

Biophysikalische Untersuchungen zur Interaktion des C3-Proteins mit Lipidoberflächen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
an der Fakultät für Physik des Karlsruher Instituts für
Technologie (KIT)

genehmigte
DISSERTATION

von

Dipl. Phys. Yvonne Klapper

Referent:	Professor Dr. G. Ulrich Nienhaus
Korreferent:	Professor Dr. Wolfgang Wenzel
Tag der mündlichen Prüfung:	30. Mai 2014

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, noch nicht anderweitig zu Prüfungszwecken vorgelegt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt, sowie wörtliche oder sinngemäße Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Karlsruhe, Mai 2014

(Yvonne Klapper)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	6
2.1	Lipide	6
2.1.1	Chemische Struktur und Aufbau	6
2.1.2	Membranmodelle	8
2.2	Proteine	15
2.2.1	Aufbau und Struktur	15
2.2.2	Proteinbiochemie	18
2.2.3	Komplement Komponente 3 (C3)	20
2.3	Interaktion von Lipiden und Proteinen	24
2.3.1	Bindung zweier Reaktionspartner	24
2.3.2	Bindung mehrerer Reaktionspartner	25
2.4	Fluoreszenzmikroskopie	28
2.4.1	Prinzipien der Fluoreszenz	28
2.4.2	Fluoreszenz-Markierung	34
2.4.3	Konfokale Mikroskopie	41
2.4.4	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	43
2.5	Weitere Mikroskopie- und Messverfahren	53
2.5.1	Transmissionselektronenmikroskopie	53
2.5.2	Schwingquarzwaage	56
3	Untersuchungen zur C3-Lipid Interaktion	63
3.1	Komplementaktivierung	64
3.2	Planare Lipidoberflächen	68
3.2.1	Immunoblot	68
3.2.2	Schwingquarzwaage	72
3.3	Stark gekrümmte Lipidoberflächen	78

3.3.1	Lipidquantenpunkte als Membranmodell	80
3.3.2	Interaktionsmessungen mit 2fFCS	85
4	Diskussion der Ergebnisse und Messmethoden	109
4.1	C3 Aktivierung durch Lipidoberflächen	109
4.1.1	Komplementaktivierung	109
4.1.2	Planare Lipidoberflächen	111
4.1.3	Stark gekrümmte Lipidoberflächen	114
4.1.4	Vergleich planarer und stark gekrümmter Lipidoberflächen	118
4.2	Methoden zur Klärung der C3 Aktivierung	119
4.2.1	Einzelbetrachtung	119
4.2.2	Gegenüberstellung	127
5	Zusammenfassung und Ausblick	129
	Abkürzungsverzeichnis	133
	Literaturverzeichnis	135
A	Publikationen	155
B	Tagungsbeiträge	156
C	Danksagung	159

Kapitel 1

Einleitung

Die Untersuchung der Lipid-Protein Wechselwirkung ist nicht unbegründet ein bedeutendes Forschungsgebiet: Betrachtet man den Aufbau von Zellen, bestehen diese aus verschiedenen Membrankompartimenten mit charakteristischer Form, Lipidkomposition und unterschiedlicher Dynamik. Eine große Anzahl an Proteinen interagiert mit diesen. Abbildung 1.1 zeigt, wie vielfältig die Interaktionen sein können: Ionenkanäle werden gebildet, Proteine integriert, helikale Proteine eingebaut oder sogar ganze Proteinkomplexe und Rezeptoren an die Lipidoberfläche gebunden.

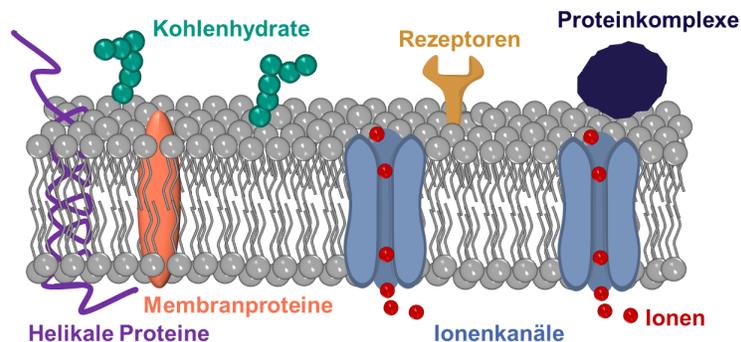


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einer menschlichen Zellmembran. Protein-Lipid Wechselwirkungen finden kontinuierlich durch das Einbauen von Membranproteinen, Ionenkanälen, helikalen Proteinen oder das Anlagern von Proteinkomplexen und Rezeptoren statt.

Durch verschiedenartige Kompartimente der Zellmembran wird eine Gesamtstruktur generiert und die Aktivierung von Membranproteinen, Dynamiken und Membrantransporte sowie intrazelluläre Signalleitung gesteuert. Zahlreiche Fragen werden dadurch allerdings aufgeworfen. Als Beispiel sei die Fragestellung genannt, wie die Proteinstruktur, die Proteinfaltung und Funktion durch die Lipidmembran beeinflusst wird [1–3]. Der Mechanismus der Integration von Proteinen in Membranen [4–8] ist dabei besonders von Interesse und ebenso, welche Auswirkung sie hat. Beispielsweise können durch den Einbau von Proteinen in die Membran Ionenkanäle ausgebildet werden [9–11] oder es kann durch Bindung von Proteinen an einen Rezeptor der Membran zur Signalleitung kommen [12, 13]. Immer wieder stellt sich die Frage, wie die Proteinfunktion bewahrt, deaktiviert, oder weiter aktiviert wird, sowohl durch einen längeren, als auch kurzen Kontakt mit der Lipidumgebung.

Nicht nur in diesem biologischen Kontext ist die Interaktion von Protein und Lipid von großer Bedeutung: In der Medizin werden Substanzen für zahlreiche therapeutische Anwendungen in einer Lipidhülle verkapselt. Das wasserunlösliche Arznei- oder auch Kontrastmittel wird in einer Phospholipid-Doppelschicht eingehüllt [14, 15]. Die Lipidhülle weist analog zu den natürlich vorkommenden Lipiden im menschlichen Körper eine geringe Toxizität und ebenso Allergenität auf. In der Lipidschicht kann zudem durch Oberflächenmodifizierungen ein zielsuchender Ligand verankert werden, wodurch eine Richtung bzw. ein Ziel für das transportierte Arzneimittel vorgegeben wird (aktives Targeting). Toxische Wirkstoffe gelangen an den Bestimmungsort, ohne gesunde Zellen zuvor zu beschädigen. Abbildung 1.2 zeigt schematisch den zielgerichteten Transport von lipidverkapselten Arzneimitteln zu Tumorzellen, in die der Wirkstoff schließlich abgegeben wird.

Bereits erfolgreich eingesetzt wurde dies bei den mittlerweile kommerziell erhältlichen Medikamenten zur Behandlung von Tumorgewebe, mit den Wirkstoffen Doxorubicin und Paclitaxel [14–16]. Trotz der Eigenschaft, dass Lipide körpereigene Bestandteile sind, kommt es jedoch häufig zur Immunreaktion mit oft ungeklärter Ursache [17, 18]. Betrachtet man die unterschiedlichen Regulatorproteine auf einer Lipidoberfläche, können durch die Kenntnis initialer Aktivierungs- oder Deaktivierungsprozesse von Proteinen, Oberflächen nicht nur für eine gerichtete Medikamentenverabreichung, sondern zudem in Hinblick auf die Anwendung bei Implantaten gezielt verändert werden. Ein solches Wissen wurde zur Modifizierung von Oberflächen mit Immunregulatoren angewandt, um eine Immunantwort zu verhindern [19, 20].

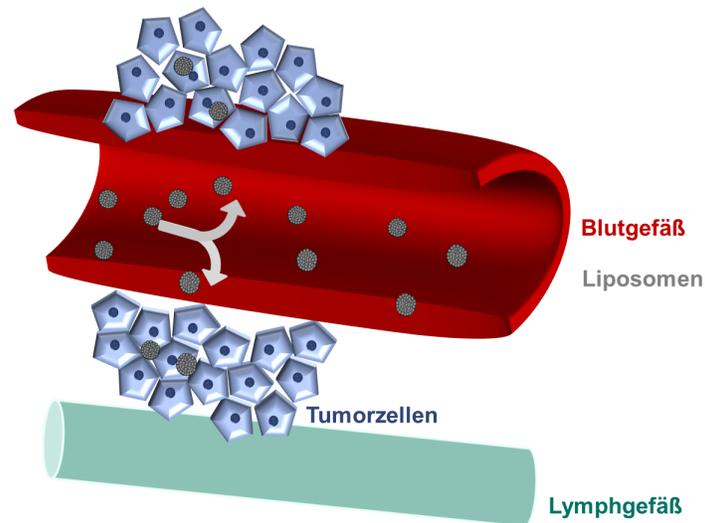


Abbildung 1.2: Aufnahme von lipidgekapselten Arzneimitteln in Tumorzellen. Eine Protein-Lipid Wechselwirkung findet während therapeutischer Anwendung aufgrund der Verkapselung von Arzneimitteln oder Kontrastmitteln mit Lipiden (als Liposomen) statt.

Betrachtet man die zur Verfügung stehenden Untersuchungsmethoden von Lipid-Protein Wechselwirkungen, so sind meist durch die Methode selbst viele Grenzen gegeben, wie die Kontrolle von Oberflächenbeschaffenheiten, ein hoher Bedarf an Probe, Markierung mit beeinflussenden Reagenzien oder eine geringe Sensitivität der Methode. Beispiele für Untersuchungsmethoden sind biochemische Verfahren wie Immunoassays, ELISA, SDS-PAGE oder Immunoblotting [21–23], sensorbasierte Messverfahren wie Schwingquarzwage [24], Oberflächenplasmonenresonanz [25, 26] oder Mikroskopieverfahren wie Elektronen- [27, 28] und Fluoreszenzmikroskopie [29–31].

Spezieller wissenschaftlicher Beitrag dieser Arbeit ist die Untersuchung und Aufklärung der Protein-Lipid Interaktion des Komplementproteins C3 mit neutralen Lipidoberflächen. Zuerst soll allgemein eine Aktivierung des Komplementsystems untersucht und im Anschluss detailliert das Bindungsverhalten von C3 an Lipidoberflächen charakterisiert werden, um ein besseres Verständnis für eine Immunantwort, ausgelöst durch Lipidoberflächen, zu erhalten. Das C3 Protein stellt das Kernstück der Reaktionskaskade des Kom-

plementsystems dar, das ein Teil der angeborenen Immunantwort ist. Nur wenn C3 aktiviert wird, kann die Kaskade vorangetrieben werden, und es kommt zur Ausschüttung von Anaphylatoxinen, zur Markierung und zum Abtransport von Zellen sowie zur Zellyse. Aus diesem Grund ist dessen Aktivierungsmechanismus von besonderem Interesse.

Die Aktivierung des Komplementsystems, d.h., indirekt des C3, durch Liposomen wurde bereits zahlreich beschrieben [17, 32–34]. Ebenso wurde die direkte Interaktion von Liposomen mit C3 untersucht [35]. In den vorausgehenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Stärke der Aktivierung des Komplementsystems sowohl von der Sättigung der verwendeten Lipide [33,36], vom Cholesterolgehalt [33,37] sowie von der Ladung der Lipide [33] abhängt. Des Weiteren ist eine starke Abhängigkeit der Komplementaktivierung von der Krümmung der Lipidoberfläche aufgezeigt worden, wobei eine stärkere Krümmung zu einer geringeren Aktivierung führt [38,39]. Mit der vorliegenden Arbeit soll detaillierter aufgeklärt werden, ob neutrale Lipidoberflächen das Komplementsystem aktivieren können und auf welche Weise. In der Literatur sind Hinweise gegeben, dass neutrale Lipide das Komplementsystem aktivieren; allerdings sind bisher keine detaillierten Studien bekannt, die eine genaue Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus aufzeigen. Die grundlegende Aufklärung dieses Prozesses stellt neben dem Wissenszugewinn dieses bedeutenden biologischen Mechanismus im menschlichen Körper zudem die Möglichkeit dar, dem Abwehrmechanismus des Körpers während der medizinischen Behandlung mit lipidumhüllten Präparaten gezielt entgegen zu wirken, wenn die Ursachen der Reaktion aufgeklärt sind.

Ziel ist es, mit Hilfe unterschiedlicher biophysikalischer Methoden, ergänzt und unterstützt durch biochemische Untersuchungsverfahren, ein Gesamtbild der Interaktion von C3 mit Lipidoberflächen zu erstellen, zuerst in Hinblick auf eine Komplementaktivierung und im weiteren Verlauf in Hinblick auf die Bindungsreaktionen zwischen C3 und den Lipidoberflächen. Wichtige Methoden hierfür sind Immunoassayverfahren, Immunoblotting, die Schwingquarzwage an planaren Lipidschichten und Fluoreszenzanalysetechnik zur Untersuchung von Lipidquantenpunkten als Membranmodell stark gekrümmter Oberflächen.

Im folgenden Kapitel 2 werden theoretische Grundlagen erläutert. Dabei werden zuerst Lipide behandelt, ihre grundlegenden Eigenschaften, chemische Struktur und Funktion diskutiert und abschließend verschiedene Membranmodelle vorgestellt. Das zweite Unterkapitel beschäftigt sich mit Proteinen, deren Struktur und biochemischen Untersuchungsmöglichkeiten. Im letzten Abschnitt wird zudem das Komplementsystem und im Besonderen das Protein C3, auch Komplement Komponente 3 genannt, vorgestellt. Beide Komponenten - Lipid und Protein - verbindend, wird die theoretische Beschreibung der Bindungen zweier oder mehrerer Interaktionspartner dargestellt. Anschließend werden die für diese Arbeit bedeutenden Untersuchungsmethoden erläutert, beginnend bei der Fluoreszenzmikroskopie, wobei zuerst auf das Prinzip der Fluoreszenz und danach auf das Mikroskopieverfahren eingegangen wird. Weiter werden Transmissionselektronenmikroskopie und die sensorbasierte Messmethode der Schwingquarzwaage vorgestellt, die zum einen als Charakterisierungsverfahren und zum anderen als Untersuchungsmöglichkeit planarer Lipidoberflächen dienen.

Nach den theoretischen Grundlagen werden die Untersuchungen der C3-Lipid-Interaktion in Kapitel 3 vorgestellt. Zuerst geht es dabei um die biochemische Detektion der Komplementaktivierung, ausgelöst durch neutrale Lipidvesikel (Liposomen) in menschlichem Blutplasma. Nach dieser generellen Untersuchung des Aktivierungsprozesses wird detailliert die Interaktion des C3 Proteins mit planaren Lipidoberflächen untersucht. Dazu wird die Methode des Immunoblot und der Schwingquarzwaage verwendet, um nicht nur Bindungsereignisse von C3 zu detektieren, sondern ebenso die Konformation des gebundenen Proteins zu analysieren. Um gekrümmte Lipidoberflächen untersuchen und zudem eine quantitative Aussage über Interaktionsereignisse treffen zu können, werden eine Methodenkombination aus lipidumhüllten Quantenpunkten und Fluoreszenzanalysetechnik, deren Optimierung und Charakterisierung sowie die erzielten Ergebnisse erläutert. Eine Diskussion der erzielten Ergebnisse, der verwendeten Messmethoden und deren Gegenüberstellung ist in Kapitel 4 enthalten.

