationsunabhängig vorausgesetzt. In Abbildung 5.18 sind drei typische Situationen im Verhältnis von Peptid-Peptid-Abstand zum Verzerrungsfelddurchmesser der Peptide illustriert.

Im einfachsten Fall ist der Abstand d_{pp} benachbarter Peptide deutlich größer als der kritische Verzerrungsfelddurchmesser (Abbildung 5.18a)). Es sind noch Bereiche vorhanden, die nicht durch ein Peptid gestört sind und damit vollständig zur Streuung beitragen. Mit zunehmender Peptidkonzentration schwindet der Abstand zwischen den Peptiden. Die Bereiche

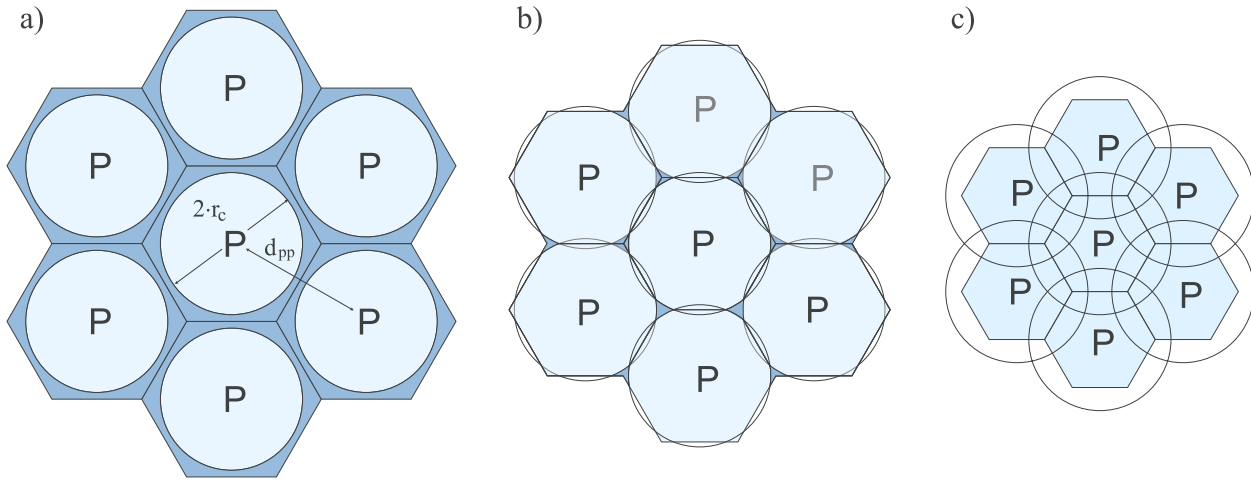


Abbildung 5.18: Verschiedene Szenarien von betroffenen Lipiden im Einflußbereich der Peptide. Die dunkelblauen Stellen sind durch kein Verzerrungsfeld irgendeines Peptides betroffen. Die helleren Flächen stellen Flächen betroffener Lipide dar. Sie tragen nur noch vermindert zur Streuintensität bei. d_{pp} ist der Abstand benachbarter Peptide. r_c ist der kritische Radius des Verzerrungsfeldes um ein Peptid.

ungestörter Streuung werden weniger (Abbildung 5.18b)), bis schließlich alle Lipide im Verzerrungsfeld irgendeines Peptids liegen (Abbildung 5.18c)). Bei sehr hohen Konzentration (z.B. $P/L=1/10$) ist letzteres Szenario auf jeden Fall erreicht. Trotzdem gibt es noch einen Intensitätsbeitrag von Ketten-Ketten-Korrelationen der Lipide. Offensichtlich ist die Ordnung nicht vollständig gestört. Die gestörte Fläche betroffener Lipide trägt also (zwar nur) noch vermindert zur Streuintensität des Ketten-Ketten-Korrelationsmaximums bei. Damit kann das Streuvermögen SV (als Funktion des Peptidabstands d_{pp} und des Schädigungsgrads v betroffener Lipide) aus der Differenz von unbetroffener und betroffener Fläche im Streuvolumen berechnet werden

$$SV(d_{pp}, v, r_c) = A_{pp} - v \cdot A_{r_c}. \quad (5.20)$$

Für den reinen Lipidfall, ohne Peptide, ist das Streuvermögen $SV = 100\%$. Die maximale Intensität, die detektierbar ist, ist die des reinen Lipids ($I_0 = 12656$). Sobald Lipide durch Peptideinwirkung betroffen sind sinkt das Streuvermögen und damit die detektierte Intensität. Die Streuintensität an der Stelle des Ketten-Ketten-Korrelationsmaximums wurde nach Untergrundabzug und Berücksichtigung des Peptidersatzes im Streuvolumen ermittelt:

$P/L = 1 / x$	∞	200	100	50
Intensität $I(P/L)$ [w.E.]	12656	6162	4025	2351

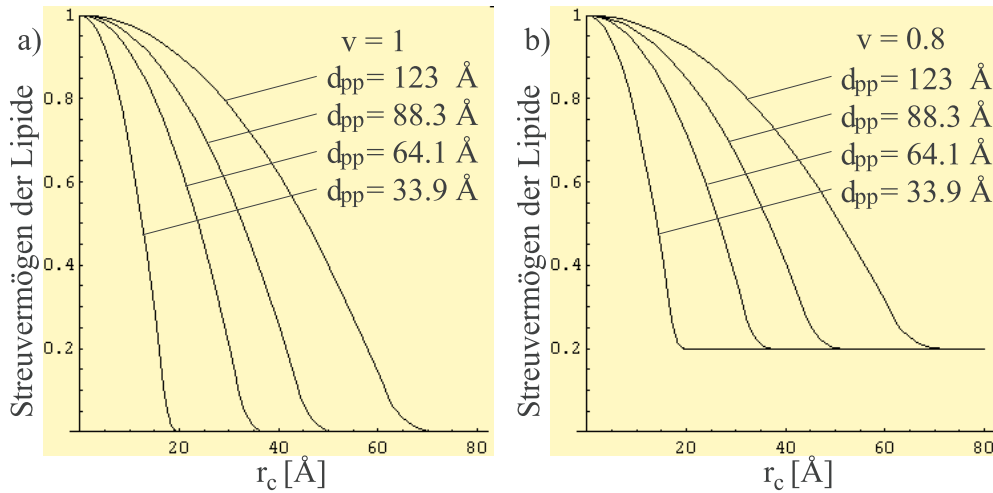


Abbildung 5.19: Streuvermögen SV aus Gleichung 5.20 für verschiedene Peptidabstände in Abhängigkeit des Verzerrungsfeldradius r_c . a) Die betroffenen Lipide tragen überhaupt nicht mehr zur Streuung bei ($v=0$). b) Die betroffenen Lipide streuen noch mit 20 % ($v=0.8$).

Ziel ist es nun, bei einem bestimmten kritischen Radius und Schädigungsgrad v

$$SV(d_{pp}, v, r_c) \cdot I_0(\text{reinesLipid}) = I(P/L). \quad (5.21)$$

für alle möglichen Peptidkonzentrationen (P/L) zu lösen. Die Lösung dieser Gleichung bestimmt man am besten numerisch oder graphisch. Der kritische Radius für ein System aus DMPC und Magainin wurde zu (42 ± 5) Å ermittelt. Der Schädigungsgrad v ist ungefähr 80 % .

5.7 Reflektivitätsmessungen

Nach dieser Abschätzung scheint es daher nicht mehr außergewöhnlich, daß die Einwirkung des Peptids auf die Reflektivität einen massiven Einfluß ausübt.

Man beobachtet einen drastischen Rückgang der Reflexe höherer Ordnung mit steigender Peptidkonzentration. Damit einhergehend nimmt die diffuse Streuung stark zu. Das entspricht einer peptidinduzierten Zunahme der lamellaren Unordnung bzw. der Membranfluktuationen (Korrugation). Die Zunahme der Unordnung ist auch in der Verbreiterung des ersten Braggmaximums mit steigender P/L Konzentration ersichtlich. Außerdem sieht man direkt ein Quellen des Stapels durch die peptidinduzierte Oberflächenladung (4-5 positive Nettoladungen pro Peptid).

