

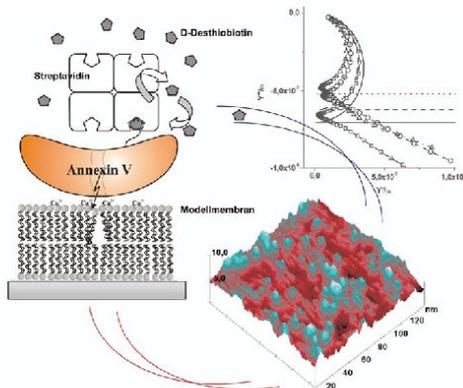


Katja Bender (Autor)

Entwicklung und Charakterisierung verschiedener biomimetischer Lipidmembransysteme zur Untersuchung von Membranproteinen

Katja Bender

Entwicklung und Charakterisierung
verschiedener biomimetischer Lipidmembransysteme
zur Untersuchung von Membranproteinen



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/2471>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

1	Einführung in die Thematik	1
1.1	Bedeutung und Funktion der biologischen Membran	1
1.2	Biomimetische Lipidmembransysteme	5
1.2.1	Monomolekulare Lipidfilme	6
1.2.2	Liposomale Dispersionen	6
1.2.3	Schwarze Lipidmembranen (<i>BLM's, black lipid membrane</i>)	7
1.2.4	Festkörperunterstützte Modellmembranen (<i>sBLM's, solid-supported membranes</i>)	8
1.2.5	Oberflächenverankerte Modellmembranen (<i>tBLM's, tethered bilayer lipid membranes</i>)	8
1.3	Lipide	11
1.3.1	Lipide natürlicher Membranen	11
	Formel	13
1.3.2	Lipide für den Aufbau der in dieser Arbeit beschriebenen Membranmodelle	17
1.3.2.1	Lipide für den Aufbau von festkörperunterstützten (spacerlosen) Thiolipid-Modellmembranen (<i>sBLM's</i>)	17
1.3.2.2	Lipide für den Aufbau von Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer unterstützten Modellmembranen (<i>tBLM's</i>)	19
1.4	Membranproteine	21
1.4.1	Membranproteine, allgemein	21
1.4.2	Membranproteine dieser Arbeit	22
1.4.2.1	Annexin V	22
1.4.2.2	Valinomycin	28
1.4.2.3	Cytochrom-c-Oxidase	30
2	Motivation und Zielsetzung	35
2.1	Motivation	35
2.2	Zielsetzung	36
3	Entwicklung verschiedener Modellmembransysteme	39
3.1	Festkörperunterstützte (spacerlose) Thiolipid-Modellmembranen (sBLM's)	39
3.1.1	Weiterentwicklung der spacerlosen Thiolipid-Modellmembran	40
3.2	Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer unterstützte Modellmembranen (tBLM's)	43
3.2.1	Weiterentwicklung der Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer unterstützten Modellmembran	45
3.2.1.1	Direkte elektrostatische Anbindung der Lipidmembran auf plasmapolymerisierten Maleinsäureanhydrid-Filmen	45
3.2.1.2	Aufbau der Lipidmembran auf Decylamin modifizierten plasma-polymerisierten Maleinsäureanhydrid-Filmen	47
4	Charakterisierungsmethoden	51

4.1 Impedanzspektroskopie (EIS)	51
4.1.1 Die elektrische Doppelschicht	52
4.1.2 Grundlagen der Impedanzspektroskopie (EIS)	58
4.1.3 Ersatzschaltkreise und Impedanzspektren (Grundlagen)	65
4.1.3.1 Bode-Plot	65
4.1.3.2 Der Nyquist-Plot	73
4.1.3.3 Der frequenzreduzierte Admittanz- oder Kapazitäts-Plot	77
4.1.4 Ersatzschaltkreise für Modellmembransysteme	82
4.1.5 Kapazität und Widerstand zur Kontrolle des Architekturaufbaus und als Qualitätsmerkmal biomimetischer Membransysteme	84
4.2 Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPS)	89
4.2.1 Grundlagen der Oberflächenplasmonenspektroskopie (SPS)	89
4.2.2 Oberflächenplasmonen	92
4.2.2.1 Otto-Konfiguration	97
4.2.2.2 Kretschmann-Konfiguration	97
4.2.3 Einfluss dünner dielektrischer Schichten auf die Anregung des Oberflächenplasmons	98
4.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)	101
4.3.1 Grundlagen der Rasterkraftmikroskopie (AFM)	102
4.3.2 Messmethode	104
4.3.2.1 Kontakt-Modus (engl. contact mode)	104
4.3.2.2 Kontaktfreier Modus (engl. non-contact mode)	105
4.3.2.3 Periodischer Kontakt-Modus (engl. intermittent-contact mode, tapping mode)	105
4.3.2.4 Aufzeichnung der Phase (engl. Phase Imaging)	106
4.3.2.4 Bestimmung der relativen Oberflächenbelegung mittels Bildanalyse	106
4.4 Fluoreszenzwiedererlangung nach Photobleichung (FRAP)	107
4.4.1 Grundlagen FRAP	107
4.5 Kontaktwinkel-Messung	109
4.5.1 Grundlagen Kontaktwinkel	110
4.5.2 Hysterese in Kontaktwinkelmessungen	112
5 Ergebnisse und Diskussion	115
5.1 Festkörperunterstützte (spacerlose) Thiolipid-Modellmembran (sBLM's)	115
5.1.1 Aufbau der binären Submonolage aus 2-Mercaptoethanol/DPPE, 2-step self-assembly versus Koadsorption	115
5.1.1.1 Optische Schichtdicken der binären Submonolagen	116
5.1.1.2 Elektrochemische Eigenschaften der binären Submonolagen	117
5.1.1.3 Untersuchung der Oberflächentopographie (AFM) und der Kontaktwinkel der Submonolage	119
5.1.1.4 Zusammenfassung des Kapitels 5.1.1	132
5.1.2 Membranaufbau durch Vesikelspreitung	133
5.1.2.1 Vesikelspreitung auf reinen DPPE-Monolagen	133
5.1.2.2 Vesikelspreitung auf durch Koadsorption präparierten binären Monolagen	138