Abschließend gibt Kapitel 5 eine Zusammenfassung und zeigt einen Ausblick auf weitere Untersuchungsmöglichkeiten und Fragestellungen auf.

Kapitel 2

Theoretische Grundlagen

2.1 Lipide

In diesem Unterkapitel werden Lipide zuerst hinsichtlich ihrer chemischen Struktur, ihres Aufbaus und ihres natürlichen Vorkommens betrachtet. Im Anschluss daran werden unterschiedliche Membranmodelle, aufgebaut aus Lipiden, für Untersuchungen *in vitro* aufgezeigt.

2.1.1 Chemische Struktur und Aufbau

Mit Lipid (*griech.* το λίπος, Fett) bezeichnet man allgemein biologische Stoffe, die eine lipophile, d.h., hydrophobe (= wasserunlösliche) Gruppe besitzen und dadurch in unpolaren Lösungsmitteln löslich sind. Man unterscheidet verseifbare Lipide, wie Glyceride und Phospholipide, von nicht verseifbaren, wie z.B. Steroide [40]. Im menschlichen Körper erfüllen Lipide hauptsächlich drei Aufgaben: Erstens dienen sie als Energiespeicher (Triglyceride, Steryl-ester), zweitens zur Signalweiterleitung und für Erkennungsprozesse, und drittens als Grundbaustein der Zellmembran. Für letztere Aufgabe sind meist amphiphile Moleküle, die aus einer hydrophilen Kopf- und einer hydrophoben Schwanzgruppe bestehen, von Bedeutung. Beispiel hierfür sind die Phospholipide. Eine Zellmembran besteht allerdings nicht nur aus Lipidgrundbausteinen, sondern es sind zusätzlich Proteine darin enthalten (Abbildung 1.1). Um die Bedeutung der Membranbildung durch Lipide hervorzuheben, beschreiben Van Meer et al. [41] jedoch Lipide als Grenze, die zwischen Leben und Tod für einzelne Zellen entscheidet.

Die Gruppe der Phospholipide wird im Folgenden genauer betrachtet. Abbildung 2.1 (a) zeigt schematisch deren Aufbau. Die Fettsäureketten (gelb), die zusammen mit der Carboxylgruppe des Glycerols (blau) als unpolare Schwanzgruppe bezeichnet werden, können entweder gesättigt oder ungesättigt sein, d.h., keine oder mindestens eine Doppelbindung besitzen. Zudem kann ihre Länge (14 – 24 Kohlenwasserstoffatome) unterschiedlich sein. Eine Phosphatgruppe (grün) dient als Verbindungsstück zwischen der Schwanz- und Kopfgruppe (grau). Letztere kann aus verschiedenartigen funktionellen Gruppen wie Phosphocholin (PC), Phosphoserin (PS) oder Phosphoethanolamin (PE), um die häufigsten zu nennen, zusammengesetzt sein. Abbildung 2.1 (b) zeigt die Struktur der Kopfgruppen. Die am häufigsten vorkommenden Phospholipide sind die mit Kopfgruppen aus PC gefolgt von PE.

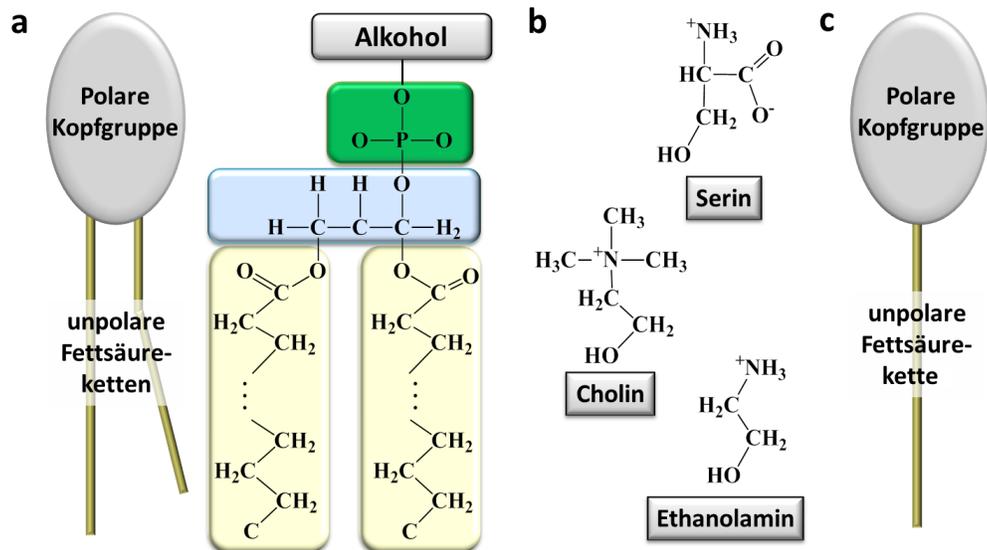


Abbildung 2.1: Aufbau von Phospholipiden. (a) Diese bestehen aus einer hydrophoben Kopf- (grau) und einer hydrophilen Schwanzgruppe (gelb). Kopf- und Schwanzgruppe sind durch eine Phosphat- (grün) und eine Glycerolgruppe (blau) verbunden. (b) Unterschiedliche Kopfgruppen führen zu einer negativen, neutralen oder positiven Gesamtladung. (c) Schematische Darstellung von Lysophospholipiden mit nur einer Fettsäurekette.

Tabelle 2.1 zeigt den Phospholipidgehalt verschiedener Organellen [42], aufgeteilt nach der jeweiligen Kopfgruppe. Ein geringer Unterschied in der Lipidkomposition führt zu einer anderen Funktion: andere Stoffe können durch die Membran wandern, andere Proteine in die Membran einbauen bzw. andere Proteine durch diese aktiviert bzw. reguliert werden.

Tabelle 2.1: Phospholipidgehalt verschiedener Organellen, aufgeteilt nach Kopfgruppen und ausgedrückt als %-Anteil des gesamten Phospholipidgehalts (PC: Phosphocholin; PE: Phosphoethanolamin; PS: Phosphoserin) [42].

Vorkommen	PC	PE	PS
Endoplasmatisches Retikulum	55	30	3-5
Golgi Apparat	50	15	5
Frühes Endosom	47	23	8,5
Spätes Endosom	48 – 49	18,5 – 20	2,5 – 3,9
Mitochondrien	40 – 46	30 – 35	1
Plasmamembran	42	25	12

Eine Untergruppe der Phospholipide bilden die **Lysophospholipide** (Abbildung 2.1 (c)), die nur eine einzige Schwanzgruppe besitzen. Sie tragen zur Entwicklung des Nerven-, Gefäß-, Immun- und Reproduktionssystem bei [12, 43, 44].

2.1.2 Membranmodelle

Um biologische Membrane *in vitro* genauer untersuchen zu können, wurden unterschiedliche Membranmodelle entwickelt. Im Folgenden werden Möglichkeiten aufgezeigt, wie Membranmodelle aufgebaut werden können.

Liposomen

Aufgrund ihrer Amphiphilie ordnen sich Lipide in wässriger Lösung so an, dass die hydrophoben Schwanzgruppen vom Wasser weg, die hydrophilen Kopfgruppen zum Wasser hin zeigen. Dadurch ergeben sich kleine Mizellen mit hohem Krümmungsradius aus einer einfachen Lipidschicht bzw. größere, aus einer Doppelschicht bestehende, Liposomen. Liposomen (*griech.* το λίπος, Fett und το σωμα, der Körper) sind Vesikel (*lat.* vesicula, Bläschen), die eine

wässrige Lösung umschließen und eine Lipiddoppelschicht als Abschluss haben. Je nachdem, ob innerhalb einzelner Liposomen weitere Liposomen enthalten sind, unterscheidet man zwischen mehr- (multilamellaren) und einschichtigen (unilamellaren) Liposomen. Ein weiterer Parameter zur Charakterisierung ist der Durchmesser, welcher zwischen 25 nm und 100 μm liegen kann. Die Zusammensetzung der Lipiddoppelschicht ist je nach Anwendung sehr unterschiedlich gestaltbar. Dabei können ebenso Proteine mit in die Schicht eingebunden werden. Fasst man dies zusammen, ergibt sich folgende systematische Einteilung:

- *Multilamellar vesicles* (MLV), Durchmesser 100 – 1000 nm, bestehend aus mehreren konzentrischen Lipiddoppelschichten,
- *small unilamellar vesicles* (SUV), Durchmesser 25 – 100 nm, bestehend aus einer konzentrischen Lipiddoppelschicht,
- *large unilamellar vesicles* (LUV), Durchmesser 1 μm , bestehend aus einer konzentrischen Lipiddoppelschicht,
- *giant unilamellar vesicles* (GUV), Durchmesser 1 – 100 μm , bestehend aus einer konzentrischen Lipiddoppelschicht.

Um die Größe bzw. den Durchmesser der Liposomen zu vermessen wird u.a. die Methode der **Dynamischen Lichtstreuung** (*dynamic light scattering*; DLS) verwendet. Die Probe wird mit einem Laser beleuchtet und die aufgrund der sich in der Lösung befindlichen Partikel hervorgerufene Streuung des Lichtes detektiert. D.h., Intensitätsschwankungen in der Rückstreuung aufgrund der Brownschen Bewegung der Partikel, werden vermessen (Laser-Doppler-Anemometrie), mit einem digitalen Korrelator korreliert und mittels Stokes-Einstein Gleichung (siehe Abschnitt 3.3.2) in eine Größe umgerechnet. Betrachtet man die Auswertung im Detail [45], gilt für die Autokorrelationsfunktion

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}, \quad (2.1)$$

mit der Intensität I zur Zeit t bzw. $(t + \tau)$. Ausgedrückt in der Feld-Feld-Autokorrelation ergibt sich die Siegbert Gleichung

$$g^{(2)}(\tau) = B + \beta[g^{(1)}(\tau)], \quad (2.2)$$

mit dem Parameter β , der abhängig von der Geometrie des Messaufbaus ist, und B als Basislinie. Weiter gilt

$$g^{(1)}(\tau) = \frac{\langle E(t)E^*(t + \tau) \rangle}{\langle E^*(t) \rangle^2} \quad (2.3)$$

mit E als elektrisches Feld der Streuwelle zum Zeitpunkt t und $(t + \tau)$. Betrachtet man monodisperse Lösungen, folgt $g^{(1)}$ einem einfachen exponentiellen Abfall, definiert durch

$$g^{(1)} = e^{-\Gamma\tau}, \quad (2.4)$$

mit der Abklingrate $\Gamma = Dq^2$, die sich aus dem Diffusionskoeffizienten D und der Stärke der Streuung des Wellenvektors q zusammensetzt. Dieser ist definiert als Differenz der Wellenvektoren des einfallenden und austretenden Strahls mit

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\vartheta}{2}\right). \quad (2.5)$$

Dabei ist n der Brechungsindex der Lösung, λ_0 die Wellenlänge, und mit ϑ wird der Streuwinkel bezeichnet.

Bei polydispersen Lösungen wird $g^{(1)}$ aus einer Summe oder Integral zusammengesetzt

$$g^{(1)} = \int_0^\infty G(\Gamma) e^{-\Gamma\tau} d\Gamma, \quad (2.6)$$

wobei gilt $\int_0^\infty G(\Gamma) d\Gamma = 1$.

Neben der Bestimmung der Größe aufgrund der dynamischen Lichtstreuung der sich bewegenden Partikel durch Brownschen Bewegung kann das ζ -Potential zur Charakterisierung der Oberflächenladung bestimmt werden. Dies erfolgt mittels **Elektrophoretischer Lichtstreuung**. Während der Messung wird ein elektrisches Potential angelegt, sodass sich die Partikel aufgrund dessen bewegen (= Elektrophoretische Mobilität) und nicht aufgrund der Brownschen Bewegung wie bei der DLS Messung. Die Bewegung wird erneut durch Laser-Doppler-Anemometrie bestimmt. Betrachtet man die Bewegung von Partikeln, die eine bestimmte Oberflächenladung besitzen, ist deren Geschwindigkeit ν proportional zum angelegten elektrischen Feld E , verknüpft durch die elektrophoretische Mobilität μ_E mit

$$\mu_E = \frac{\nu}{E}. \quad (2.7)$$

Die elektrophoretische Mobilität μ_E der Probe ist durch die Smoluchowski Gleichung definiert als

$$\mu_E = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \zeta, \quad (2.8)$$

mit der relativen Dielektrizitätskonstanten ϵ_r der Lösung und ϵ_0 des Vakuums, dem ζ -Potential ζ , sowie der Viskosität η . Liegt ein elektrisches Feld senkrecht zur Orientierung der Partikel an, hängt μ_E zudem vom Radius a der Teilchen und vom Debye-Hückel Parameter κ ab. Dieser gibt an, ab welchem Radius der Ionenwolke das elektrische Potential auf $1/e$ abgefallen ist. Es gilt

$$\mu_E = \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{\eta} \zeta f(\kappa a), \quad (2.9)$$

mit der Henry-Funktion $f(\kappa a)$, die wie folgt definiert wird,

$$f(\kappa a) = 1 - \frac{4a^4}{\zeta} \int_a^\infty \frac{\Psi^{(0)}(r)}{r^5} dr + \frac{a^2}{\zeta} \int_a^\infty \frac{\Psi^{(0)}(r)}{r^3} dr, \quad (2.10)$$

wobei $\Psi^{(0)}$ das elektrische Potential im Equilibrium bezeichnet, r den Abstand vom Mittelpunkt, und a den Teilchenradius benennt [46, 47].

Geht man von dem Fall aus, dass $a\kappa < 1$ gilt, kann die elektrophoretische Mobilität genähert werden zu

$$\mu_E = \frac{2\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{3\eta}. \quad (2.11)$$

Für wässrige Lösungen mit mäßiger Elektrolytkonzentration kann die Henry-Funktion zu $f(\kappa a) = 1,5$ genähert werden (Smoluchowski Näherung).

Freistehende planare Lipiddoppelschichten

Freistehende planare Lipiddoppelschichten (*black lipid membrane*; BLM) wurden bereits vor über 40 Jahren als Modellmembranen in der Wissenschaft etabliert [48–50]. Sie werden über ein kleines Loch (wenige Mikrometer bis Zentimeter) gespannt, dessen Material (z.B. Teflon, silanisiertes Glas) sehr unterschiedlich sein kann. Untersucht werden mit dieser Methode vor allem Ionenkanäle und damit die porenbildenden Eigenschaften von Proteinen in Membranen. Werden Proteine, die Ionenkanäle ausbilden, von einer Seite der freistehenden Lipiddoppelschicht (BLM) zugegeben, kann das Ausbilden dieser Poren bei angelegter Spannung über der Membran durch einen

Stromanstieg gemessen werden [10, 51]. Abbildung 2.2 zeigt ein Beispiel für die Messung von Ionenkanälen im Picoampère-Bereich, induziert durch das antimikrobielle Peptid Gramacidin A. Durch Integration des Peptids werden Ionenkanäle geöffnet, sodass der Strom ansteigt, bis der Kanal nach einer bestimmten Öffnungszeit wieder geschlossen wird, gleichbedeutend mit einem Rückgang des Stromflusses. Beispielsweise kann damit der Wirkmechanismus von Antibiotika gegenüber Bakterien *in vitro* aufgezeigt werden: Antibiotika bilden Ionenkanäle in Bakterienzellen, wodurch analog *in vivo* der elektrochemische Gradient der Zelle zerstört wird und diese abstirbt [52].