Unter der Annahme, daß das Anwachsen von d ausschließlich auf die Zwischenwasserschicht

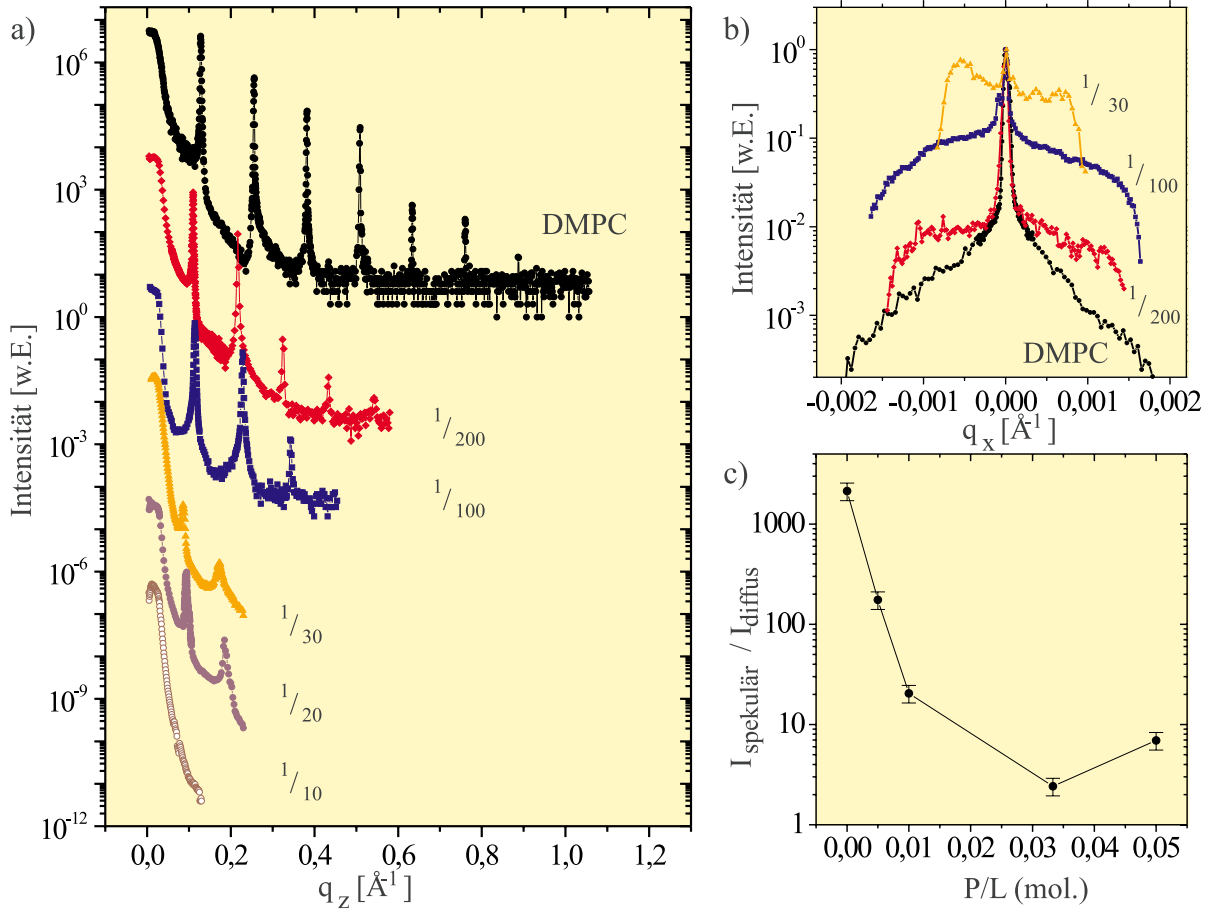


Abbildung 5.20: a) Reflektivitätskurven des Systems DMPC/Magainin2 bei variierender Peptidkonzentration (Die Kurven wurden der Übersichtlichkeit halber entlang der Ordinate verschoben). b) angulare Messungen (Rockingscan) jeweils am Zentrum des ersten Bragg-Maximums. Die diffuse Streuung steigt deutlich an. In c) ist das jeweilige Verhältnis von spekulärer zu diffuser Streuung aufgetragen.

d_w zurückzuführen ist⁵, ergibt sich $d_w \simeq 27 \text{ \AA}$ für $P/L = 0.05$ gegenüber $d_w \simeq 13 \text{ \AA}$ für reines DMPC. Nach der Poisson-Boltzmann Theorie übt die Ladung der Membrane gegenüber dem konstanten, osmotischen Druck der Feuchtigkeitskammer eine immer stärkere repulsive Kraft aus, der als Druck wie folgt geschrieben werden kann

$$P(d_w) = \frac{\pi kT}{2l_b d_w^2} \left(1 + \frac{\pi \Sigma}{l_b d_w} \right)^{-1}, \quad (5.22)$$

mit der Bjerrhumlänge $l_b = 7 \text{ \AA}$ und der Flächenladungsdichte $\Sigma = A_h / (Z P/L)$, wobei $A_h = 64 \text{ \AA}^2$ die mittlere Fläche pro Kopfgruppe bezeichnet und $Z = 4.5$ die Zahl der

⁵Für $P/L \leq 0.01$ läßt sich die Annahme durch Fourier-Synthese des Elektronendichteprofiles rechtfertigen.

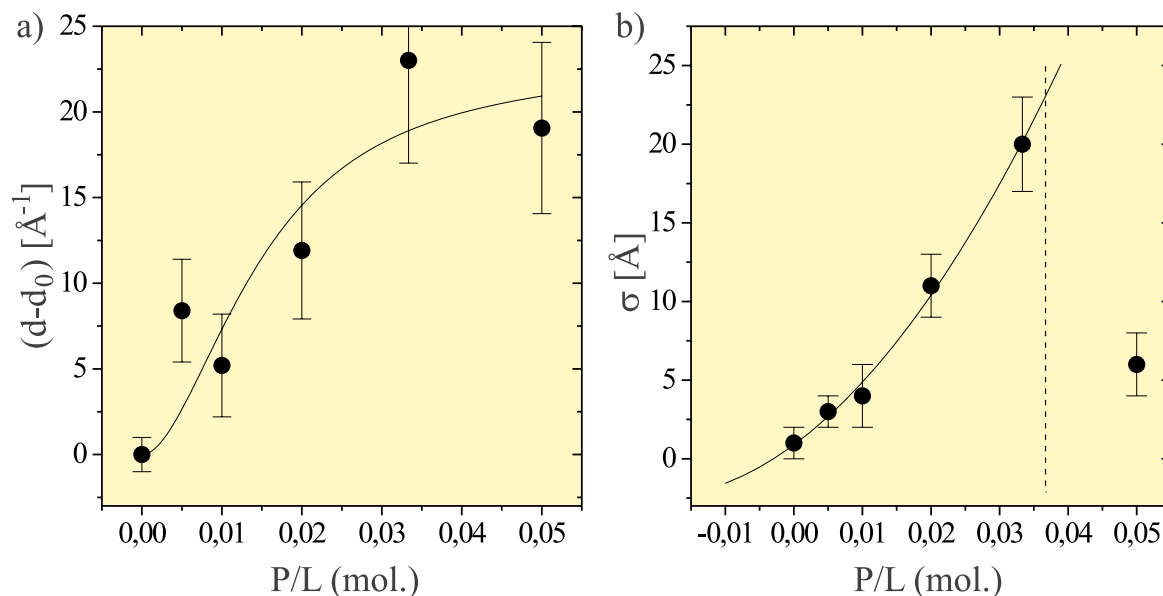


Abbildung 5.21: a) Das Anschwellen der Schicht durch die peptidinduzierte, negative Oberflächenladungsdichte. Die Periode d wächst gegenüber der Periode d_0 des reinen Lipids DMPC systematisch an. b) Die mittlere quadratische Rauigkeit σ aus Reflektivitätsanpassungen mit dem Parattalgorithmus. [Lu 98]

Ladungen pro Peptid. In Molekularfeldnäherung kann man nun das Kompressionsmodul bestimmen, wenn man die elektrostatische Abstoßung mit den Rückstellkräften des Stapels bei der entsprechenden Auslenkung aus der Ruhelage gleichsetzt, d.h. $B(d - d_0) = P(d_w)$. Wenn man für kleine Auslenkung die Änderung von B mit P/L vernachlässigt, erhält man für B als einzigen freien Parameter den sehr 'vernünftigen' Wert von $B = 6.4 \cdot 10^{-6} \text{ kT}/\text{\AA}^{-4}$ aus der Simulation in Abb. 5.21. Um hier ein Anschwellen der Schichtdicke d in einen Anteil aus Membranschichtdicke d_m und Zwischenwasserschichtdicke d_w ab initio zu unterscheiden, müßte das gesamte Dichteprofil innerhalb einer Periode bestimmt werden.

Die Anpassung der Reflektivität gestaltete sich zunächst schwierig [Lu 98]. Der Standard-Paratt Algorithmus (siehe z.B. T.P. Russel [Rus 90]), der zuerst zum Einsatz kam, ist dem Problem nicht angemessen, weil er die Eigenarten der Proben nicht genügend berücksichtigt. Beim Spreiten der Proben ist die Anzahl der Membranstapel nicht an jedem Ort der Probe gleich (siehe AFM Bilder 3.4 auf Seite 43), insbesondere ist nicht immer eine völlig homogene Bedeckung der Probe mit Peptid/Lipid gewährleistet. Daneben mangelt beim Paratt-Algorithmus an der fehlenden Berücksichtigung der Unordnung in den mittleren Lagen der Grenzflächen [Salditt 99H].