5.1.2.3 Vesikelspreitung auf zweistufig präparierten (2-step self-assembling) binären Submonolagen	139
5.1.2.4 Zusammenfassung des Kapitels 5.1.2	152
5.1.3 Anwendung der sBLM zur Untersuchung der in vitro-Kanaleigenschaften der Annexin V-Mutanten und deren Hemmung	153
5.1.3.1 Proteinbindung	153
5.1.3.2 Proteinaktivität	155
5.1.3.3 AFM-Messungen an der Annexin V-Schicht	163
5.1.3.4 Zusammenfassung des Kapitels 5.1.3	166
5.2 Die Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymer (MAH-PP) unterstützte Modellmembran (tBLM)	168
5.2.1 Quellbarkeit des Maleinsäureanhydrid-Plasmapolymers (MAH-PP)	169
5.2.1.1 Wasseraufnahmefähigkeit des MAH-PP	169
5.2.1.2 Zusammenfassung des Kapitels 5.2.1	170
5.2.2 Membranaufbau auf plasmapolymerisierten Maleinsäureanhydrid-Filmen	171
5.2.2.1 Direkte elektrostatische Anbindung der Lipidmembran auf plasma-polymerisierten Maleinsäureanhydrid-Filmen	171
5.2.2.2 Aufbau der Lipidmembran auf Decylamin modifizierten plasma-polymerisierten Maleinsäureanhydrid-Filmen	174
5.2.2.2.1 Funktionalisierung mit Decylamin	174
5.2.2.2.2 SPS- und EIS-Messungen der Vesikelspreitung	176
A) Spreitung von zwitterionischen DPhytPC-Lipiden	176
B) Spreitung von negativ geladenen DPhytPG und zwitterionischen DPhytPC-Lipidmischungen	178
5.2.2.2.3 FRAP-Messungen an auf Decylamin modifizierten MAH-PP aufgebauten Lipidmembranen	183
A) FRAP-Messungen an einer auf einem Decylamin modifizierten MAH-PP Film aufgebauten Ca ²⁺ -freien Membran	184
B) FRAP-Messungen an einer auf Decylamin modifizierten MAH-PP Filmen aufgebauten Ca ²⁺ -haltigen Membran	186
5.2.2.2.4 Einbau und Aktivität von Membranproteinen	187
A) Valinomycin	188
B) Cytochrom-c-Oxidase (CcOX)	189
5.2.2.3 Zusammenfassung des Kapitels 5.2.2	191
6 Experimenteller Teil	195
6.1 Materialien	195
6.2 Pufferherstellung	196
6.3 Substrat-Lösungen	198
6.4 Proteine	198
6.5 Vesikelpräparation	199
6.6 Assemblierungslösungen	200
6.7 Probenpräparation	200

6.8 Untersuchungsmethoden	202
7 Abschließende Diskussion	211
8 Anhang	215
8.1. Plasma und Plasmapolymerisation	215
8.2 Messzellen (Abbildungen)	223
8.2.1 Messzelle für die kombinierte Oberflächenplasmonen- und Impedanzspektroskopie	223
8.2.2 Messzelle für die elektrochemische Impedanzspektroskopie	224
Abbildungsverzeichnis	225
Literaturverzeichnis	233
Danksagung	253
Lebenslauf	257