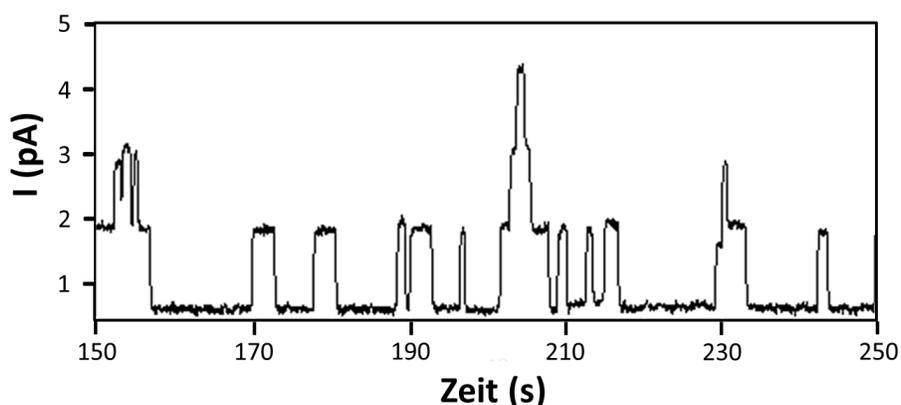


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung einer Ionenkanalmessung mit der BLM Methode. Der stufenweise Stromanstieg als Zeichen für eine Kanalöffnung bzw. Stromabfall für eine Kanalschließung aufgrund der Integration von porenbildenden Membranproteinen wird am Beispiel Gramacidin A im zeitlichen Verlauf aufgezeichnet.

Aufliegende planare Lipidschichten

Lipiddoppel- oder Monoschichten, die auf einem festen Untergrund aufliegen (*supported lipid bilayer*; SLB), dienen ebenso als Modellmembranen. Je nach Ladung und chemischer Eigenschaft von Lipid und Untergrund können entweder Monoschichten, Lipiddoppelschichten oder vesikeladsorbierte Oberflächenstrukturen generiert werden. Zur Herstellung von Lipidschichten gibt es unterschiedliche Verfahren.

Abbildung 2.3 fasst die wichtigsten zusammen. Bei der Langmuir-Blodgett Technik wird ausgenutzt, dass sich an der Wasser-Luft-Grenzschicht eine Monoschicht aus Lipiden bildet. Wird diese mit einer hydrophoben/hydrophilen Oberfläche abgetragen, ergibt sich ein Lipidfilm. Durch wiederholtes Abtragen einer Lipidmonoschicht auf der Wasseroberfläche können mehrere Lipidschichten generiert werden (Abbildung 2.3 (a) und (b)) [53, 54]. Des Weiteren können durch Selbstorganisation und Chemisorption Monoschichten oder verschiedenartige Lagen generiert werden (Abbildung 2.3 (c)). Bei der Vesikel-Fusions-Methode werden Liposomen auf eine Oberfläche gegeben [55, 56], die ab einer bestimmten Konzentration aufbrechen und eine Lipiddoppelschicht bilden (Abbildung 2.3 (d) und (e)).

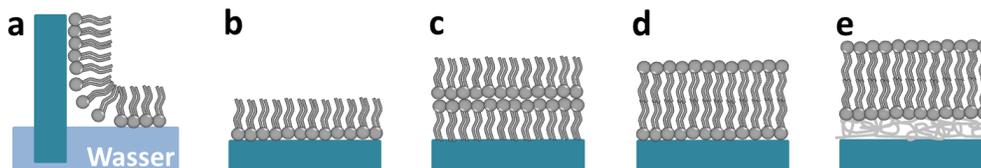


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung zum Prinzip der Herstellung von Modellmembranen (dunkelgrau) auf einer Unterlage (türkis). (a) Langmuir-Blodgett Technik zur Herstellung von (b) Lipidmonoschichten auf hydrophoben Unterlagen, (c) selbstorganisierte Lipidschichten auf hydrophober Unterlage, (d) Lipiddoppelschicht auf hydrophiler Unterlage, (e) polymerbeschichtete (hellgrau) Unterlage mit Lipiddoppelschicht.

Folgende Faktoren sollten bei der Verwendung von SLBs beachtet werden:

- **Luftstabilität:** Sofern die Lipidschicht nicht fest auf der Oberfläche verankert ist, wird diese beim Durchqueren der Wasser-Luft-Grenze zerstört. Eine Lösung bilden Cholesterol-Anker, die die Lipiddoppelschichten auf einer Oberfläche fest verankern [57].
- **Einfluss der Unterlage:** Misst man die Proteinbindung an aufliegenden Lipidschichten, kann der Untergrund einen Einfluss auf die Messung ausüben [58, 59]. Daher werden oft Polymerbeschichtungen (*polymer-cushioned SLB*) verwendet, um den Einfluss auf die Bindungsmessungen zu verringern (Abbildung 2.3 (e)).

Nanodisks

Nanodisks sind selbstorganisierte Modellmembrane mit einem Durchmesser von ca. 10 nm, die für die Untersuchung von Membraneigenschaften und Membranproteinen herangezogen werden [60–62]. Sie bestehen aus einer Lipidinsel, welche durch ein amphipathisches Protein (*membrane scaffold protein*; Gerüstprotein) zusammengehalten wird.

Abbildung 2.4 zeigt eine schematische Darstellung dazu. Das Protein (blau) lagert sich um die Lipidschicht (grau) an den hydrophoben Fettsäureketten an und bildet damit das Gerüst der Modellmembran. Die Integration von helikalen Proteinen (lila) oder Kohlenhydraten (türkis) ist dabei einfach möglich. Der Vorteil bei diesem Membranmodell ist wie bei der BLM der mögliche Zugang zur Membran von beiden Seiten und die hohe Variabilität der Lipidkomposition und Proteinintegration.

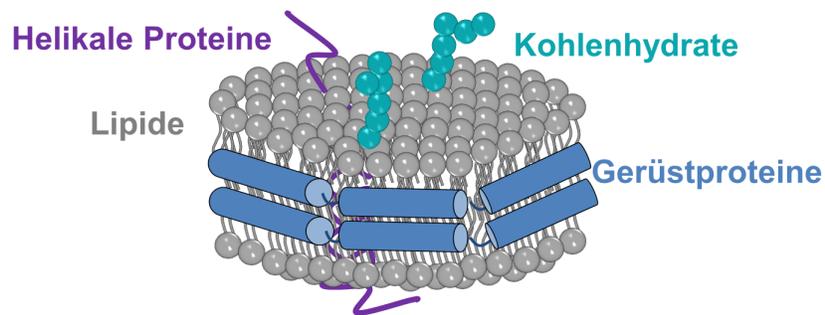


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Nanodisk.

2.2 Proteine

In diesem Unterkapitel wird die Struktur von Proteinen diskutiert, und im Weiteren werden biochemische Untersuchungsmöglichkeiten erläutert. Der letzte Abschnitt beschäftigt sich mit den Grundlagen der Komplement Komponente 3 (C3), die als Beispielprotein für die Untersuchung von Protein-Lipid Interaktionen in dieser Arbeit dient.

2.2.1 Aufbau und Struktur

Proteine sind aus 100 bis 30000 Aminosäuren aufgebaut. Eine Aminosäure besteht aus einem zentralen Kohlenstoffatom (C_α), an welches eine Aminogruppe (NH_2), eine Carboxylgruppe ($COOH$) und eine unterschiedlich gestaltbare Seitengruppe (R) gebunden sind (Abbildung 2.5 (a)). Gekennzeichnet werden sie neben ihrem Namen durch einen Ein- oder Dreibuchstaben-code. Aminosäuren bilden eine lineare Kette (Aminosäuresequenz) und werden durch eine Peptidbindung, d.h. eine Bindung zwischen einer NH_2 - und $COOH$ -Gruppe unter Abspaltung eines Wassermoleküls, miteinander verbunden (Abbildung 2.5 (b) apricot).

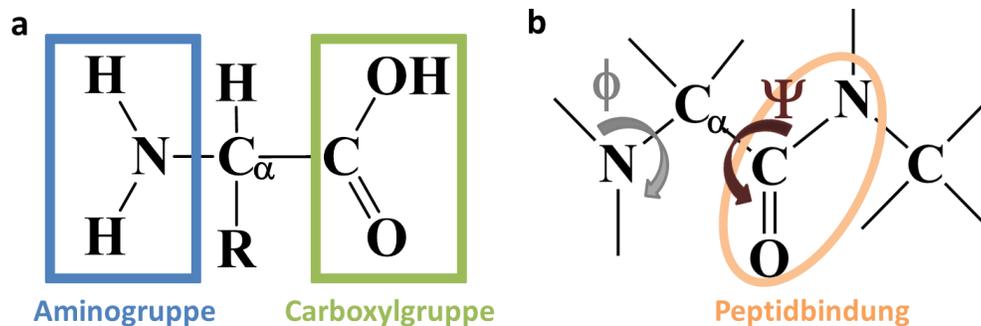


Abbildung 2.5: Aufbau eines Proteins, bestehend aus einem zentralen Kohlenstoffatom C_α , an welches eine Aminogruppe (blau), eine Carboxylgruppe (grün) und eine Seitenkette (R) gebunden sind.

Oberstes Prinzip für die Orientierung des Proteins ist immer die Gesamtminimierung der freien Energie. Zurückgehend auf Kaj Ulrik Linderstrøm-Lang (1952), unterscheidet man vier verschiedene Konformationen: Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur [63].

1. Betrachtet man die Abfolge der Aminosäuresequenz vom N- zum C-Terminus hintereinander gesetzt, spricht man von **Primärstruktur**.
2. Die räumliche Anordnung der Aminosäuren wird **Sekundärstruktur** (Abbildung 2.6 (a) – (b)) genannt. Bedeutend für die mehrdimensionale Struktur sind die beiden Torsionswinkel des Proteinrückgrats ϕ , zwischen -N- und -C $_{\alpha}$ - Atom, und ψ , zwischen -C- und -C $_{\alpha}$ - Atom. In Abbildung 2.5 (b) sind diese beiden Winkel in grau bzw. braun dargestellt. Dabei können unterschiedliche Sekundärstrukturelemente wie z.B. α -Helix oder β -Faltblatt entstehen, die durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden. Abbildung 2.6 (a) und (b) zeigt jeweils ein Beispiel hierfür.
3. Als **Tertiärstruktur** wird die dreidimensionale Struktur, d.h., der Zusammenschluss mehrerer Elemente der Sekundärstruktur bezeichnet (Abbildung 2.6 (c)). Kovalente (z.B. Disulfidbrücken), nicht-kovalente (z.B. Wasserstoffbrückenbindungen) Bindungskräfte, sowie hydrophobe, ionische oder Van-der-Waals-Kräfte ermöglichen hierbei den Zusammenhalt der Struktur.
4. Ein Zusammenschluss mehrerer Proteinmoleküle zu einem funktionellen Komplex wird **Quartärstruktur** genannt (Abbildung 2.6 (d)).

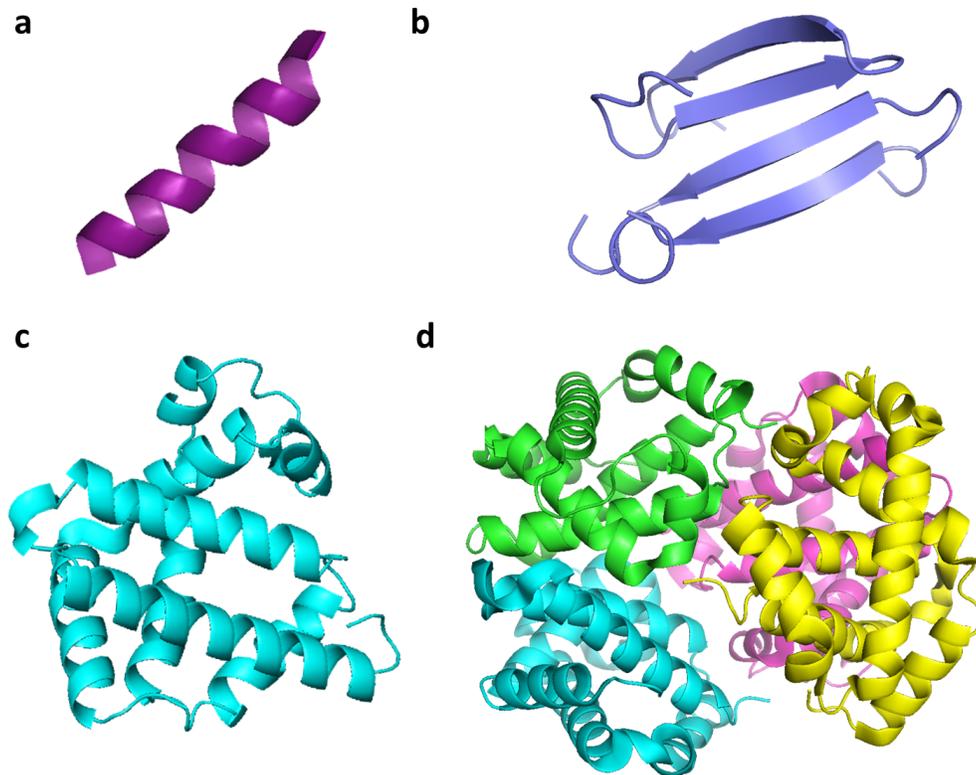


Abbildung 2.6: Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur eines Proteins. Sekundärstruktur in der Form einer (a) α -Helix (pdb: 2irg) und eines (b) β -Faltblatt (Motiv aus pdb: 1ert), sowie die (c) Tertiärstruktur des Myoglobins (pdb: 1mwd) und (d) Quartärstruktur des Hämoglobins (pdb: 1hgc).

2.2.2 Proteinbiochemie

Zur biochemischen Charakterisierung von Proteinen werden hauptsächlich Methoden herangezogen, die entweder Stoffgemische hinsichtlich ihres Absorptionsverhaltens untersuchen, oder nach der Molekülmasse auftrennen. Eine weitere Möglichkeit bietet die Detektion unterschiedlicher Komponenten eines Moleküls durch spezifische Antikörper, die den Grad der Aktivierung oder Denaturierung des Proteins dadurch anzeigen.