Ausgehend von der ‚Masterformel‘,

$$R(q_z) = R_F \left| \frac{1}{\rho_e(\infty)} \int \frac{\partial \rho_e(z)}{\partial z} e^{-iq_z z} dz \right|^2, \quad (5.23)$$

die die Fresnelreflektivität R_F absepariert und in der Gruppe um Pershan angegeben wurde [Kaw 93], konnten aber beachtliche Fortschritte erzielt werden⁶. Die Reflektivitätskurven wurden nach folgendem Modell angepaßt [Cli 2000, Salditt 2000]:

$$R(q_z) = (1 - x) \left| \rho e^{-0.5\sigma^2 q_z^2} \right|^2 R_{F_{Si}}(q_z) + x \left| \Delta \delta e^{-0.5\sigma^2 q_z^2} e^{-2\mu l(q_z)} + \Delta p e^{iq_z d_0} + \Delta \rho (F(q_z) e^{iq_z d_0} S(q_z, L, N)) \right|^2 R_{F_{lipid}}(q_z) \quad (5.24)$$

Dieser etwas längliche Ausdruck bezieht neben der eindringtiefenabhängigen Absorption $e^{-2\mu l q_z} = e^{\frac{-32\pi^2 \beta d}{\lambda^2 q_z}}$ auch mit x bzw. $(1-x)$ den unter Umständen nicht vollständigen Bedeckungsgrad des Siliziumsubstrats mit ein. Der Strukturfaktor

$$S(q_z, L, N) = \sum_{m=1}^N e^{i(mq_z d)} e^{-(d-md)(\frac{8\pi\mu}{\lambda q_z})} e^{-(\frac{md}{L})} \quad (5.25)$$

berücksichtigt die Qualität der Periodizität der einzelnen Lipiddoppelschichten, die im Formfaktor

$$\Delta \rho \cdot F(q_z) = \Delta \rho \cdot \int_{\frac{D}{2}}^{\frac{D}{2}} \frac{d\rho(z)}{dz} e^{iq_z z} dz \quad (5.26)$$

ihren Ausdruck finden. Der Integrand wurde dazu als Fouriersumme ausgedrückt [Cli 2000]. Daneben haben die anderen Symbole die in der Tabelle aufgeführte Bedeutung

⁶Zur Güte dieser Formel im Vergleich zu dynamischen Theorie von Paratt siehe [Als 89].

Symbole	und deren Bedeutung in Gleichung 5.24
$R_{F_{lipid}}$	Fresnelreflektivität des Lipidsystems
$R_{F_{Si}}(q_z)$	Fresnelreflektivität des Siliziumsubstrats
σ	mittlere quadratische Rauigkeit des Siliziumsubstrats
$\Delta\delta$	Elektronendichtesprung vom Siliziumsubstrat zum Wasser
$\Delta\rho$	Elektronendichtesprung vom Wasser zum Lipid
$\Delta\rho$	Amplitude für den Formfaktor
L	Längenskala, die entweder durch die Gesamtschichtdicke, die Domänengröße oder durch die Auflösung bestimmt ist
N	<i>cutoff</i> des Laufindex ($N \cdot D \gg L$)
D	Wiederholabstand der Lipiddoppelschichten

Stellvertretend seien hier zwei angepaßte Reflektivitätskurven für reines DMPC und Magainin2 /DMPC = 1/200 gezeigt.

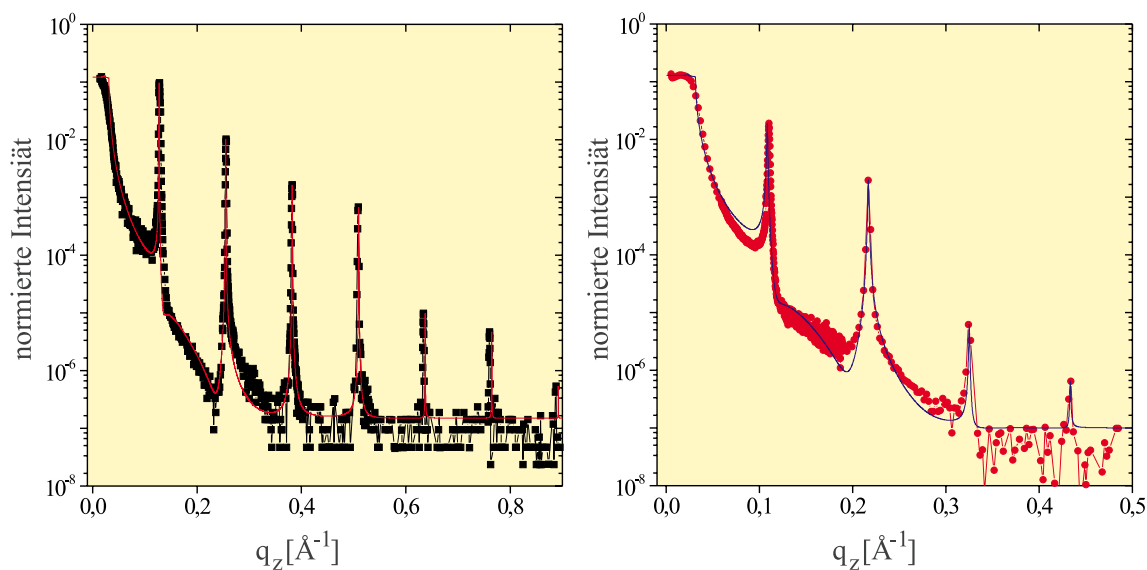


Abbildung 5.22: Reflektivitätskurven, die mit Gleichung 5.24 angepaßt wurden. Die Symbole zeigen die Meßkurve, die durchgezogene Linie ist jeweils die Simulation.

Das rekonstruierte Elektronendichteprofil wird mit dieser Anpassung automatisch in der richtigen Skalierung ausgegeben. Die Integration des Elektronendichteprofiles über eine Elementarzelle liefert dann auch die Anzahl der durch atomistische Summation zu erwartenden Elektronen in derselben. Im Elektronendichteprofil der DMPC-Magainin-Lipiddoppelschicht sieht man, daß die parallele Membranadsorption des Peptids die Elektronendichte in der Kopfgruppenregion erhöht. Über Konzentrationen die stärker sind als $P/L = 1/100$ kann derzeit keine Aussage getroffen werden. Es wird erwartet, daß ein Teil der Peptide trans-

membran eingebaut wird und somit auch die Elektronendichte im Bereich zwischen den Ketten bei $d = 0 \text{ \AA}$ erhöht.

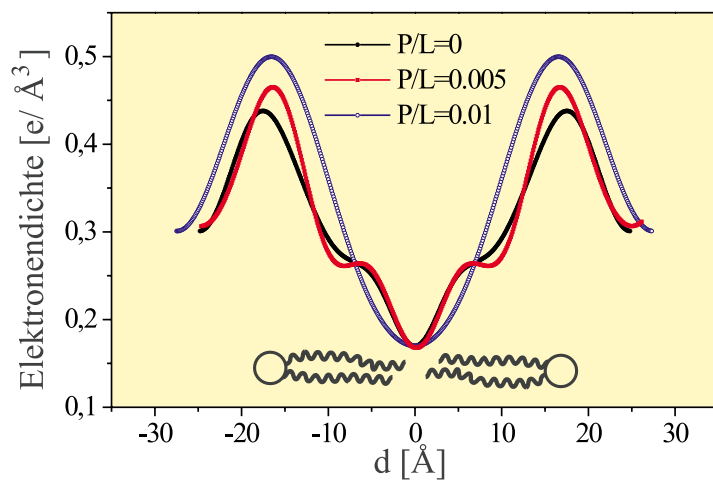


Abbildung 5.23: Elektronendichteprofil der DMPC-Lipiddoppelschicht für verschiedene Magnesiumkonzentrationen. Zur Normierung wurde willkürlich auf die Elektronendichten des Wassers im Kopfgruppenbereich und der Lipidketten normiert.

5.8 Streuung an Membrandefekten

In der Gruppe um H.Huang, Rice University Huston, wurde berichtet, daß antimikrobielle Peptide nicht nur transmembrane, oligomere Poren bilden, sondern darüberhinaus, daß diese Poren auch noch lateral korreliert sein sollen. Der Vergleich mit einer geordneten Flüssigkeit aus harten Scheiben beschreibt den Fall. Ersteres, also die Porenbildung, scheint durchaus plausibel zu sein. Aus den veröffentlichten Daten aber von einer lateralen Korrelation der Poren auszugehen ist nicht gerechtfertigt. Möglicherweise handelt es sich um eine Fehlinterpretation. Die erste Veröffentlichung behandelt das System DLPC mit Alamethicin [He 95], eine weitere Veröffentlichung das System DMPC/DMPG mit Magainin [Lud 96].

Ein korreliert-porenbildendes Verhalten dieser Art konnte von uns in keinem der Systeme bestätigt werden. Das Vorkommen einer transmembranen Peptidorientierung bei höheren Konzentrationen indes wurde von uns direkt im Kapitel 5.4 mit Beugung unter streifenförmigem Winkel beschrieben. Die in den Veröffentlichungen beschriebenen Streusignale deuten aber eher auf Membranstörungen, im Sinne von multilamellaren Defekten. Eine korrelierte Porenbildung ist damit nicht erklärbar. In Kleinwinkelstreuung konnte ein Streusignal von Defektstrukturen, wie in Abbildung 5.24 illustriert, beobachtet werden. Diese multilamellaren Defektstrukturen können über mehrere Membranstapel reichen. Außerdem wurden in polarisationsmikroskopischen Aufnahmen Membrandefekte im Sinne von *focal conics* anhand ihrer charakteristischen Brechungseigenschaften identifiziert.