Absorptionsmessung

Betrachtet man einen Lichtstrahl mit Intensität I_0 und Wellenlänge λ , der durch eine Probe der Dicke d strahlt, so verliert dieser dabei an Intensität, in der Form

$$I = I_0 10^{-\epsilon(\lambda) \cdot d \cdot c}. \quad (2.12)$$

Mit c wird die Konzentration des absorbierenden Materials (z.B. ein Protein in Lösung) bezeichnet, welche einen wellenlängenabhängigen Extinktionskoeffizienten $\epsilon(\lambda)$ aufweist. Wird die Absorptionsfähigkeit A in Abhängigkeit der Wellenlänge λ des verwendeten Lichts gemessen, d.h. $A(\lambda)$, ergibt sich gemäß Lambert-Beerschem Gesetz

$$A(\lambda) = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon(\lambda) \cdot d \cdot c. \quad (2.13)$$

Elektrophorese

Bei der Elektrophorese werden durch ein elektrisches Feld kolloidale Teilchen durch ein Trägermedium (Gel) bewegt. Unterschiedlich große oder unterschiedlich geladene Moleküle weisen verschiedene Wandergeschwindigkeiten auf und werden durch die Porengröße des verwendeten Gels getrennt.

Die Natriumdodecylsulfat-Polyakrylamid-Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; SDS-PAGE) stellt eine etablierte Methode dar. Durch Zugabe von SDS zur Proteinmischung wird das Protein durch dieses anionische Detergens mit einer konstanten negativen Ladung überdeckt. Dadurch kommt es zur gegenseitigen Abstoßung und durch Erhitzen (95 °C) zur Denaturierung des Proteins; d.h., sowohl die Bindungen der Tertiär- als auch der Sekundärstruktur werden aufgebrochen. Die nun gestreckten negativ geladenen Proteine werden auf das Gel aufgetragen und durch Anlegen einer Spannung aufgrund ihrer Kettenlänge aufgetrennt. Mit geeigneten Färbungen, wie z.B. mit Coomassie-Brillant-Blau, werden diese abschließend detektiert.

Immunoblot

Um spezifisch nicht nur nach der Größe einzelne Proteine und Proteinketten nachzuweisen, verwendet man Immunoblots, auch Western blots genannt. Vorausgehend ist eine Gelelektrophorese, die die Proteine bzw. Proteinketten nach ihrer Größe auftrennt. Meist durch Elektrotransfer werden Proteine auf eine Trägermembran transferiert, wobei das Muster der Auftrennung erhalten bleibt. Die übertragenen Proteine und Proteinbestandteile können durch Farbstoffe eingefärbt und sichtbar gemacht werden oder mit Hilfe von markierten Antikörpern selektiv detektiert und bestimmt werden. Dazu wird ein Antikörper (Primärantikörper) gegen das Protein oder Proteinstück aufgetragen; als zweiter Schritt wird ein Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper gerichtet. Der Sekundärantikörper ist meist durch ein Enzym markiert. Nach Zugabe eines Substrates wird das Enzym umgesetzt und es kommt zu einer Farbreaktion. Der Sekundärantikörper - und damit der Primärantikörper und das Protein - werden durch einen Farbumschlag nachgewiesen. Mit einem Photometer wird die Absorption gemessen und dadurch die Konzentration des Proteins berechnet. Man unterscheidet zwischen monoklonalen (*griech.* *μόνο*, einzig und *το κλών*, Zweig) und polyklonalen (*griech.* *πολύς*, viel) Antikörpern. Erstere binden spezifisch an ein einziges Epitop, letztere dagegen an mehrere Epitope.

Der Vorteil bei Immunoblots liegt in der Größen- und Ladungsauftrennung und anschließender spezifischer Detektion. Bei Stoffgemischen mit mehreren Proteinen ist dies allerdings schwierig, da es zu Überlagerungen kommen kann. Für solche Fragestellungen sind Immunoassay-Verfahren von Vorteil.

Immunoassay-Verfahren

Eng verknüpft mit den Immunoblots ist das ebenso antikörperbasierte Nachweisverfahren der Immunoassays. Neben dem Nachweis durch Radioaktivitätsmessungen wird hauptsächlich eine enzymatische Farbreaktion zum Nachweis verwendet. ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) ist ein Beispiel für enzymatische Immunoabsorptionsverfahren. Dabei wird wie beim Immunoblot ein Primär- und Sekundärantikörper und eine enzymatische Reaktion zur Detektion verwendet. Zuerst werden Mikrotiterplatten mit einem Fangantikörper gegen das nachzuweisende Protein, z.B. ein bestimmtes Serumprotein, beschichtet. Daraufhin wird die Probenmischung zugegeben, das gesuchte Protein wird an die Mikrotiterplatte gebunden und das Detektionsverfahren mit Primär- und Sekundärantikörper gestartet.

2.2.3 Komplement Komponente 3 (C3)

Das Komplementsystem ist ein Teil des angeborenen Immunsystems und ist dabei eines der Haupt-Effektor-Mechanismen der antikörpervermittelten Immunreaktion. Mehr als 30 lösliche und membrangebundene Glycoproteine sind in das Komplementsystem eingebunden. Allgemein obliegt dem Komplementsystem die Funktion der Beseitigung von apoptotischen Zellen und körperfremden Substanzen, Förderung der humoralen Immunität, Modifizierung der T-Zellen Antwort und Regulation der Toleranz in Hinblick auf Antigene gegenüber sich selbst.

Das Komplementsystem ist in einer Reaktionskaskade organisiert, sodass schrittweise Proteine nacheinander aktiviert werden [64–67]. Abbildung 2.7 zeigt dies schematisch auf. Für die Aktivierung der Komplementkaskade ist hauptsächlich ein oberflächengetriggertes Prozess verantwortlich, der auf drei Aktivierungswegen geschehen kann:

- Dem Klassischen Weg, durch Erkennen von Immunglobulinen,
- dem Alternativen Weg, durch die Interaktion mit Bakterien, Viren und Immunkomplexen,
- dem Lektin-Weg, durch das Erkennen von bestimmten Kohlenhydraten auf mikrotischen Oberflächen.

Alle drei Wege führen zur Aktivierung des zentralen Komplementproteins C3. Durch Spaltung von C3 in C3a und C3b entsteht zum einen ein Anaphylatoxin (C3a), und zum anderen wird mit dem C3b Teil ein Opsonin gebildet. Nach der Aktivierung des C3 kann es neben dem weiteren Fortlauf der Kaskade ebenso zur Deaktivierung kommen und dadurch zum Stillstand der gesamten Reaktionskaskade. In diesem Fall bindet Faktor I in Kombination mit einem Ko-Faktor, Ko-Faktor H, an die aktivierte Form des C3, führt zur Abspaltung von Epitopen des aktivierten C3 und blockiert die Bindungsstellen für die weiteren Reaktionen in der Kaskade. Wird C3 nicht deaktiviert, wird über mehrere Zwischenschritte der terminale Komplementkomplex C5b-9 gebildet. Dieser Komplex, auch als Membranangriffskomplex (*membrane attack complex*; MAC) bezeichnet, wird in die Membran in einer porenähnlichen Struktur eingebaut und kann zur Zellyse führen. Wird dieser in die flüssige Phase ausgeschüttet, bindet er an Vikronektin und zirkuliert in der Form des sC5b-9 (s für *soluble*, löslich) im Blutkreislauf.

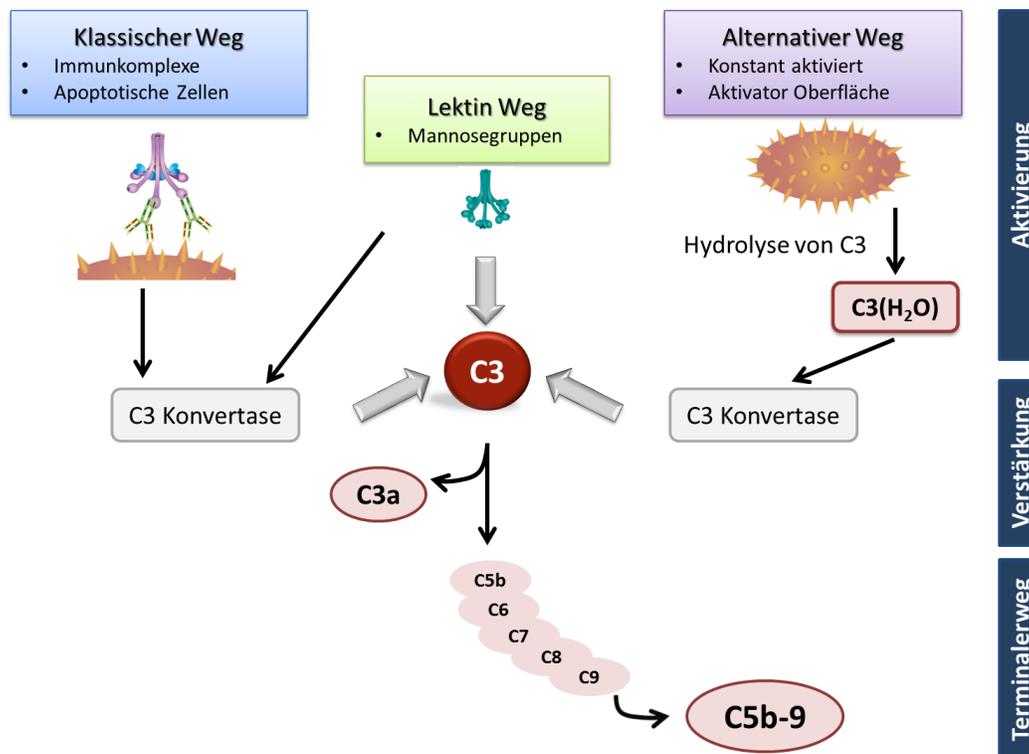


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Komplementkaskade. Das Komplementsystem kann über drei Wege aktiviert werden: Klassischer, Lektin und Alternativer Weg. Alle führen zur Aktivierung des zentralen Komplementproteins C3 und nachfolgend über mehrere Zwischenschritte zur Formation des terminalen Komplementkomplexes C5b-9.

Im Detail betrachtet sind die Auswirkungen eines aktivierten Komplementsystems [68]: Opsonisierung, d.h., Markierung von Pathogenen und damit Förderung der Phagozytose; Attraktion von Phagozyten (Chemotaxis) zur Entzündungsstelle; Lyse von körperfremden Pathogenen durch Zerstörung ihrer Zellmembran.

Als Dreh- und Angelpunkt in der Reaktionskaskade wird im Folgenden das Komplementprotein C3 genauer betrachtet. Das Protein gehört zur Familie der Makroglobuline und ist mit einer Konzentration von 1 g l^{-1} im Blut-

plasma enthalten. Während einer Entzündung im Körper ist die Konzentration an C3 schnell und stark erhöht, um möglichst schnell den Körper von den fremden Substanzen zu befreien. Abbildung 2.8 (a) zeigt das C3 Protein mit der α -Kette von 115 kDa und β -Kette von 75 kDa, die mittels Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Eine Cartoon-Darstellung ist in Abbildung 2.8 (b) gezeigt, bei welcher die Filamentstruktur (*lat. filum, Faden*) des Proteins sichtbar wird. Das elektrostatische Potential von $-12 k_B T$ (rot) bis $+12 k_B T$ (blau) wird in Abbildung 2.8 (c) veranschaulicht.

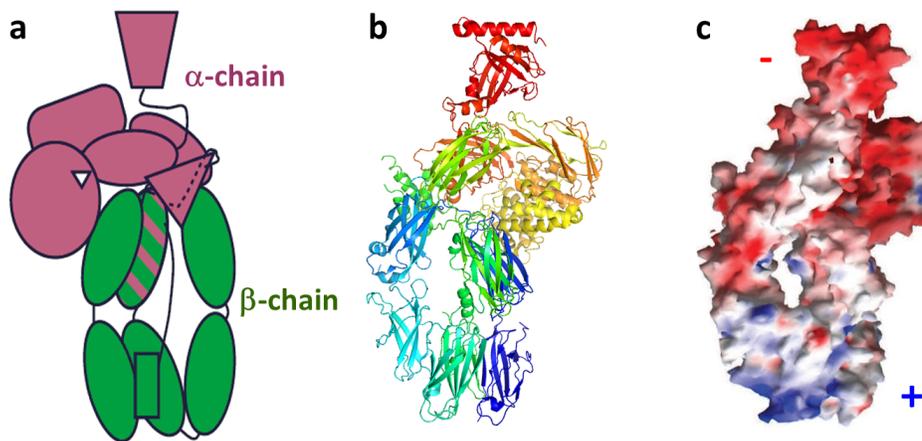


Abbildung 2.8: Darstellung der Komplement Komponente 3 (C3). α - und β -Kette (a), sowie eine Cartoon-Darstellung (b). (c) elektrostatisches Potential des C3 Moleküls (rot: $-12 k_B T$; blau: $+12 k_B T$) [69].

Aktivierung von C3, und damit ein Fortlaufen der Reaktionskaskade, kann zum einen die Spaltung von C3 durch eine Konvertase in das kurze Anaphylatoxin C3a (9 kDa) und das konformationsveränderte C3b (181 kDa) bedeuten [70, 71]. Zum anderen gelingt eine Aktivierung des C3 ebenso durch das Aufbrechen einer hydrophoben Tasche, die eine Thioesterbindung verbirgt. Diese zweite Aktivierungsmöglichkeit wird mit der 'tick-over' Theorie beschrieben, die besagt, dass durch eine spontane Hydrolyse diese Konformationsänderung zustande kommt [72, 73]. Die dadurch generierte Form von C3 wird als C3(H₂O) bezeichnet, welche weiter den Ablauf der Aktivierungskaskade antreibt. Der Prozess ist vermutlich verantwortlich für die Aktivierung des Alternativen Weges. Neueste Ergebnisse lassen allerdings darauf schließen,

dass C3(H₂O) nicht nur durch spontane Hydrolyse, sondern ebenso durch Kontakt mit den unterschiedlichsten Oberflächen gebildet wird. So weisen verschiedene Untersuchungen die Konformationsänderung C3(H₂O) durch Kontakt mit Polymeroberflächen [74, 75], Bakterien [76] oder aktivierten Blutplättchen [77, 78] auf, die weiter einen Fortlauf der Immunreaktionskaskade auslöst. Bisher konnten noch keine detaillierteren Untersuchungen dazu an neutralen Lipidoberflächen durchgeführt werden, ohne weitere Einflüsse durch andere Komponenten ausschließen zu können. Ein solches Grundlagenverständnis zu erlangen ist allerdings ebenso für die medizinische Anwendung von Bedeutung.

2.3 Interaktion von Lipiden und Proteinen

Nach der Betrachtung von Lipiden und Proteinen geht es in diesem Unterkapitel darum, eine Interaktion von zwei oder mehreren Reaktionspartnern, z.B. von Lipid und Protein, mathematisch zu beschreiben.

2.3.1 Bindung zweier Reaktionspartner

Betrachtet man die Reaktion zweier Moleküle L und P , mit L als Symbol für eine Lipidmizelle und P für ein Protein, so gilt



Mit k_{on} und k_{off} bezeichnet man die Ratenkoeffizienten der Assoziation und Dissoziation des Komplexes. Die Dissoziationskonstante K_{D} ergibt sich aus dem Massenwirkungsgesetz mit

$$K_{\text{D}} = \frac{[L] \cdot [P]}{[LP]} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}, \quad (2.15)$$

wobei $[L]$, $[P]$ und $[LP]$ die jeweiligen molaren Gleichgewichtskonzentrationen sind. Die Assoziationskonstante K_{A} ist gegeben durch

$$K_{\text{A}} = \frac{1}{K_{\text{D}}} = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}}. \quad (2.16)$$

Der Anteil an gebundenem Protein an die Lipidmizelle ergibt sich durch

$$N_{\text{geb}} = \frac{[LP]}{[LP] + [L]}. \quad (2.17)$$

Erneut mit dem Massenwirkungsgesetz erhält man

$$N_{\text{geb}} = \frac{1}{1 + \frac{K_{\text{D}}}{[P]}}. \quad (2.18)$$

Aus dieser Gleichung ist ersichtlich, dass die Hälfte der Proteine an die Lipidoberfläche gebunden hat, wenn die freie Proteinkonzentration gleich der Dissoziationskonstanten mit $[P] = K_{\text{D}}$ ist.

2.3.2 Bindung mehrerer Reaktionspartner

Bei der Beschreibung von Bindungen mehrerer Bindungspartner (Proteine) an einen anderen Bindungspartner (Lipidmizelle) muss das vorausgehende Modell erweitert werden. Experimentelle Untersuchungen wurden unter anderem für den Fall der Proteinbindung an Nanopartikel bereits durchgeführt [79–81].

Betrachtet man im Speziellen die Interaktion von Lipidmizellen L mit n Proteinen (Bindungspartnern) P , so ergeben sich n Reaktionsgleichungen für den Protein-Lipidmizellen-Komplex LP der Form



...



Einher gehen damit n makroskopische Dissoziationskonstanten

$$K_{D,1} = \frac{[L] \cdot [P]}{[LP]}, \quad (2.22)$$

$$K_{D,2} = \frac{[LP] \cdot [P]}{[LP_2]}, \quad (2.23)$$

...

$$K_{D,n} = \frac{[LP_{n-1}] \cdot [P]}{[LP_n]}, \quad (2.24)$$

Mit Gleichung 2.22, 2.23, ... eingesetzt in Gleichung 2.24 ergibt sich

$$[LP_n] = \frac{[L] \cdot [P]^n}{K_{D,1} \cdot K_{D,2} \cdot \dots \cdot K_{D,n}}. \quad (2.25)$$

Nehmen die Dissoziationskonstanten $K_{D,i}$ ab, ist dies ein Zeichen für Kooperativität, d.h., die Bindung eines Proteins an die Lipidoberfläche fördert die Bindung eines zweiten Proteins.

Basis für dieses Bindungsmodell ist das Adair-Schema aus dem Jahre 1925. Adair verwendete dieses Schema zur Beschreibung der Bindung von Sauerstoff an Hämoglobin. Im gleichen Zusammenhang wurde der Begriff der Kooperativität geprägt [82, 83].

Hillkoeffizient

Um das Modell für mehrere Bindungsereignisse zu erweitern, wird von nur einer Gleichgewichtskonstanten ausgegangen und zusätzlich ein Parameter definiert, der Hillkoeffizient n . Möchte man die Bindung in Bezug zur Kooperativität beschreiben, geschieht dies durch den Hillkoeffizienten. Daraus ergibt sich die Hill-Gleichung,

$$N = \frac{N_{\max}}{1 + \left(\frac{K'_D}{[P]}\right)^n}, \quad (2.26)$$

wobei K'_D der apparente Dissoziationskoeffizient und N die Anzahl an gebundenen Proteinen in Abhängigkeit von deren Konzentration $[P]$ darstellt. Mit N_{\max} wird die maximale Beladungszahl der Lipidoberfläche mit Protein bezeichnet. Für $n > 1$ spricht man von einer kooperativen Reaktion, d.h., durch Bindung einzelner Proteine wird der Bindungsvorgang weiterer Proteine gefördert. Von Antikooperativität spricht man bei Hillkoeffizienten $n < 1$.

Volumenmodell

Zur quantitativen Betrachtung des Radiuszuwachses im Volumenmodell wird dieser in Abhängigkeit der Anzahl an gebundenem Protein dargestellt. Dazu wird der Radius der Lipidmizellen, d.h., $R_h(N)$ mit $N = 0$, sowie der Radius abhängig von der Anzahl an gebundenem Protein $R_h(N)$ mathematisch als Kugel betrachtet. Es gilt für diesen Radius

$$R_h = \sqrt[3]{\frac{3}{4\pi}(V_L + NV_P)}, \quad (2.27)$$

mit dem Volumen einer Lipidmizelle V_L , dem Volumen eines Proteins V_P , und mit N als Anzahl an gebundenen Proteinen auf der Lipidoberfläche.

Dieses Modell wurde von C. Röcker et al. [79] vorgestellt. Es folgt für den hydrodynamischen Radius $R_h(N)$ in Abhängigkeit der Anzahl gebundener Proteine N ,

$$R_h(N) = R_h(0) \sqrt[3]{1 + \left(\frac{V_P}{V_L}\right)N}. \quad (2.28)$$

Trägt man die Anzahl an gebundenem Protein N über den Logarithmus der Proteinkonzentration $[P]$ auf, kann die Hill-Gleichung (Gleichung 2.26) zur Kurvenanpassung verwendet werden. Dadurch ergibt sich die Bindungsaffinität mit dem apparenten Dissoziationskoeffizienten K'_D und dem Hillkoeffizienten n .

2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Im Folgenden werden zuerst Grundlagen zum Fluoreszenzphänomen dargestellt und die Methode der konfokalen Mikroskopie erläutert. Zudem wird als Methode auf die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie eingegangen und sowohl Messprinzip als auch die Datenanalyse diskutiert. Dieses Verfahren stellt in der vorliegenden Arbeit eine wichtige Methode für die Charakterisierung der Lipid-Protein Wechselwirkung dar.

2.4.1 Prinzipien der Fluoreszenz

Emittiert eine Substanz Licht aufgrund eines Zerfalls aus einem elektronisch angeregten Zustand, wird dies als Lumineszenz bezeichnet. Je nach Natur des angeregten Zustandes wird zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz unterschieden. Mit **Fluoreszenz** bezeichnet man strahlende Übergänge aus vibronischen Zuständen eines angeregten Singulettzustandes S_1 oder S_2 in vibronische Zustände des Grundniveaus S_0 . Übergänge sind dann besonders wahrscheinlich, wenn die vibronischen Wellenfunktionen maximal überlappen (siehe Franck-Condon-Prinzip). Bei der Fluoreszenz ist für die elektronischen Übergänge der Spin erhalten. Mit **Phosphoreszenz** bezeichnet man strahlende Übergänge aus vibronischen Zuständen eines Triplettzustandes T_1 in vibronische Zustände des Grundniveaus S_0 . Dabei kommt es zur Spinumkehr: Das elektronische System muss vom Grundniveau zuerst in den Singulettzustand S_1 angeregt werden und geht über Spinumkehr in den Triplettzustand T_1 über. Um in den Grundzustand S_0 zurückzukehren muss erneut eine Spinumkehr erfolgen. Quantenmechanisch ist ein solcher Umklappvorgang verboten und kann nur durch weitere quantenmechanische Wechselwirkungen erklärt werden [84].

Jablonski-Diagramm

Abbildung 2.9 fasst im Jablonski-Diagramm die möglichen Energiezustände eines Systems zusammen und zeigt an, welche Übergänge dabei möglich sind. Mit S_0 , S_1 und S_2 werden die Singulettzustände des Systems bezeichnet. In diesem Grundzustand sind die Elektronen gepaart und besitzen einen resultierenden Gesamtspin von 0 [84,85]. T_1 bezeichnet einen Triplettzustand mit zwei ungepaarten Elektronen und Gesamtspin 1. Jedes elektronische Energieniveau (S_0 , S_1 , S_2 , T_1) ist in vibronische Schwingungszustände unterteilt, die aufsteigend mit den Schwingungsquantenzahlen 0, 1, ... 5 benannt werden.

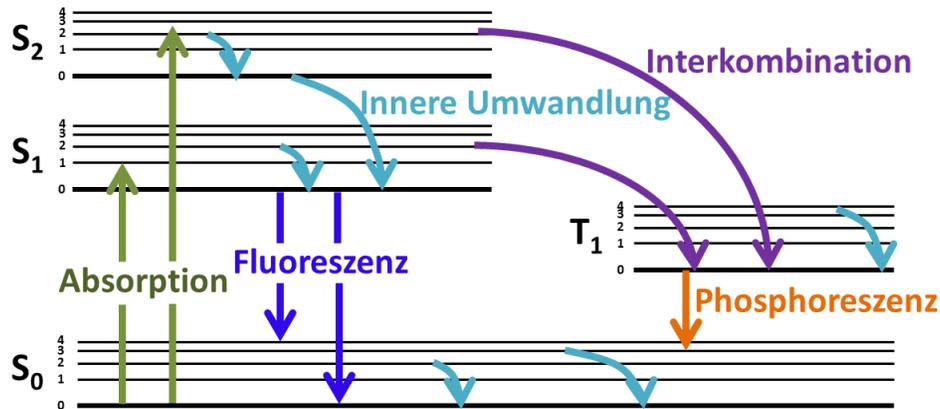


Abbildung 2.9: Darstellung der elektronischen Energieniveaus mit Grundzustand S_0 , sowie angeregten Singulettzuständen S_1 , S_2 , Triplettzustand T_1 und vibronischen Zuständen 0, 1, ... 5. Die möglichen Energieübergänge eines Systems werden zusammengefasst, bestehend aus Absorption (grün) und Relaxation durch Fluoreszenz (blau), Interkombination (lila), Phosphoreszenz (orange) und innerer Umwandlung (hellblau).

Bei Raumtemperatur befinden sich die meisten Moleküle im Grundzustand S_0 , der als Ausgangspunkt für die Absorption betrachtet wird: Wird ein Photon absorbiert (**Absorption**; Femtosekunden-Zeitskala), geht das System aufgrund des Franck-Condon-Prinzips in einen höheren elektronischen Anregungszustand über und dabei in einen höheren vibronischen Zustand als zuvor in S_0 eingenommen wurde. Durch **innere Umwandlung** (*internal conversion*) relaxiert das Molekül (Picosekunden-Zeitskala) entweder aus höheren elektronischen Anregungszuständen wie S_2 oder aus höheren vibronischen Zuständen in den Grundzustand von S_1 . Die Energieabgabe wird dabei durch Schwingungen oder Stöße mit den umgebenden Lösungsmittelmolekülen vollzogen. Moleküle, die zu höheren elektronischen Anregungszuständen angeregt worden sind, gelangen normalerweise durch innere Umwandlung in den vibronischen Grundzustand von S_1 . Dies wurde bereits 1950 von Michael Kasha untersucht [86]. Aus diesem vibronischen Grundzustand von S_1 kann das Molekül durch verschiedene Pfade zum Grundzustand des elektronischen Energieniveaus S_0 zurückrelaxieren, wie Fluoreszenz durch Aussenden eines Photons oder durch strahlungsfreie Pro-

zesse (*non-radiative*). Zudem kann ein Übergang in den Triplettzustand T_1 stattfinden. Dieser Vorgang wird als **Interkombination** (*intersystem crossing*; ISC) bezeichnet. Allgemein können nur Übergänge zwischen Singulettzuständen mit gleichem Spin erfolgen. Magnetische Wechselwirkungen können zu einer Spinumkehr führen, sodass ein Triplettzustand T_1 eingenommen wird. Um erneut in den Grundzustand S_0 zu gelangen, bedarf es wiederum einer Spinumkehr. Man spricht von **Phosphoreszenz**, wenn das Molekül durch Aussendung eines Photons zurück in den Grundzustand gelangt. Der Prozess ist quantenmechanisch verboten und erfolgt im Millisekundenbereich.

Ein wichtiges Phänomen für die Einzelmolekülspektroskopie stellt **Blinking** (*blink*, flimmern) im aufgezeichneten Emissionsspektrum dar. Durch ISC kann ein Molekül im elektronisch angeregten Singulettzustand in den Triplettzustand übergehen. Aufgrund des Spinverbots kann dieser Zustand mehrere 100 ms andauern, bis das Molekül in den Grundzustand relaxiert. D.h., in dieser Zeit wird kein Fluoreszenzsignal detektiert. Der Wechsel von fluoreszenten und nicht-fluoreszenten Zuständen wird als Blinken bezeichnet.

Franck-Condon-Prinzip

Mit dem Franck-Condon-Prinzip können erlaubte Übergänge vibronischer Schwingungszustände zwischen zwei verschiedenen elektronischen Zuständen berechnet werden. Abbildung 2.10 (a) stellt schematisch die Gesamtenergie über der Kernkoordinate zweier elektronischer Zustände eines Moleküls (elektronischer Grundzustand S_0 und angeregter Zustand S_1) dar. Beide Zustände zeigen die vibronischen Zustände mit den zugehörigen Wellenfunktionen auf, die mit arabischen Zahlen durchnummeriert sind. Als Beispiel für zwei vibronische Übergänge ist mit einem blauen Pfeil der Vorgang der Absorption und mit einem roten der Vorgang der Fluoreszenz markiert.

Grundlage für das Franck-Condon-Prinzip ist, dass Atomkerne eine wesentlich größere Masse aufweisen als Elektronen und sich aus diesem Grund deren Position während der Anregung nicht verändert, d.h. sie in ihrer Ruhelage verharren. Dadurch kann eine Trennung der Wellenfunktionen von Elektron- und Kernkomponente vollzogen werden mit der Annahme, dass Elektronen aufgrund der Massendifferenz der Kernbewegung instantan folgen. Dieser Sachverhalt wird als Born-Oppenheimer Näherung bezeichnet und kann mit einer Gesamtwellenfunktion,

$$\psi(\vec{r}, \vec{R}) = \varphi(\vec{r}, \vec{R}) \cdot \phi(\vec{r}, \vec{R}), \quad (2.29)$$

beschrieben werden. Dabei sind $\varphi(\vec{r}, \vec{R})$ und $\phi(\vec{r}, \vec{R})$ die Wellenfunktionen der Elektronen und der Kerne, mit den Elektron- und Kernpositionen \vec{r} und \vec{R} . Die Wahrscheinlichkeit einer vibronischen Anregung ist durch den Überlapp der Wellenfunktionen des elektronischen Grund- und Anregungszustandes gegeben und wird mit dem Franck-Condon-Faktor FCF ausgedrückt [87,88]. Die Intensität I eines Übergangs von einem elektronischen Grundzustand zu einem elektronischen Anregungszustand von einem vibronischen Zustand o zu einem anderen p ist proportional zu dem Frank-Condon-Faktor FCF , und es gilt

$$I \approx FCF = |S_{\text{op}}|^2. \quad (2.30)$$

Dabei quantifiziert S_{op} den Überlapp der Wellenfunktionen und kann mit dem vibronischen Anteil der Gesamtwellenfunktion $\varphi(\vec{r})$ in Abhängigkeit der Kernposition \vec{R} durch Gleichung

$$S_{\text{op}} = \int_{-\infty}^{\infty} \varphi_o^G(\vec{R}) \varphi_p^A(\vec{R}) dR, \quad (2.31)$$

definiert werden. Dabei bezeichnen G und A den elektronischen Grundzustand bzw. elektronisch angeregten Zustand. Da Übergänge zwischen den elektronischen Zuständen nur bei gleichbleibender Kern-Koordinate vollzogen werden können, d.h., senkrecht im Diagramm Abbildung 2.10, spricht man auch von vertikalen Übergängen. Bereits an der schematischen Darstellung in Abbildung 2.10 kann man erkennen, wie wahrscheinlich sich Übergänge z.B. in Hinblick auf Absorption gestalten: je größer der Überlapp der Wellenfunktionen, desto größer die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs. Ein Absorptionsspektrum wird schematisch in Abbildung 2.11 aufgezeigt. Umgekehrt gilt dies ebenso für das spiegelbildliche Emissionsspektrum.