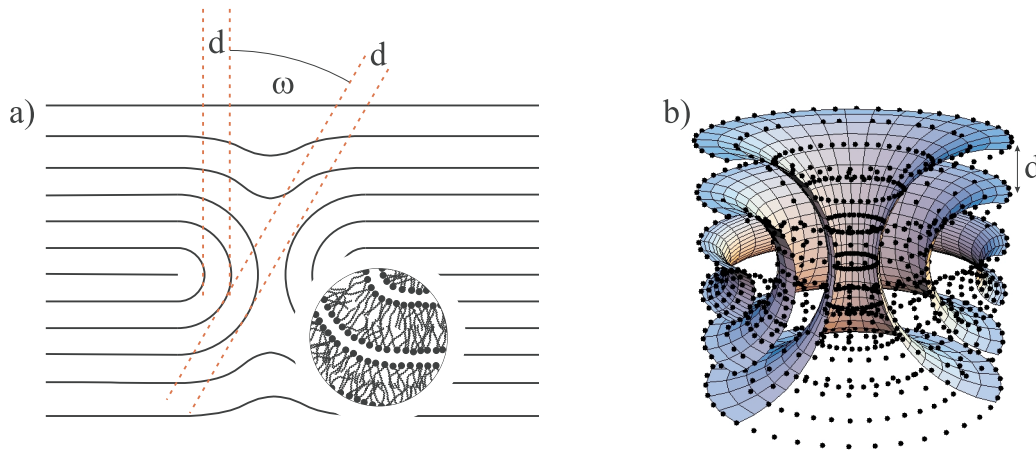


Abbildung 5.24: Multilamellarer Defekt in einem Membranstapel. a) zeigt einen vertikalen Schnitt durch einen Membranstapel. Die einfache Lipiddoppelschicht ist als Linie dargestellt. In einem Transmissionsstreuexperiment wird an einem Defekt der lamellare Wiederholabstand d der Membrandoppelschichten sichtbar. Der gemessene Abstand verändert sich nicht, wenn die Probe um den Winkel ω gegen den einfallenden Strahl gedreht wird. b) Modellierung eines multilamellaren Defekts für Strukturfaktorsimulationsrechnungen. Auf mehreren konzentrischen Tori wurden Streuer angeordnet.

In einem Transmissionsstreuexperiment ergibt sich bei $q_{\parallel} = 2\pi/d$ ein Intensitätsmaximum. Wegen der Isotropie einer solchen reinen Lipid-Pore beobachtet man auf einem 2-dimensionalen Detektor ein ringförmiges Streusignal (5.25 Bild a).

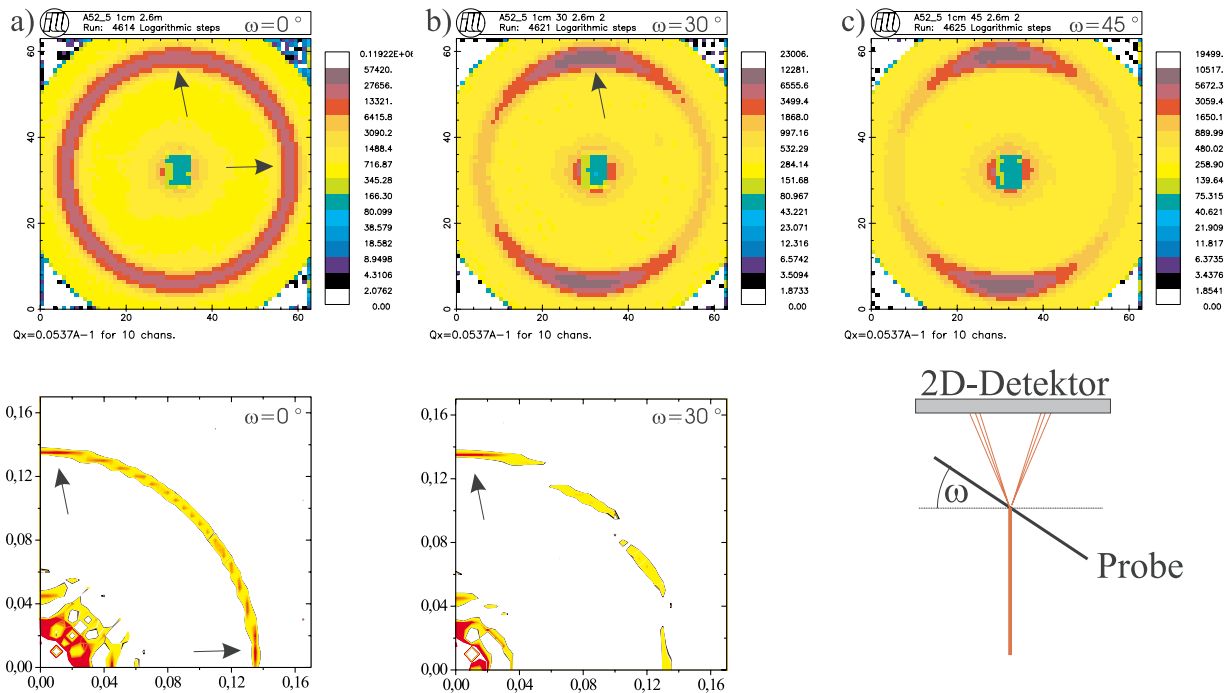


Abbildung 5.25: zeigt in einem lamellaren System aus DLPC und Alamethicin das typische Kleinwinkelstreuungssignal. Der Debye-Scherrer-Ring kommt von Streuung an multilamellaren Defekten in der Membran. Aus der Halbwertsbreite des Debye-Scherrer-Rings schließt man auf etwa 14 beteiligte Lipiddoppelschichten. Die verschiedenen Aufnahmen entsprechen einer Probendrehung von a) $\omega = 0^\circ$, b) $\omega = 30^\circ$ und c) $\omega = 45^\circ$. Die Simulationen darunter zeigen das gerechnete Streubild eines multilamellaren Defekts aus 10 (Doppel)-Schichten. Der Defektring bleibt in seiner Form unverändert; die Intensität bleibt oben (und unten) gleich, während sie rechts (und links) verlorenght. Die Fehlstellen im simulierten Streubild kommen auf Grund der Diskretisierung in der Modellierung des Defekts.

Wichtige Informationen gewinnt man aus der Drehung der Probe gegen den Primärstrahl. Der lamellare Abstand d der Membrandoppelschichten ist gegenüber Drehung invariant. Entsprechend wird das ringförmige Streusignal wieder bei gleichem q_{\parallel} -Wert beobachtet. Lediglich die Intensität variiert auf dem Scherrer-Ring. Mit Simulationsrechnungen des Struktur factors einer multilamellaren Pore kann dies aber verstanden werden. Dazu wurden diskrete Streuer wie in Abbildung 5.24 b) auf mehreren konzentrischen Tori angeordnet. Die beiden charakteristischen Radien R_2 und r_1 des jeweiligen Torus wurden entsprechend der lamellaren Schichtabstände des Systems angepaßt (r_1 ist der Mantelradius und R_2 legt dessen Abstand vom Ursprung fest). Die Simulationen des Struktur factors basieren auf Gleichung 5.17 auf Seite 68. Der Struktur factor für die um den Winkel ω gedrehte Probe in Transmission ist

somit

$$S(qx, qy \cdot \cos(\omega), qy \cdot \sin(\omega)). \quad (5.27)$$

Man sieht aus den Simulationen in Abbildung 5.25, daß sie den Fall einer multilamellaren Pore prinzipiell gut beschreiben. Auf Grund der diskreten Positionswahl der Streuer ist das Simulationsbild nicht so homogen, wie das tatsächlich gemessene Steubild. Die Intensitätsverteilung auf einem Kreisring mit $q_{\parallel} = 2\pi/d$ wird allerdings erfaßt. Ganz anders ändert sich das Streubild von Korrelationsmaxima von Peptidporen bei Drehung. Wegen der axialen Vorzugsrichtung der Peptide würde es ellipsenartig deformiert werden. Die beobachteten Defektstreusignale treten außerdem auch bei reinen Lipiden auf (P/L=0). Bei Lipidmischungen (POPC/POPS oder DMPC/DMPG) scheinen sie besonders ausgeprägt zu sein. Darüberhinaus wird ein Zuwachs des Streusignals mit der Peptidkonzentration beobachtet. Die Defektdichte nimmt also peptidabhängig zu. In diesem Zusammenhang sei auch auf das Modell verwiesen, bei dem die Peptide von einem Verzerrungsfeld umgeben sind. Treffen mehrere solcher Bereich aufeinander, so kann es zu Membrandefekten führen (siehe Bild 2.6 auf Seite 28). Die eigentlichen Peptidporen scheinen nur als Minderpopulation vorzuliegen und werden in dieser Messung folglich nicht direkt sichtbar.

Eine weitere Bestätigung, daß es keine korrelierten Poren gibt, ist direkt aus dem Streubild ersichtlich. In einer Illustration in [He 95] wird der Eindruck eines echten hexagonal korrelierten Gitters vermittelt. Bei einem hexagonalen Gitter sind die Maxima für den (hk)-Reflex bei

$$q = \frac{4\pi}{\sqrt{3}a} \sqrt{h^2 + hk + k^2} \quad (5.28)$$

zu finden⁷. In dieser Gleichung ist a die hexagonale Seitenlänge. Aus rein geometrischen Überlegungen, die durch die Auswertungen im Bezug auf den kritischen Radius gestützt werden, kann der Abstand benachbarter Peptidporen und damit die Position der (hk)-Bragg-Maxima berechnet werden. Die berechneten Werte stützen sich auf die Verwendung von hexameren Poren.

P/L = 1 / x	200	100	50	10
Abstand zweier 6-Poren [Å]	298.858	212.074	151.014	71.1961
$q_{\parallel}(10)[\text{Å}^{-1}]$	0.042	0.059	0.083	0.177
$q_{\parallel}(11)[\text{Å}^{-1}]$	0.073	0.103	0.144	0.306
$q_{\parallel}(20)[\text{Å}^{-1}]$	0.084	0.119	0.166	0.353

In den Streudaten aus Abbildung 5.13 ist hingegen an den berechneten Positionen keine

⁷Falls die Poren weniger gut auf einem hexagonalen Gitter korreliert sind, so verbreitert sich lediglich das Streumaximum. Der Reflex behält aber seine Position bei.

Intensitätserhöhung sichtbar. Eine Phase mit korrelierten, oligomeren Peptidporen gibt es also nicht.

Literaturverzeichnis

- [Als 80] J. Als-Nielsen, J.D. Litster, R.J. Birgenau, M. Kaplan, C.R. Safinya, A. Lindegard-Andersen, S. Mathiesen, Phys.Rev.B 22 (1980) 312.
- [Als 89] J. Als-Nielsen, K. Kjaer, X-ray reflectivity and diffraction studies of liquid surfaces and surfactant Monolayers 'in *Phase Transitions in SOft Condensed Matter* Plenum Press, New York (1995) ISBN 0-306-43394-X.
- [Als 94] J. Als-Nielsen, D. Jacquemain, K. Kjaer, F. Leveiller, M. Lahav, L. Leiserowitz, Physics Reports 246 (1994) 251.
- [Bak 93] M.A. Baker, W.L. Maloy, M. Zasloff, L.S. Jacob, Cancer Res. 58 (1993) 3052.
- [Bech 92] B. Bechinger, M. Zasloff, S.J. Opella, Biophys.J. 62 (1992) 12.
- [Bech 93] B. Bechinger, M. Zasloff, S.J. Opella, Protein Sci. 2 (1993) 2077.
- [Bech 96] B. Bechinger, L.M. Gierasch, M. Montal, M. Zasloff, S.J. Opella, J.of Solid State NMR 7 (1996) 185.
- [Bech 96/2] B. Bechinger, J.Mol.Biol. 263 (1996) 768.
- [Bech 97] B. Bechinger, J.Membr.Biol. 156 (1997) 197.
- [Bech 98] B. Bechinger, M. Zasloff, S.J. Opella, Biophys.J. 74 (1998) 981.
- [Bech 99] B. Bechinger, R. Kinder, M. Helmle, T.B. Vogt, U. Harzer, S. Schinzel, Biopolymers 51 (1999) 174.
- [Ben 96] A. Ben Shaul, N. Ben Tal, B. Honig, Biophys.J. 71 (1996) 130.
- [Bes 90] R. Bessalle, A. Kapitkovsky, A. Gorea, I. Shalit, M. Fridkin, FEBS Lett. 274 (1990) 151.
- [Blo 92] S. Blondelle, R.A. Houghten, Biochemistry 31 (1992) 12688.
- [Bom 91] H.G. Boman, Cell 65 (1991) 205.

- [Buc 98] M. Buck, Q.Rev.Biophys. 31 (1998) 297.
- [Cai 72] C.R. Caille, Acad. Sci.Ser.B 274 (1972) 891.
- [Cas 99] S. Castano, B. Desbat, M. Laguerre, J. Dufourq, Biochim.Biophys.Acta 1416 (1999) 176.
- [Cevc 1] G. Cevc, D. Marsh, *Phospholipid bilayers : Physical principles and models* Wiley, New York (1987).
- [Cevc 2] G. Cevc, *Phospholipids Handbook*, Dekker New York (1993).
- [Chai 95] P.M. Chaikin, T. Lubensky, *Principles of condensed matter physics* Cambridge Univ. Press (1995).
- [Chan 92] S. Chandrasekhar, *Liquid Crystals* Cambridge Univ.Press. (1992)
- [Che 88] H.-C. Chen, J.H. Brown, J.L. Morell, C.M. Huang, FEBS Lett. 236 (1988) 462.
- [Cli 2000] C. Li, Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Sektion Physik, LS Peisl (2000)
- [Cru 91] R.A. Cruciani , J.L. Barker, M. Zasloff, H.-C. Chen, O. Colamonic, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88 (1991) 3792.
- [Cru 92] R.A. Cruciani, J.L. Barker, S.R. Durell, G. Raghunathan, H.R. Guy, M. Zasloff, E.F. Stanley, Eur.J.Pharmacol.Mol.Pharmacol.Sect. 226 (1992) 287.
- [Dat 96] M. Dathe, T. Wieprecht, T. Seelig, K. Matsuzaki, M. Bienert, Nova Acta Leopold.Suppl. 14 (1996) 33.
- [Dat 99] M. Dathe, T. Wieprecht, Biochim.Biophys.Acta 1462 (1999) 71.
- [Dob 95] H.G. Döbereiner, E. Evans, U. Seifert and M. Wortis, Phys.Rev.Lett. 75 (1995) 3360.
- [Dosch 92] H. Dosch, *Critical Phenomena at surfaces and interfaces* Springer, Berlin (1992) ISBN 0-387-54534-4.
- [Duc 89] H. Duclohier, G. Molle, G. Spach, Biophys.J. 56 (1989) 1017.
- [Eis 91] G. Eisenman, O. Alvarez, J.Membrane Biol. 119 (1991) 109.
- [Eng 86] D.M. Engelman, T.A. Steitz, A. Goldman, Annu.Rev.Biophys.Biophysic.Chem. 15 (1986) 321.
- [Edm 85] D.T. Edmonds, Eur.Biophys.J. 13 (1985) 31.

- [Ep 98] R.M. Epand, *Biochim.Biophys.Acta* 1376 (1998) 353.
- [Ep 99] R.M. Epand, H.J. Vogel, *Biochim.Biophys.Acta* 1462 (1999) 11.
- [Eva 91] E. Evans, *Langmuir* 7 (1991) 1900.
- [Fen 95] W. Fenzl, *Z.Phys.B* 97 (1995) 333.
- [Gaz 94] E. Gazit, W.J. Lee, P.T. Brey, Y. Shai, *Biochemistry* 33 (1994) 10681.
- [Gaz 95] E. Gazit, A. Boman, H.G. Boman, Y. Shai, *Biochemistry* 34 (1995) 11479.
- [Gen 93] P.G. de Gennes, J. Prost, *The physics of liquid crystals* 2nd ed. Oxford University Press (1993).
- [Ges 97] M. Gesell, M. Zasloff, S.J. Opella, *J.Biomol. NMR* 9 (1997) 127.
- [Gil 89] M.K. Gilson, B. Honig, *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 86 (1989) 1524.
- [Gom 93] A. Vaz Gomes, A. de Waal, J.A. Berden, H.V. Wersterhoff, *Biochemistry* 32 (1993) 5365.
- [Gra 80] I.S. Gradshteyn, I.M. Ryzhik, *Table of integrals, series, and products* Academic Press, New York (1980).
- [Gra 92] E. Grant, T.J. Beeler, K.P.M. Taylor, K. Gable, M.A. Roseman, *Biochemistry* 31 (1992) 9912.
- [Gut 93] G.D. Guttman, D. Andleman, *J.Phys.II (France)* 3 (1993) 1411.
- [Hai 95] B. Haimovich, J.C. Tanaka, *Biochim.Biophys.Acta* 1240 (1995) 149.
- [He 95] K. He, S.J. Ludtke, H. Huang, *Biochemistry* 34 (1995) 15614.
- [Helf 73] W. Helfrich, *Z. Naturforsch.* 28c (1973) 693.
- [Hel 93] H. Heller, M. Schaefer, K. Schulten, *J.Phys.Chem.* 97 (1993) 8343.
- [Hel 97] W.T. Heller, K. He, S.J. Ludtke, T.A. Harroun, H.W. Huang, *Biophys.J.* 73 (1997) 239.
- [Hir 96] D.J. Hirsh, J. Hammer, W.L. Maloy, J. Blazyk, J. Schaefer, *Biochemistry* 35 (1996) 12733.
- [Hol 88] T.A. Holak, Å. Engström, P.J. Kraulis, G. Lindeberg, H. Bennich, T.A. Jones, A. Gronenborn, M. Chlore, *Biochemistry* 27 (1988) 7620.
- [Hua 95] H.W. Huang, *J.Phys.II (France)* 5 (1995) 1427.