Stokes-Verschiebung

Die Stokes-Verschiebung ist definiert als Verschiebung zwischen dem Maximum des Anregungs- und Emissionsspektrums. Abbildung 2.11 zeigt schematisch die Verschiebung, korrespondierend zum in Abbildung 2.10 dargestellte Franck-Condon-Prinzip. Ursache für die Rotverschiebung des Emissions- im Vergleich zum Absorptionsspektrum können zwei Sachverhalte darstellen: Zum einen ist die Energiedifferenz bei der Absorption meist größer als bei der Emission. Grund hierfür liefert das Franck-Condon-Prinzip und die Schwingungsrelaxation. Zum anderen kann das umgebende Lösungsmittel energetisch weniger günstig um das angeregte Molekül angeordnet sein als um

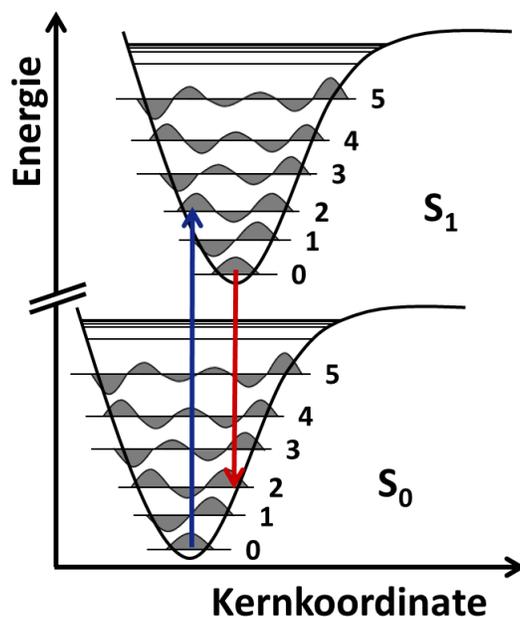


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung zum Franck-Condon-Prinzip der Gesamtenergie über der Kernkoordinate. Die Vibrationszustände können durch Wellenfunktionen beschrieben werden, mit den Schwingungsquantenzahlen 0, 1, ... 5. S_0 beschreibt den elektronischen Grundzustand, S_1 den ersten angeregten elektronischen Zustand.

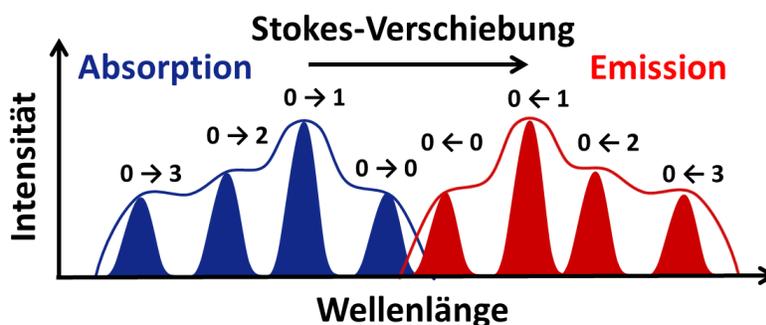


Abbildung 2.11: Stokes-Verschiebung. Darstellung der entsprechenden Absorptions- und Emissionsspektren sowie deren Übergänge analog zu Abbildung 2.10 mit Beachtung der Stokes-Verschiebung.

das Molekül im Grundzustand. Befindet sich das Molekül noch im Zustand S_1 , richten sich die Lösungsmittelmoleküle aufgrund des größeren Dipolmoments des Moleküls im angeregten Zustand aus. Dies führt zu einer Energieabsenkung des angeregten Zustandes. Relaxiert das Molekül in den Grundzustand, ist dieser energetisch noch höher als zuvor, da die umgebenden Lösungsmittelmoleküle im Zustand S_1 sind. Erst durch deren Umorientierung relaxiert das Molekül wieder in den Ausgangszustand S_0 . Durch diese Veränderungen in den Energieniveaus erfolgt eine kleinere Energiedifferenz verglichen mit der Absorption und eine Verschiebung des Emissions- zum Absorptionsmaximum von 20 – 50 nm [84].

Fluoreszenzlebensdauer

Die Entvölkerung des angeregten Zustands $n(t)$ kann mit einer Rategleichung der Form

$$-\frac{dn(t)}{dt} = (k_F + \sum k_{NF}) \cdot n(t) = \frac{1}{\tau_F} \cdot n(t) \quad (2.32)$$

beschrieben werden, mit der Anzahl der Moleküle im angeregten Zustand n , dem Ratenkoeffizienten k_F für fluoreszierende und k_{NF} für nicht fluoreszierende Übergänge. Mit τ_F wird die gemessene Fluoreszenzlebensdauer bezeichnet, d.h., die Übergangszeit vom angeregten Zustand in den Grundzustand. Die Lösung für diese Differenzialgleichung ist gegeben durch

$$n(t) = n(0) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_F}\right). \quad (2.33)$$

Anhand von Gleichung 2.33 sieht man die Analogie zur Kernphysik, bei welcher ein radioaktiver Zerfall ebenfalls mit einer exponentiell abfallenden Funktion beschrieben werden kann. Die Fluoreszenzlebensdauer liegt typischerweise im Nanosekundenbereich.

Quantenausbeute

Ein weiteres wichtiges Kriterium ist neben der Fluoreszenzlebensdauer die Quantenausbeute. Diese ist definiert als Teil der absorbierten Photonen, die als fluoreszierende Photonen emittiert werden, und kann ausgedrückt werden durch

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{NF}}, \quad (2.34)$$

mit den Ratenkoeffizienten des fluoreszenten Abfalls k_F und der dazu konkurrierenden nicht-fluoreszierenden Abfälle k_{NF} .

Fluoreszenzlöschung

Mit Fluoreszenzlöschung (*quenching*, Löschen) werden Vorgänge bezeichnet, die zu einer verringerten Fluoreszenzintensität führen. Bei einem solchen Prozess sind zwei Komponenten involviert: eine für die Fluoreszenzlöschung verantwortliche Substanz (*quencher*, Löscher) und ein Fluorophor. Fluoreszenzlöschung tritt dabei im angeregten Zustand durch Kollision mit anderen Molekülen (dynamische Fluoreszenzlöschung), sowie im Grundniveau durch Komplexbildung (statische Fluoreszenzlöschung) auf.

2.4.2 Fluoreszenz-Markierung

Fluoreszente Materialien können in drei Klassen unterteilt werden:

- Organische Farbstoffe
- Fluoreszente Proteine
- Fluoreszente Nanokristalle (z.B. halbleitende Quantenpunkte)

Wichtig für die Güte eines fluoreszenten Materials ist eine starke Absorptionsefähigkeit, eine hohe Quantenausbeute, eine hohe Photostabilität und je nach Anwendung eine möglichst große Stokes-Verschiebung. Im Folgenden werden fluoreszente Materialien genauer betrachtet.

Organische Farbstoffe

Bereits 1871 entwickelte Adolf von Baeyer das fluoreszente Farbstoffmolekül Fluorescein, auf dem aufbauend ein weites Spektrum an Farbstoffen von ultraviolett bis infrarot weiterentwickelt wurde.

Die Farbstoffe können durch unterschiedliche Bindungen an die zu untersuchende Probe gebunden werden. Charakteristisch für organische Farbstoffe sind ein scharfes Absorptions-, ein asymmetrisches Emissionsspektrum mit einer Schulter zu längeren Wellenlängen und eine Stokes-Verschiebung kleiner als 50 nm [89]. Betrachtet man die Fluoreszenzlebensdauer, liegt diese im Bereich von 1 – 10 ns und weist einen einfach exponentiellen Abfall auf. Ein Beispiel ist Rhodamin 6G (Abbildung 2.12 (a)). Rhodamine weisen eine hohe Quantenausbeute auf und eine Fluoreszenzlebenszeit von wenigen Nanosekunden [90].

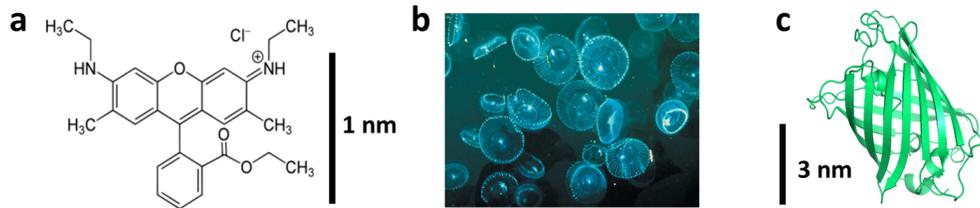


Abbildung 2.12: Fluoreszenzmarker. (a) Rhodamin 6G repräsentiert ein Beispiel für einen organischen Farbstoff. Dieser weist eine geringe Größe von nur ≈ 1 nm auf. (b) Bei der Qualle *Aequorea*, die zur Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) führte, erkennt man deutlich die leuchtenden Organe [91]. (c) Ein Größenvergleich zeigt, dass GFP weit größer ist als der organische Farbstoff Rhodamin 6G.

Fluoreszente Proteine

Fluoreszente Proteine sind mittlerweile ebenso weit verbreitet wie organische Farbstoffe und in einer großen Farbvielfalt erhältlich [92,93]. Das Markieren des zu untersuchenden Proteins mit diesen fluoreszierenden Markerproteinen wird durch die Fusion der DNA Sequenzen beider Proteine durchgeführt. Das entstandene fusionierte Protein kann in der Zelle oder dem Organismus, den man untersuchen möchte, nachverfolgt und das markierte Protein auf seinen Verbleib in der Zelle analysiert werden. Osamu Shimomura extrahierte und charakterisierte bereits 1962 das grün fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*; GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* (vgl. Abbildung 2.12 (b) und (c)) [94]. Im Jahre 2008 wurden Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Tsien mit dem Nobelpreis für Chemie aufgrund der Entdeckung und der Weiterentwicklung des GFP ausgezeichnet.

Fluoreszente Nanokristalle

Die dritte Klasse der fluoreszenten Materialien beinhaltet halbleitende Quantenpunkte, Nanodiamanten und Metall-Nanocluster. Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit sind Quantenpunkte (*quantum dot*; QD), die in diesem Abschnitt als Beispiel herausgegriffen werden.

Bereits 1980 wurden **Quantenpunkte** von Alexei Ekimov [95] in einer Glasmatrix und Louis E. Brus [96,97] im Kolloidsystem entdeckt. Mit dem zusammengesetzten Namen aus *Quanten* und *Punkt* soll zum einen auf die quantenmechanische Natur und zum anderen auf die Struktur, die Quantisierungs-

effekte in alle drei Raumrichtungen beinhaltet, hingewiesen werden [98]. Quantenpunkte werden künstlich aus Halbleitermaterialien synthetisiert und weisen eine klare Kristallstruktur auf. Da sie nicht wasserlöslich sind, gibt es eine Reihe von Oberflächenmodifikationen, um Quantenpunkte wasserlöslich zu machen. Durchgeführt werden kann dies durch Ligandenaustausch oder hydrophobe Wechselwirkung wie z.B durch Anbringen amphiphiler Lipide [99]. Aufgrund ihrer sehr guten Bleichstabilität und starken Helligkeit bei geringer Anregungsleistung, finden Quantenpunkte immer mehr Anwendungsbereiche: Beispiele umfassen Quantenpunkte zur Analyse von kleinen Analyten bei Immunoassays wie ELISA [100], aber ebenso zur elektrischen Anregung in komplexen Mikro- und Nanoresonatoren [101], sowie in Biomedizin und den Lebenswissenschaften [102,103]. Allerdings wirken diese z.T. zytotoxisch und können nicht alle für die Markierung lebender Zellen verwendet werden. Dennoch nehmen sie gerade in diesem Forschungsbereich immer mehr den Rang herkömmlicher organischer Fluorophore ein, da eine geringe Konzentration zur Markierung nötig ist.

Elektronische Eigenschaften: Durch die Wahl der Halbleitermaterialien wird ein charakteristischer Sprung von Valenz- zu Leitungsband an der Materialgrenzfläche generiert. Abbildung 2.13 stellt die Anordnungsmöglichkeiten von Valenz- und Leitungsband an der Grenzfläche zweier unterschiedlicher Materialien A und B mit zugehörigen Bandlücken ΔE_A und ΔE_B dar.

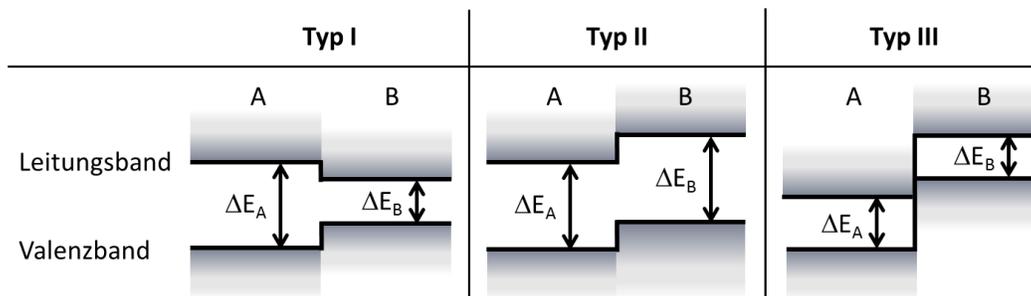


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung der verschiedenen Anordnungsmöglichkeiten von Valenz- und Leitungsbandkante durch die Aneinanderreihung zweier Materialien A und B. Die zugehörigen Bandlücken ΔE_A und ΔE_B sind ebenso eingetragen.

Je nach **Materialkombination** unterscheidet man drei Typen [104]:

1. Typ I beschreibt die Struktur zweier Halbleitermaterialien mit unterschiedlicher Bandlücke, wobei ein Halbleiter mit energetisch kleinerer Bandlücke in einen Halbleiter mit einer energetisch größerer Bandlücke eingebettet ist.
2. Typ II beschreibt die Struktur zweier Halbleitermaterialien, bei denen die Bandlücke des einen Materials zum Energiebereich des anderen versetzt, aber noch eine durchgehende Bandstruktur gegeben ist.
3. Typ III beschreibt die Struktur zweier Halbleitermaterialien, die keine durchgehende Bandlücke mehr aufweisen, da die Bandlücken energetisch voneinander getrennt sind.