- [Ino 77] K. Inoue, K. Suzuki, S. Nojima, J.Biol.Chem. 81 (1977) 1097.
- [Isra 95] J. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces* Academic Press, London (1995).
- [Jac 92] M. Jackson, H.H. Mantsch, J. Spencer, Biochemistry 31 (1992) 7289.
- [Jak 96] H.D. Jakubke, *Peptide: Chemie und Biologie* Spektrum Akad.Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford (1996) ISBN 3-8274-0000-7.
- [Jeu 96] W.H. de Jeu, J.D. Shindler, E.A.L. Mol, J.Appl.Cryst. 29 (1996) 511.
- [Jur 89] D.J. Juretić, H.-C. Chen, J.H. Brown, J.L. Morell, R.W. Hendler, H.V. Westerhoff, FEBS Lett. 249 (1989) 219.
- [Jur 94] D. Juretić, R.W. Hendler, F. Kamp, W.S. Caughey, M. Zasloff, H.V. Westerhoff, Biochemistry 33 (1994) 4562.
- [Kaw 93] E.H. Kawamoto, S. Lee, P.S. Pershan, M. Deutsch, N. Maskil, B.M. Ocko, Phys.Rev.B 47 (1993) 6847.
- [Kat 98] J. Katsaras, Biophys.J. 75 (1998) 2157.
- [Kja 94] K. Kjaer, Physica B 198 (1994) 100.
- [Lei 87] S. Leibler, R. Lipowsky, Phys.Rev.B. 35 (1987) 7004.
- [Lod 95] H. Lodish, D. Baltimore. *Molecular cell biology* Freeman, New York (1995).
- [Lud 94] S.J. Ludtke, K. He, Y. Wu, H.W. Huang, Biochim.Biophys.Acta 1190 (1994) 181.
- [Lud 95] S.J. Ludtke, K. He, H. Huang, Biochemistry 34 (1995) 16764.
- [Lud 96] S.J. Ludtke, K. He, W.T. Heller, T.A. Harroun, L. Yang, H. Huang, Biochemistry 35 (1996) 13723.
- [Lu 98] J. Lu, Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Sektion Physik, LS Peisl (1998)
- [Mah 76] J. Mahanty, B.W. Ninham, *Dispersion Forces* London (1976).
- [Mal 95] W.L. Maloy, U.P.Kari, Biopolymers 37 (1995) 105.
- [Mar 88] D. Marion, M. Zasloff, A. Bax, FEBS Lett. 227 (1998) 21.
- [Mats 89] K. Matsuzaki, M. Harada, T. Handa, S. Funakoshi, N. Fujii, H. Yajima, K. Miyajima, Biochim.Biophys.Acta 981 (1989) 130.
- [Mats 91] K. Matsuzaki, M. Harada, S. Funakoshi, N. Fujii, K. Miyajima, Biochim.Biophys.Acta 1063 (1991) 162.

- [Mats 94] K. Matsuzaki, O. Murase, H. Tokuda, S. Funakoshi, N. Fujii, K. Miyajima, *Biochemistry* 33 (1994) 3342.
- [Mats 95] K. Matsuzaki, O. Murase, N. Fujii, K. Miyajima, *Biochemistry* 34 (1995) 6521.
- [Mats 96] K. Matsuzaki, S. Yoneyama, O. Murase, K. Miyajima, *Biochemistry* 35 (1996) 8450.
- [Mats 97/1] K. Matsuzaki, K. Sugishita, M. Harada, N. Fujii, K. Miyajima, *Biochim.Biophys.Acta* 1327 (1997) 3423.
- [Mats 97/2] K. Matsuzaki, A. Nakamura, O. Murase, K. Sugishita, N. Fujii, K. Miyajima, *Biochemistry* 36 (1997) 2104.
- [Mats 98/1] K. Matsuzaki, K. Sugishita, N. Ishibe, M. Ueha, S. Nakata, K. Miyajima, R.M. Epand, *Biochemistry* 37 (1998) 11856.
- [Mats 98/2] K. Matsuzaki, Y. Mitani, K. Akada, O. Murase, S. Yoneyama, M. Zasloff, K. Miyajima, *Biochemistry* 37 (1998) 15144.
- [Mats 99] K. Matsuzaki, *Biochim.Biophys.Acta* 1462 (1999) 1.
- [Mil 93] M. Milik, J. Skolnick, *Proteins Struct.Funct.Genet.* 15 (1993) 10.
- [Mou 84] O.G. Mouritsen, M. Bloom, *Biophys.J.* 46 (1984) 141.
- [Mrz 96] K.M. Merz, B. Roux, *Biological membranes* Birkhäuser, Boston (1996).
- [Mue 99] C. Münster, Y. Lu, S. Schinzel, B. Bechinger, T. Salditt, *Eur.Biophys.J.* 28 (1999) 683.
- [Netz 97] R. Netz, *J.Phys. I France* 7 (1997) 833.
- [Num 99] N. Numao, Y. Hirota, A. Iwahori, S. Kidokoro, M. Sasatsu, I. Kondo, S. Itoh, T. Katoh, N. Shimozono, A. Yamazaki, K. Takao, S. Kobayashi, *Biol.Pharmacol.Bull.* 22 (1999) 73.
- [Ore 96] Z. Oren, Y. Shai, *Eur.J.Biochem.* 237 (1996) 303.
- [Ore 98] Z. Oren, Y. Shai, *Biopolymers* 47 (1998) 451.
- [Ohs 92] Y. Ohsaki, A.F. Gazdar, H.C. Chen, B.E. Johnson, *Cancer Res.* 52 (1992) 3534.
- [Oht 92] M. Ohta, H. Ito, K. Masuda, S. Tanaka, Y. Arakawa, R. Wacharotayankun, N. Kato, *Antimicrob. Agents Chemother.* 36 (1992) 1460.
- [Pal 93] G. Palasantzas, *Phys.Rev.B* 48 (1993) 2873.

- [Pol 97] I.V. Polozov, A.I. Polozova, J.G. Molotkovsky, R.M. Epand, *Biochim.Biophys.Acta* 1328 (1997) 125.
- [Pol 97/2] I.V. Polozov, A.I. Polozova, E.M. Tytler, G.M. Anantharamaiah, J.P. Segrest, R.M. Epand, *Biochemistry* 36 (1997) 9237.
- [Pou 92] Y. Pouny, D. Rapaport, A. Mor, P.Nikolas, Y. Shai, *Biochemistry* 31 (1992) 12416.
- [Rad 95] J.O. Rädler, T.J. Feder, H.H. Strey, E. Sackmann, *Phys.Rev.E.* 51 (1995) 4526.
- [Rus 90] T.P. Russel, *Mater.Sci.Rep.* 5 (1990) 171.
- [Saf 89] C.R. Safinya, E.B. Sirota, D. Roux, and G.S. Smith, *Phys.Rev.Lett.* 62 (1989) 1134; *ibid* 57 (1986) 2718.
- [Saf 94] S.A. Safran, *Statistical thermodynamics of surfaces, interfaces and membranes* Addison-Wesley, Reading (1994).
- [Salditt 95D] , T. Salditt, Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität München 1995.
- [Salditt 94] , T. Salditt, T. H. Metzger, J. Peisl, *Phys.Rev.Lett.* 73 (1994) 2228.
- [Salditt 95/1] , T. Salditt, (1995), T.H. Metzger, Ch. Brandt, U. Klemradt, J. Peisl, *Phys.Rev.B.* 51 (1995) 5617.
- [Salditt 95/2] , T. Salditt, T.H. Metzger, J. Peisl, B. Reinker, M. Moske, K. Samwer, *Europhys.Lett.* 32 (1995) 331.
- [Salditt 96] , T. Salditt, D. Lott, T.H. Metzger, J. Peisl, G. Vignaud, P. Hoghoj, O. Schärpf, P. Hinze, R. Lauer, *Phys.Rev.B* 54 (1996) 5860.
- [Salditt 99H] , T. Salditt, Habilitationsschrift Ludwig-Maximilians-Universität München 1999.
- [Salditt 2000] C. Li, C. Münster , T. Salditt, zu Veröffentlichen.
- [Sand 90] C.R. Sanders II, J.H. Prestegard, *Biophys.J.* 58 (1990) 447.
- [San 91] M.S.P. Sansom, *Prog.Biophys.molec.Biol.* 55 (1991) 139.
- [San 92] M.S.P. Sansom, *Eur.Biophys.J.* 21 (1992) 281.
- [San 93] M.S.P. Sansom, *Eur.Biophys.J.* 22 (1993) 105.
- [Schue 97] M. Schümann, M. Dathe, T. Wieprecht, M. Beyermann, M. Bienert, *Biochemistry* 36 (1997) 4345.
- [See 91] J. Seelig, P. Ganz, *Biochemistry* 30 (1991) 9354.

- [Sens 97/1] P. Sens, M.S. Turner (1997), J.de Phys. II, (1997) 7.
- [Sens 97/2] P. Sens, M.S. Turner, P. Pincus, Phys.Rev.E 55 (1997) 4394.
- [Sen 99] D. Sentenac, A.N. Shalaginov, A. Fera, W.H. de Jeu, J.Appl.Cryst. (eingereicht).
- [Seul 90] M. Seul, M.J. Sammon, Thin Solid Films 185 (1990) 287.
- [Sil 85] B.L. Silver, *The physical chemistry of membranes* Allen & Unwin, Winchester/Mass. (1985).
- [Sin 88] S.K. Sinha, E.B. Sirota, S. Garoff, H.B. Stanley, Phys.Rev.B 38 (1988) 2297.
- [Sin 94] S.K. Sinha, J.Phys.III (France) 4 (1994) 1543.
- [Sip 92] D. Sipos, M. Andersson, A. Ehrenberg, Eur.J.Biochem. 209 (1992) 163.
- [Sob 95] P.W. Soballe, W.L. Maloy, M.L. Myrnga, L.S. Jacob, M. Herlyn, Int.J.Cancer 60 (1995) 280.
- [Stry 75] L. Stryer, *Biochemistry* W.H.Freeman and Company, New York (1975).
- [Sun 94] S.F. Sun, *Physical chemistry of macromolecules: basic principles and issues* Wiley, New York (1994).
- [Szl 88] I. Szleifer, A. Ben-Shaul, W.M. Gelbart, J.Chem.Phys. 83 (1988) 3612.
- [Tan 90] C. Tanford, *The Hydrophobic Effect*, Wiley, New York (1990).
- [Tolan 99] M. Tolan, *X-Ray Scattering from Soft-Matter Thin Films* Springer, New York (1999) ISBN 3-540-65182-9.
- [Tur 97] M.S. Turner, P. Sens, Phys.Rev.E 55 (1997) 1257.
- [Vog 99] T.C.B. Vogt, B. Bechinger, J.Biol.Chem. 274 (1999) 29115.
- [Vog 2000] M. Vogel, C. Münster, W. Fenzl, D. Thiaudière, T. Salditt, Physica B 283 (2000) 32.
- [Wad 90] D. Wade, A. Boman, B. Wählin, C.M. Drain, D. Andreu, H.G. Boman, R.B. Merrifield, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87 (1990) 4761.
- [Wes 95] H.V. Westerhoff, M. Zasloff, J.L. Rosner, R.W. Hendler, A. de Waal, A. Vaz Gomes, P.M. Jongsma, A. Riethorst, D. Juretic, Eur.J.Biochem. 228 (1995) 257.
- [Whi 94] S.H. White, W.C. Wimbley, Curr.Opin.Struct.Biol. 4 (1994) 79.
- [Wie 96] T. Wieprecht, M. Dathe, M. Schumann, E. Krause, M. Beyermann, M. Bienert, Biochemistry 35 (1996) 10844.

- [Wie 97D] T. Wieprecht, Dissertation Berlin 1997.
- [Wie 97] T. Wieprecht, M. Dathe, R.M. Eppard, M. Beyermann, E. Krause, W.L. Maloy, D.L. MacDonald, M. Bienert, *Biochemistry* 36 (1997) 12869.
- [Wil 90] R.W. Williams, R. Starman, K.M.P. Taylor, K. Gable, T. Beeler, M. Zasloff, *Biochemistry* 29 (1990) 4490.
- [Yon 63] Y. Yoneda, *Phys.Rev.* 131 (1963) 2010.
- [Zas 87] M. Zasloff, *Proc.Nat.Acad.Sci. USA* 84 (1987) 5449.
- [Zas 88] M. Zasloff, B. Martin, H.-C. Chen, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 85 (1988) 910.

Anhang 1

Strukturen, Dreibuchstaben- und Einbuchstabencodes der natürlichen Aminosäuren (entnommen aus [Jak 96]).

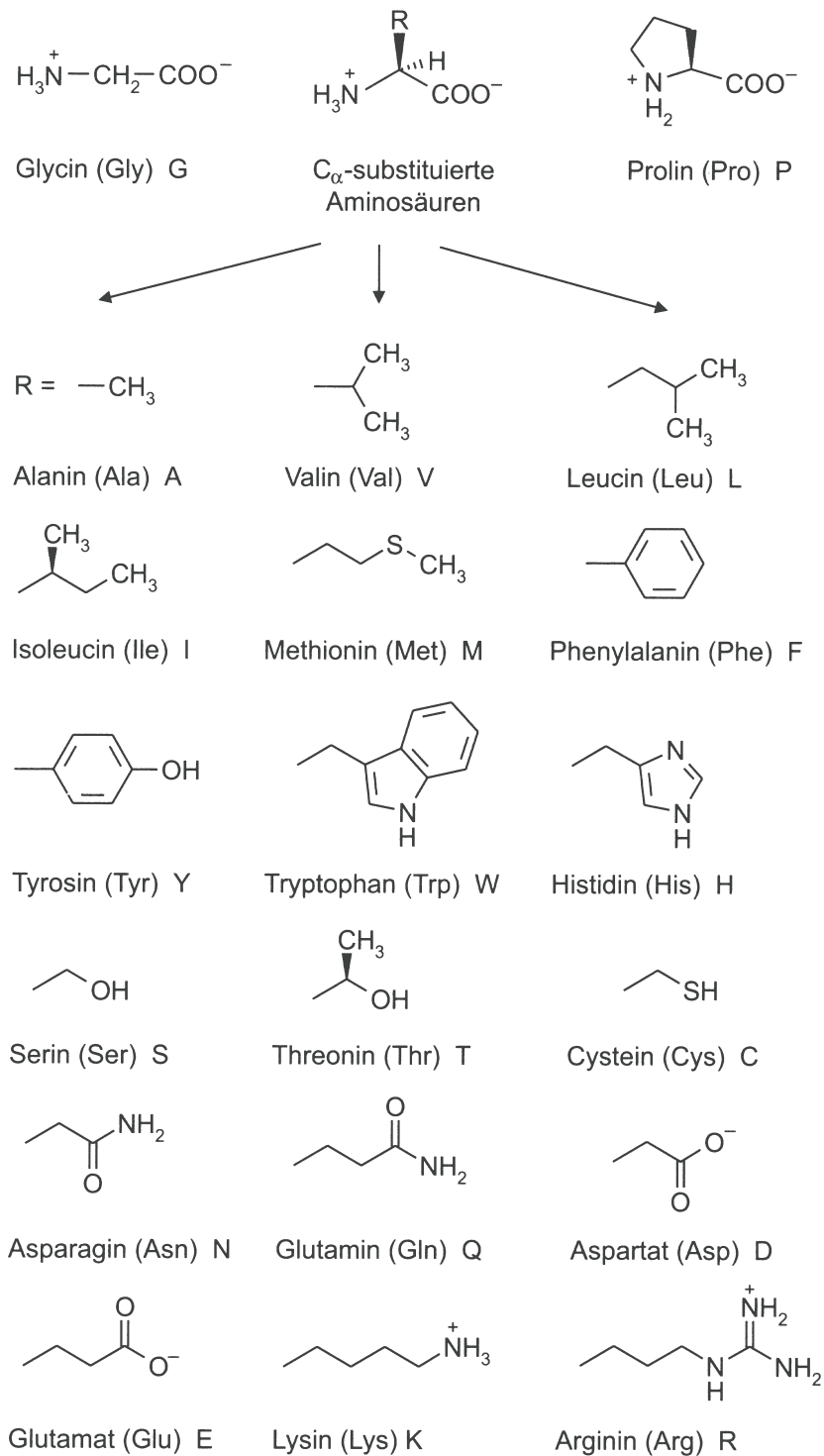


Abbildung 5.26: Natürlich vorkommende Aminosäuren

Anhang 2

Temperaturabhängige Entwicklung des Ketten-Kettenkorrelationsmaximums am Hauptphasenübergang von DMPC.

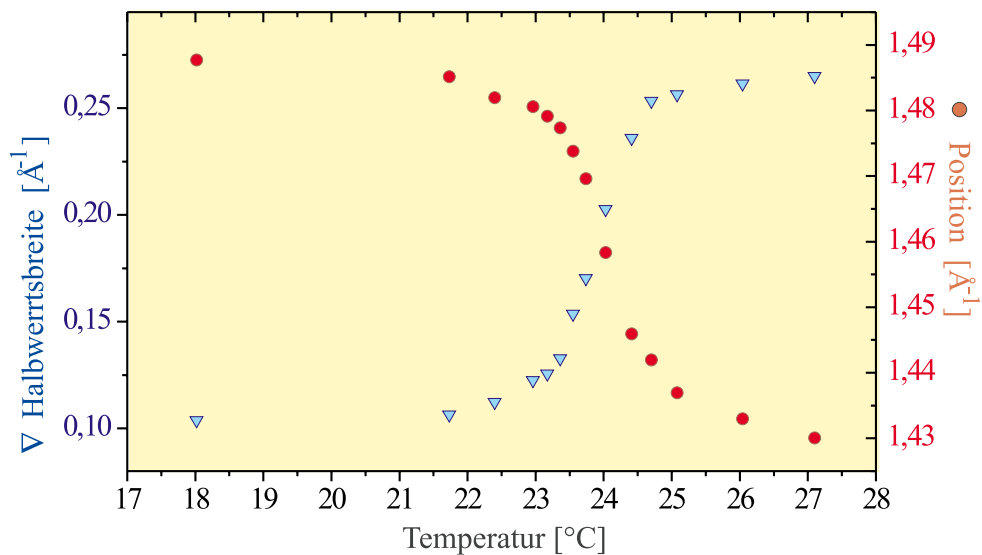


Abbildung 5.27: Temperaturabhängige Entwicklung des Ketten-Kettenkorrelationsmaximums am Hauptphasenübergang von DMPC. Aufgetragen ist die Positionsverschiebung des Korrelationsmaximums (rote Kreise) und die Änderung der zugehörigen Halbwertsbreite (blaue Dreiecke) aus dem in Abb. 5.8 dargestellten Phasenübergang.