Für diese Arbeit ist eine Materialkombination des Typ I von Bedeutung, bestehend aus Hülle und Kern mit je zwei II-VI Halbleitermaterialien aus Cadmiumselenid (CdSe; Kern) eingebettet in Zinksulfid (ZnS; Hülle). Bei einem II-VI Halbleiter handelt es sich um eine Verbindung zweier Materialien, zum einen aus der 2. Hauptgruppe (Erdalkalimetalle) bzw. der 12. Gruppe (Zinkgruppe) und zum anderen aus der 6. Hauptgruppe (Chalkogene). Abbildung 2.14 (a) veranschaulicht schematisch einen solchen Quantenpunkt, sowie die Anordnung der Bandlücke (b) und die Abhängigkeit der Größe von der Emissionswellenlänge (c) (siehe Optische Eigenschaften). Die scharfen Kanten im Valenz- und Leitungsband wirken für die Ladungsträger als Potentialbarriere, sodass diese in diesem Topf eingeschlossen und in ihrer Bewegung parallel zur Barriere eingeschränkt werden. Diese Bewegungseinschränkung wird als '**Quantum Confinement**' (*confinement*, Einschränkung) bezeichnet und führt bei Quantenpunkten zur maximalen Einschränkung, d.h., sie führt zur Nulldimensionalität mit δ -förmiger Zustandsdichte. Betrachtet man die Ladungsträger i und j , wechselwirken diese miteinander über die Coulomb-Wechselwirkung $\vec{W}_{i,j}$, die mit folgender Gleichung beschrieben werden kann,

$$\vec{W}_{i,j} = \frac{1}{4\pi\epsilon_r\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{|\vec{r}_i - \vec{r}_j|}, \quad (2.35)$$

mit der materialspezifischen Dielektrizitätskonstanten ϵ_r , der elektrischen Feldkonstanten ϵ_0 und den Ortsvektoren der Ladungsmittelpunkte \vec{r}_i und \vec{r}_j . Liegt die senkrechte Ausdehnung des Quantenpunktkerns in Bezug auf die Barriere im Bereich der effektiven de-Broglie Wellenlänge der Elektronen

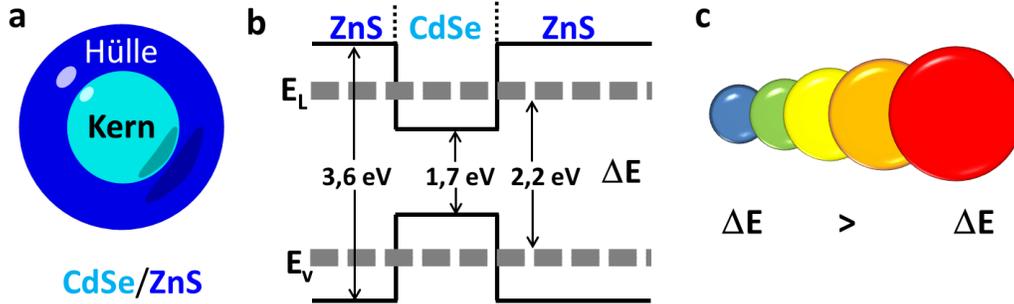


Abbildung 2.14: Aufbau eines Quantenpunktes. (a) Ein Quantenpunkt besteht aus einem Kern (z.B. CdSe) mit einer Hülle (z.B. ZnS) und weiterer Beschichtung/Liganden (z.B. Oleylamin). (b) Durch die unterschiedlichen Halbleitermaterialien ergibt sich eine Bandlücke zwischen Kern und Hülle. (c) Je größer der Quantenpunkt, desto größer ist die Emissionswellenlänge und desto kleiner ist die Bandlücke.

bzw. Löcher, kommt es zu Quantisierungseffekten. Die de-Broglie Wellenlänge λ ist definiert durch

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_E E}}, \quad (2.36)$$

mit dem Planckschen Wirkungsquantum h , der Elektronenmasse m_E und Energie E . Bei Raumtemperatur gilt

$$E = k_B T, \quad (2.37)$$

mit der Boltzmann-Konstanten k_B und der Temperatur T , und es ergibt sich für die de-Broglie Wellenlänge ein typischer Wert von $\lambda \approx 8$ nm. D.h., bei einer Kernausdehnung L des Quantenpunktes kleiner als 8 nm entstehen Quantisierungseffekte. Je nach Ausdehnung des Kernes L wird zwischen starker, intermediärer und schwacher Einschränkung unterschieden [105]. Quantifiziert wird diese Einteilung durch den Vergleich der Bindungsenergie der Ladungsträger im Vergleich mit deren Coulombaustauschenergie. Vereinfacht lassen sich die **Energieniveaus der Bandstrukturen** für Elektronen E_E und Löcher E_L durch

$$E_{E/L} = \frac{\hbar^2 \pi^2}{2m_{E/L}^*} \left(\frac{n_x^2}{L_x^2} + \frac{n_y^2}{L_y^2} + \frac{n_z^2}{L_z^2} \right) \quad (2.38)$$

abschätzen, mit der effektiven Masse der Elektronen bzw. Löcher $m_{E/L}^*$, sowie der Ausdehnung des Quantenpunktes in x-, y-, z-Richtung $L_{x, y, z}$, mit den zugehörigen Quantenzahlen $n_{x, y, z}$ [106]. Mit größer werdender Ausdehnung des Quantenpunktes, sinkt damit das Energieniveau, d.h., die Bandlücke wird kleiner. Dieser Sachverhalt ist im Folgenden für die Betrachtung der Emissionswellenlänge von Bedeutung (s.u.).

Optische Eigenschaften: Das **Absorptionsspektrum** nimmt in Richtung ultraviolettem Spektralbereich stetig zu. Die Wahrscheinlichkeit der Photonenabsorption steigt mit abnehmender Wellenlänge (= höhere Energien). Bei der Absorption handelt es sich meist um einen Übergang vom Valenz- zum Leitungsband, d.h., Elektronen werden in das Leitungsband gehoben und dadurch Löcher im Valenzband generiert. Um eine solche Anhebung zu generieren, muss eine Energie E höher als die Bandlückenenergie ΔE zugeführt werden mit

$$\Delta E < E = \hbar\nu. \quad (2.39)$$

Dabei ist $\hbar = \frac{h}{2\pi}$, $\nu = \frac{c}{\lambda}$ die Frequenz der Anregungsquelle, c die Lichtgeschwindigkeit und λ die Wellenlänge. Unterhalb dieser Energie kann keine Absorption stattfinden, bis diese Absorptionskante erreicht ist.

Phononenwechselwirkung, d.h., Gitterschwingungen und Elektron-Elektron-Wechselwirkungen führen dazu, dass Elektronen und Löcher auf die niedrigsten Zustände innerhalb des jeweiligen Bandes gelangen. Durch anziehende elektrostatische Wechselwirkung von Elektron und Loch wird ein Elektron-Loch-Paar, ein Exziton, erzeugt. Übergänge aus dem Leitungsband in das Valenzband führen daraufhin zur Emission von Photonen. Diesen Vorgang nennt man auch Rekombination, und die Emission des Lichtes wird als Photolumineszenz bezeichnet. Dabei ist die Energie der Strahlung gegeben durch die Energie der Bandlücke abzüglich der Bindungsenergie der Exzitonen. Betrachtet man nochmals die Beziehung der Energie eines abgestrahlten Photons E_P zu seiner Wellenlänge,

$$E_P = \frac{c}{\lambda_P}, \quad (2.40)$$

erkennt man deutlich, dass, je größer die frei werdende Energie durch die Rekombination, desto kleiner die emittierte Wellenlänge des Photons ist. Dieser Sachverhalt ist zusammenfassend in Abbildung 2.14 (c) dargestellt. Im Gegensatz zu dem asymmetrischen Emissionsspektrum bei organischen Farbstoffen weisen Quantenpunkte ein gaußförmig, symmetrisches **Emissions-**

spektrum, mit einer Halbwertsbreite von 30–90 nm auf [89]. Ursache für die charakteristische Emissionslinienbreite ist die Kopplung zwischen Ladungsträgern und Phononen, sodass die homogene Linienbreite nur durch die quantenmechanische Energie-Zeitunschärfe bestimmt ist [104]. Für die Linienbreite Γ , abhängig von der Lebensdauer strahlender Prozesse τ , gilt

$$\Gamma \approx \frac{\hbar}{\tau}. \quad (2.41)$$

Ein einzelner Quantenpunkt liefert ein Lorentz-förmiges Emissionsprofil. Betrachtet man mehrere Quantenpunkte, so liefern diese jeweils ein Lorentz-förmiges Spektrum. Durch inhomogene Größen- bzw. Volumenverteilung der Quantenpunkte im Ensemble, sowie in geringerem Maße durch Variation in der Materialkomposition und Kopplung, wird das Ensemble der Lorentz-Kurven mit einer Gaußverteilung als Einhüllende mit einem Mittelwertvolumen und einer Standardabweichung angenommen. Durch das Emissionsspektrum können damit Rückschlüsse auf die Homogenität des Quantenpunktensembles gezogen werden.

Wie bereits bei der Betrachtung der Bandstruktur dargestellt, liefern größere Quantenpunkte eine kleinere Bandlückenenergie. Mit der vorhergehenden Betrachtung der Emissionswellenlänge bei der Rekombination ergibt sich zusammenfassend: Je kleiner die **Ausdehnung** des Quantenpunktes, desto größer die Bandlückenenergie, desto kleiner die Emissionswellenlänge. Die Emissionswellenlänge ist folglich nicht nur von der Wahl des Halbleitermaterials, sondern ebenso von der Ausdehnung der Hülle und des Kerns abhängig und kann so angepasst werden, dass Emissionswellenlängen vom sichtbaren bis zum nahen infraroten Spektralbereich entstehen.

Ebenso abhängig von der räumlichen Ausdehnung der Quantenpunkte ist ihre **Fluoreszenzlebensdauer**, die mit der Größe zunimmt. Diese kann durch einen multiexponentiellen Abfall bestimmt werden und liegt im Bereich von 10 – 100 ns. Betrachtet man die Relaxation vom angeregten Zustand in den Grundzustand, kann es bei Quantenpunkten zu **Blinking** kommen. Je größer die Anregungsleistung, desto häufiger tritt dieser Effekt auf [107–109].

2.4.3 Konfokale Mikroskopie

Die Konfokalmikroskopie (*confocal*, den gleichen Fokus habend) ist ein optisches Bildgebungsverfahren, das je nach Methode entweder reflektiertes oder emittiertes Fluoreszenzlicht einer Messprobe erfasst. Im Vergleich zum normalen Lichtmikroskop wird der Auflösungskontrast vergrößert: Die Probe wird nicht komplett belichtet, sondern es wird punktwise fokussiert - bei konfokaler Fluoreszenzmikroskopie zur Fluoreszenz angeregt - und das Bild abgerastert. Eine Lochblende (*pinhole*), die zwischen Objektiv und Bildebene eingebracht wird, verhindert, dass Streulicht aus nicht fokussierten Ebenen der Probe dem Objektbild überlagert wird.

Abbildung 2.15 zeigt schematisch die Verwendung einer Lochblende, um Streulicht und Beugungsmaxima außerhalb der Fokusebene abzuschneiden.

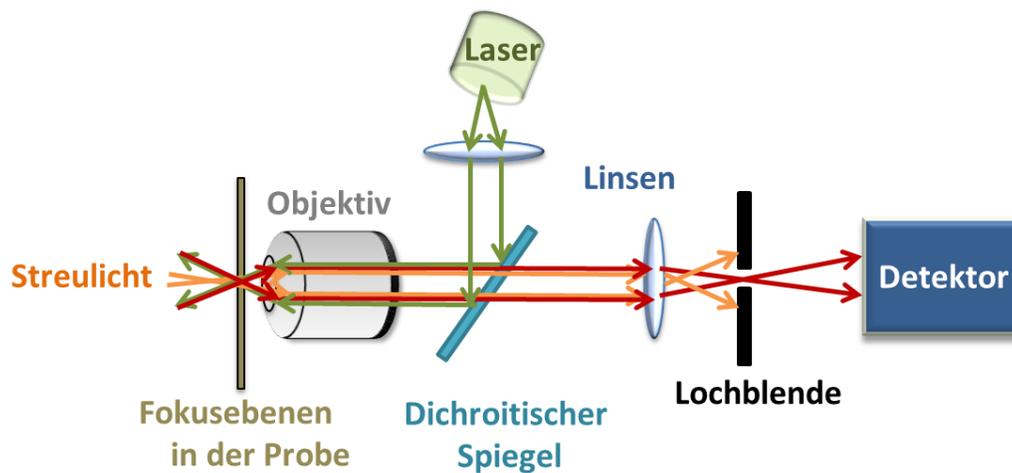


Abbildung 2.15: Schematische Darstellung zum Prinzip der konfokalen Mikroskopie. Das besondere Detail ist eine Lochblende (schwarz). Das Laserlicht (grün) trifft auf einen dichroitischen Spiegel, wird durch ein Objektiv gelenkt und auf die Probe fokussiert (braun), die Licht emittiert. Das Emissionslicht stammt von der fokussierten Probenebene (rot) und das Streulicht aus ungewollt nicht fokussierten Probenebenen (orange). Durch den dichroitischen Spiegel gelangt das Emissionslicht über eine Linse zur Lochblende (schwarz). Das Streulicht wird durch diese blockiert, da es diese nicht im Brennpunkt passieren kann, im Gegensatz zum Signal der Messprobe.

Das Laserlicht (grün) trifft auf einen dichroitischen Spiegel (türkis), passiert ein Objektiv (grau) und gelangt durch dieses fokussiert auf die Probe (braun). Damit die gesamte Probe vermessen werden kann, muss eine Abrastvorrichtung angebracht werden. Das von dem fokussierten Teil der Probe emittierte Licht (rot) ist mit Streulicht (orange) überlagert und wird gemeinsam in Richtung des dichroitischen Spiegels gelenkt. Neben dem Emissionslicht der fokussierten Probenstelle wird ebenso das Streulicht aus nicht-fokussierten Probenebenen transmittiert und gelangt über eine Linse zur Lochblende (schwarz). An dieser Stelle wird das Streulicht herausgefiltert, da es die Lochblende nicht im Brennpunkt trifft und deshalb blockiert wird. Nur der Lichtstrahl von der Fokusebene der Probe kommend kann zum Detektor gelangen. Durch diese Methode ist es möglich, z-Schnitte aufzuzeichnen und anhand einer Computersoftware dreidimensionale Bilder zu generieren.

Punktspreizfunktion

Licht als elektromagnetische Welle erfüllt die Wellengleichung der Form

$$\nabla^2\psi + k^2\psi = 0. \quad (2.42)$$

Die zeitliche und räumliche Propagation des elektrischen Feldes $E(\vec{r}, t)$ ist bestimmt durch

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}_0 e^{-i(\vec{k}\vec{r} - \omega t)}, \quad (2.43)$$

mit der Amplitude \vec{E}_0 , dem Wellenvektor senkrecht zur Ausbreitungsrichtung \vec{k} , und der Frequenz der elektromagnetischen Welle ω .