Anhang 3

Reziproke Rastermessungen um das Ketten-Kettenkorrelationsmaximum eines orientierten multilamellaren Systems aus DLPC und Alamethicin. Beim reinen Lipid ist nur das Ketten-Ketten-Korrelationsmaximum sichtbar. Mit steigender Alamethicin-Konzentration tritt ein zusätzlicher Streubeitrag auf.

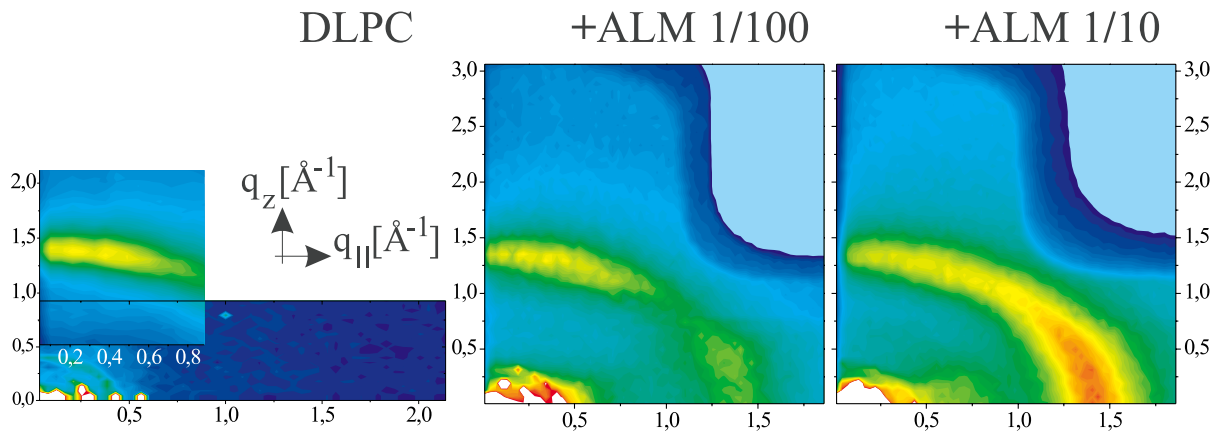


Abbildung 5.28: Ketten-Kettenkorrelationsmaximums von DLPC bei unterschiedlicher Konzentration von Alamethicin

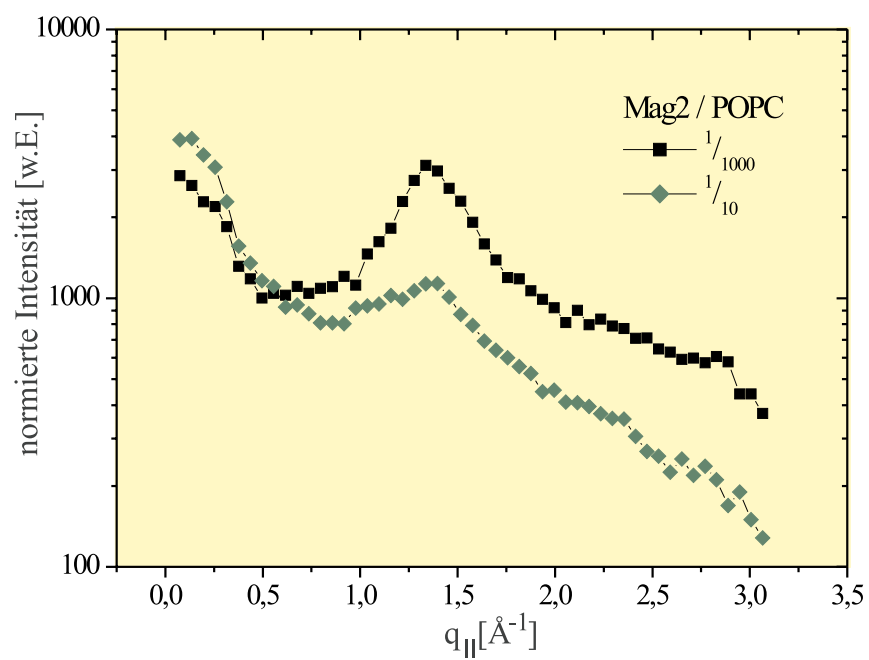


Abbildung 5.29: Ketten-Kettenkorrelationsmaximums von POPC bei unterschiedlicher Konzentration von Magainin2.

Danksagung

Allen voran danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Johann Peisl für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Lehrstuhl bei weitgehender Freiheit und mit seiner anhaltenden Unterstützung durchführen zu können.

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. Tim Salditt aussprechen, der mich für die Biophysik begeisterte und mir den Weg im anfangs dunklen reziproken Raum von Vielschichtsystemen zeigte. Meine Begeisterung wuchs durch die gute Zusammenarbeit bei sämtlichen Strahlzeiten in Hamburg und Grenoble. Es war dann letztlich ein Synergieeffekt durch das „Dreamteam“, bestehend aus Tim Salditt, Dipl.Phys. Michel Vogel und mir, der wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug. Den Michel habe ich dabei als wahren Freund kennengelernt, auf den man sich in jedem Fall verlassen kann. Anspruchsvolle Synchrotronmesszeiten, fördern dies zuverlässig zu Tage.

Die Diplomanden Jiehui Lu, Alban Lenzen, Jörg Müller und Chenghao Li trugen Ihrerseits durch engagierte und erfolgreiche Diplomarbeiten ebenfalls in hohem Maß zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Dr. Burkhard Bechinger und seiner Gruppe am Max-Planck-Institut für Biochemie bin ich für die fruchtbare Zusammenarbeit dankbar. Insbesondere Danke ich die für die Synthetisierung des Peptids Magainin2, dessen Finanzierung sonst undenkbar gewesen wäre.

Ausgezeichnete Experimentiermöglichkeiten fand ich am am Hasylab/Desy in Hamburg, an der ESRF in Grenoble unter weltweit einzigartigen Strahlbedingungen und am weltbesten Hochflußneutronenreaktor ILL, ebenfalls in Grenoble, vor. Bei dessen Mitarbeitern bedanke ich mich für ihre Unterstützung und ihren engagierten Einsatz.

Nicht vergessen möchte ich hier Herrn Reinhard Satzkowski meinen Dank zu sagen. Danke für seine äußerst flexible Termingestaltung beim Transport der Geräte nach Hamburg oder Grenoble. Hervorheben möchte ich seine große Hilfsbereitschaft. Danke auch Herrn Manfred Reitmeier, der viel Verständnis für unser kreatives Chaos aufbrachte.

Danke Herrn Wolf und seinem Team aus der Feinmechanikwerkstatt der Sektion Physik für die Anfertigung meiner experimentellen Wünsche, darunter zwei perfekte Probenkammern und die Komponenten für das neue Kleinwinkelstreuinstrument, das ich am Lehrstuhl

aufgebaut habe.

Ohne die Unterstützung unserer Ingenieure Christoph Singer und Stefan Manus in den unterschiedlichsten Belangen, von den Röntgenanlagen bis hin zu Rechnertücken, wäre es oft hart gewesen. Christoph Singer bin ich auch dafür dankbar, daß er uns erst zu einem Zeitpunkt verließ, an dem das Experiment schon in wesentlichen Teilen fertig war. Zum Thema Aufbau will ich mich an dieser Stelle auch bei meinem langjährigen Freund Andreas Renoth bedanken.

Allen Mitgliedern des Lehrstuhl danke ich für ein angenehmes Arbeitsklima. Besonders Lana Polero hat, nach einem Wechsel im Sekretariat, unserem Lehrstuhl eine neue Seele gegeben. Den Mitarbeitern des Zentrums für Nanowissenschaften CeNS danke ich für den regen wissenschaftlichen Austausch und eine kreative Forschungsumgebung. Hier möchte ich mich vor allem bei Jan Domke vom LS Gaub für die Anfertigung der AFM Bilder bedanken.

Mein Dank gilt nicht zuletzt Herrn Prof Dr. H.E. Gaub, der uns in der Anfangsphyse beim Aufbau unserer Arbeitsgruppe, insbesondere durch die Bereitstellung der Reinstwasseranlage, des Axiomat-Mikroskops und vieler anderer Dinge unterstützt hat.

Diese Arbeit wurde ebenfalls in der Aufbauphase von der Münchner Universitätsgesellschaft unterstützt. Der rasche Erfolg der Arbeitsgruppe und damit dieser Arbeit ist auch wesentlich durch deren unkomplizierte finanzielle Förderung begründet. Dies brachte uns ohne Zeitverlust für bürokratische Aufgaben schnell ans Ziel.

Christian Münster, im Sommer 2000.

Lebenslauf

Christian Michael Münster aus Berchtesgaden/Au

Familienstand: ledig

16.03.1971 geboren in Berchtesgaden/Salzberg

09/1977 bis 08/1981 Grundschule Berchtesgaden/Au

09/1981 bis 06/1990 Gymnasium Berchtesgaden

07/1990 bis 09/1991 Grundwehrdienst bei Geb.Jg.Btl 232 in Strub

10/1991 bis 08/1997 Studium der Physik an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

26.08.1997 Diplom in Physik

seit 09/1997 wissenschaftlicher Angestellter der Sektion Physik der
Ludwig-Maximilians-Universität München