Betrachtet man die Beleuchtungsstelle durch die Punktquelle auf der Probe, ergibt sich für das elektrische Feld $\vec{E}(\vec{r})$ an dieser Stelle,

$$\vec{E}(\vec{r}) = \vec{E}_0 \cdot \frac{2J_1(\vec{k}_0\vec{r}n\sin(\alpha))}{\vec{k}_0\vec{r}n\sin(\alpha)} = \vec{E}_0 \cdot a(\vec{r}), \quad (2.44)$$

mit der Bessel-Funktion erster Ordnung J_1 , dem Wellenvektor k_0 der einlaufenden ebenen Welle, dem Öffnungswinkel α , und dem Brechungsindex n . Diese Funktion wird Punktspreizfunktion (*point spread function*; PSF) genannt. Die Beugung an der konfokalen Lochblende beeinflusst die Bildgebung in Hin- und Rückrichtung: Zuerst durch Fokussieren durch das Objektiv auf die Probe, und im zweiten Schritt durch Übertragen des erhaltenen Fluoreszenzsignals zurück durch die Lochblende und das Objektiv. Dadurch besitzt das Laserlicht keine punktförmige Ausdehnung, sondern eine drei-

dimensionale Intensitätsverteilung [110, 111]. Die Eigenschaften der PSF zur Anregung als auch zur Detektion sind identisch. Anregungs- und Emissionssignal werden durch einen Strahlteiler getrennt und unterscheiden sich in der Zeit und Skalierung. Deutlich wird dies bei der in Abschnitt 2.4.1 erläuterten Stokes-Verschiebung, die die unterschiedliche Wellenlänge des Anregungs- und Emissionslichtes erklärt. Da sowohl Probe als auch Detektor in derselben Fokusebene liegen, kann die Amplitude des elektrischen Feldes $\vec{E}(\vec{r})_{\text{Detektion}}$ durch das Produkt aus Anregungs- und Detektions-PSF berechnet werden mit

$$\vec{E}(\vec{r})_{\text{Detektion}} = \vec{E}_0 \cdot a_{\text{Anregung}}(\vec{r}) \cdot a_{\text{Detektion}}(\vec{r}' - \vec{r}). \quad (2.45)$$

Bisher unberücksichtigt bei den Betrachtungen ist der Einfluss der Lochblende, die sich an der Position $\vec{r}' = 0$ befindet. Dadurch wird Streulicht, d.h., nicht aus der Fokusebene kommendes Licht, entfernt, wodurch die vom Detektor aufgezeichnete Amplitude des elektrischen Feldes $\vec{E}(\vec{r})_{\text{Detektion}}$ vereinfacht wird und sich als Produkt aus Anregungs- und Detektions-PSF ergibt. Es gilt

$$\vec{E}(\vec{r})_{\text{Detektion}} = \vec{E}_0 \cdot a_{\text{Anregung}}(\vec{r}) \cdot a_{\text{Detektion}}(\vec{r}) = \vec{E}_0 \cdot a^2(\vec{r}). \quad (2.46)$$

Die Intensität am Detektor $I_{\text{Detektion}}$ ist gegeben durch

$$I_{\text{Detektion}}(\vec{r}) = I_0 \cdot a^4(\vec{r}). \quad (2.47)$$

2.4.4 Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie, bei der die untersuchte Probe mit Licht durchstrahlt und das abgebildete Bild analysiert wird, wird bei der Fluoreszenzmikroskopie die Probe mit einem fluoreszenten Farbstoff markiert. Dieser wird mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt und emittiert bei einer anderen Wellenlänge Fluoreszenzlicht. Eine Möglichkeit, die Dynamik fluoreszierender Biomoleküle zu untersuchen, bietet die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (*fluorescence correlation spectroscopy*; FCS). Dabei wird ein kleines Ensemble von fluoreszierenden Molekülen, die sich in Lösung im thermischen Gleichgewicht befinden, hinsichtlich der Intensitätsfluktuationen in einem ≈ 1 fl großen Anregungsvolumen untersucht. Die aufgezeichneten Fluktuationen beinhalten die Information über die Konzentration und die Diffusionszeit der Moleküle und damit deren charakteristischen Diffusionskoeffizienten. Die Methode wurde in den 70er Jahren von D. Magde, E. Elson

und W. Webb eingeführt und stetig weiterentwickelt [112–114]. Im Folgenden werden Messprinzip, Aufbau und Auswertung, sowie die Erweiterung zur Zwei-Fokus-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (2fFCS) diskutiert.

Messprinzip und Aufbau

In Abbildung 2.16 (a) wird das Messprinzip kurz erläutert. Fluoreszierende Moleküle (dunkelrot) werden in einem ≈ 1 fl großen Anregungsvolumen (blaues Ellipsoid) zur Fluoreszenz angeregt (hellrot). Die Moleküle erzeugen durch die Bewegungen in und aus dem Anregungsvolumen heraus ein fluktuierendes Fluoreszenzemissionssignal $F(t)$, das aufgezeichnet wird. Entscheidend für das untere Limit der benötigten Konzentration der Messprobe, d.h., die geringste mögliche verwendbare Konzentration um ein ausreichendes Messsignal zu erhalten, ist deren molekulare Helligkeit. Der verwendete Konzentrationsbereich liegt für Quantenpunkte unter 10 nM. Die Fluoreszenzfluktuationen werden im zeitlichen Verlauf als Mittelwert über die von jedem einzelnen Molekül erzeugten Fluoreszenzsignale detektiert (Abbildung 2.16 (b)). Intensitätsfluktuationen der Fluoreszenzemission über den gemessenen Zeitraum werden weiter mittels einer Autokorrelationsfunktion analysiert. Dadurch können Diffusionszeiten, hydrodynamische Radien, Probenkonzentrationen, aber zudem Konformationsänderungen von Proteinen und Reaktionsraten von Bindungsereignissen visualisiert werden [115, 116].

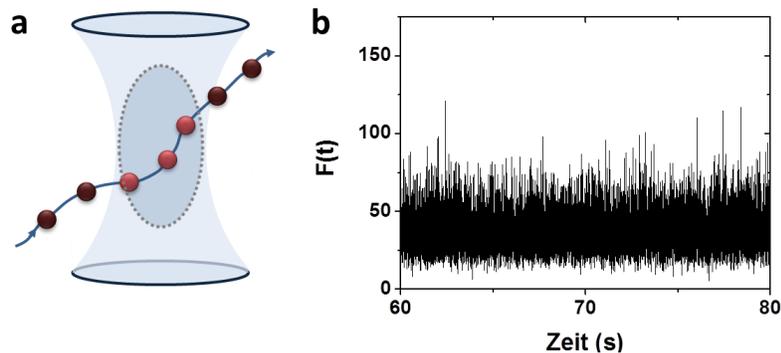


Abbildung 2.16: Prinzip der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie. (a) Aufgrund von Brownscher Bewegung diffundieren fluoreszente Moleküle (rot) durch das konfokale Volumen (blaues Ellipsoid). (b) Die Bewegung durch das konfokale Volumen verursacht Intensitätsfluktuationen im Fluoreszenzsignal.

Durch die Anwendung der Methode der Konfokalmikroskopie wird bei der FCS ein kleines Detektionsvolumen im Femtoliter-Bereich generiert [117]. Um die Größe des Detektionsvolumens (= konfokales Volumen) bestimmen zu können, wird eine Referenzprobe benötigt, deren Diffusionskoeffizient bekannt ist. Dadurch können die Dimensionen des konfokalen Volumens berechnet und ebenso die Messprobe skaliert werden. Eine Erweiterung der FCS Methode stellt die 2fFCS Technik dar. Das Messprinzip ist dasselbe. Der Vorteil liegt darin, dass nicht nur ein Fokus und dadurch konfokales Volumen, sondern zwei räumlich getrennte Foki generiert und die Fluoreszenzfluktuationen in beiden gemessen werden. Aus diesem Grund wird keine Referenzprobe benötigt: Der Abstand der beiden Foki (Inter-Foki Abstand) ist genau bekannt und ermöglicht dadurch eine exakte Längenskalierung der Messprobe.

Autokorrelationsfunktion

Eine Autokorrelationsfunktion beschreibt die Ähnlichkeit eines Signals zum Zeitpunkt t mit demselben Signal zu einer Zeit $(t + \tau)$. Durch Avalanche Photodioden (APD) wird zeitabhängig die Intensität des Fluoreszenzsignals, d.h., Photon für Photon, aufgenommen, die eine Information über die Diffusionszeit der fluoreszierenden Probe enthält. Die folgende Betrachtung der Auswertung von Fluoreszenzfluktuationen folgt im weitesten dem Lehrbuchtext von Schwille et al. [118].

Fluoreszenzfluktuationen $\delta F(t)$ sind dabei definiert als zeitlich gemittelte Abweichungen von der Fluoreszenzintensität $F(t)$,

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle_t. \quad (2.48)$$

Die Autokorrelationsfunktion $g(\tau)$ mit der Verzögerung τ ist gegeben durch

$$g(\tau) = \langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle_t \quad (2.49)$$

$$= \langle F(t) F(t + \tau) \rangle - \langle F(t) \rangle^2. \quad (2.50)$$

Durch Normierung mit dem Quadrat des durchschnittlichen Fluoreszenzsignals $\langle F(t) \rangle^2$ gilt

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t) F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} - 1. \quad (2.51)$$

Mit zunehmender Verzögerungszeit τ ähnelt das Fluoreszenzsignal sich selbst immer weniger, gleichbedeutend, dass die Autokorrelationsfunktion immer

kleinere Werte annimmt im Bezug auf ihren Mittelwert. Die Beziehung zwischen der Amplitude der Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ und der mittleren Teilchenanzahl $\langle N \rangle$ wird durch eine Poissonverteilung charakterisiert,

$$P(N) = \frac{\langle N \rangle \cdot e^{-\langle N \rangle}}{N!}, \quad (2.52)$$

und gibt die Wahrscheinlichkeit an, N Teilchen im effektiven konfokalen Volumen V_{eff} (siehe Gleichung 2.68) anzutreffen. Der Mittelwert der Poissonverteilung ist gleich ihrer Varianz. Dies kann ausgedrückt werden durch

$$\langle N \rangle = (\delta N)^2. \quad (2.53)$$

Dabei gilt

$$\frac{\sqrt{\langle (\delta N)^2 \rangle}}{\langle N \rangle} = \frac{\sqrt{\langle (N - \langle N \rangle)^2 \rangle}}{\langle N \rangle} = \frac{1}{\sqrt{\langle N \rangle_t}}. \quad (2.54)$$

Des Weiteren ist die Autokorrelationsfunktion für $\tau = 0$ gegeben durch

$$G(0) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+0) \rangle_t}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{1}{\sqrt{\langle N \rangle_t}}. \quad (2.55)$$

Abbildung 2.17 zeigt den theoretischen Verlauf einer FCS-Autokorrelationsfunktion $G(t)$. Je länger die Diffusionszeit eines Partikels, d.h., je länger seine Aufenthaltszeit im konfokalen Volumen, desto langsamer fällt die Funktion ab (orange zu rot: zunehmende Diffusionszeit). Die Amplitude der Autokorrelationsfunktion ist umgekehrt proportional zur Teilchenanzahl, d.h., je mehr Teilchen im konfokalen Volumen detektiert werden, desto kleiner ist die Amplitude (dunkel- zu hellblau: abnehmende Amplitude).

Die Wahrscheinlichkeit, ein Molekül zu detektieren, ist eng verknüpft mit der Wahrscheinlichkeit, ein Molekül an einem Ort \vec{r} anzuregen. Dies ist durch den Mikroskopaufbau bestimmt, d.h., auf der einen Seite das räumliche Profil des Beobachtungsvolumens $W(\vec{r})$ und der Detektionseffizienz q , auf der anderen Seite aber zudem von den intrinsischen Eigenschaften der fluoreszenten Moleküle, wie der Quantenausbeute κ , dem Absorptionsquerschnitt σ , und der vorgelegten Konzentration $C(\vec{r}, t)$.

Mit diesen Parametern wird die Fluoreszenzintensität bestimmt durch

$$F(t) = \kappa \sigma q \int W(\vec{r}) C(\vec{r}, t) dV. \quad (2.56)$$

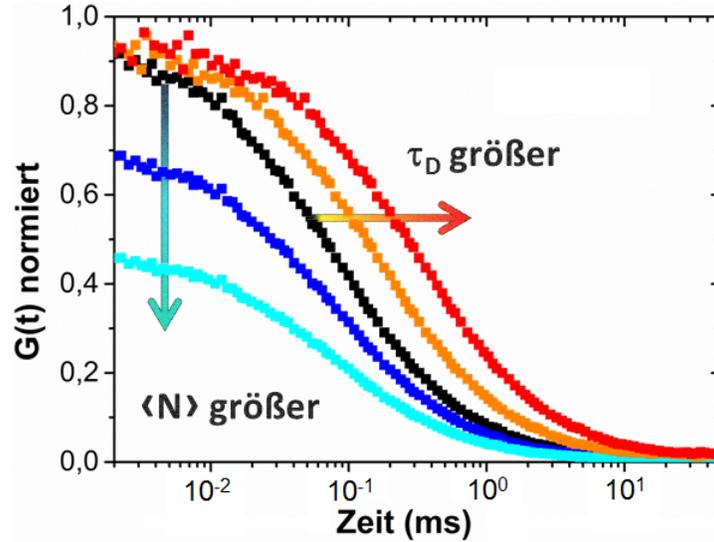


Abbildung 2.17: Theoretischer Verlauf der FCS-Autokorrelationsfunktion $G(t)$. Sowohl mittlere Teilchenanzahl $\langle N \rangle$ als auch Diffusionszeit τ_D können daraus berechnet werden. Je größer die Diffusionszeit, desto langsamer findet der Abfall statt. Je mehr Teilchen im konfokalen Volumen detektiert werden, desto kleiner ist die Amplitude.

Das Beobachtungsvolumen $W(\vec{r})$, das die gesamte Information über die Diffusion der Moleküle enthält, wird durch eine dreidimensionale Gaussfunktion angenähert und molekulare Detektionsfunktion (*molecular detection function*; MDF) genannt. Es gilt

$$W(\vec{r}) = \exp\left(-2 \cdot \frac{x^2 + y^2}{r_0^2}\right) \cdot \exp\left(-2 \cdot \frac{z^2}{z_0^2}\right). \quad (2.57)$$

Die Funktion ist symmetrisch um die optische Achse z , mit der Breite r_0 und Länge z_0 und gibt die Wahrscheinlichkeit an, ein emittiertes Photon am Ort \vec{r} anzuregen und zu detektieren. Die Amplitude der Gaussfunktion ist bei $r = r_0$ in radialer und $z = z_0$ in axialer Richtung auf $1/e^2$ abgefallen. Die laterale Diffusion ist beschrieben durch

$$\frac{\partial C(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 C(\vec{r}, t), \quad (2.58)$$

wobei $C(\vec{r}, t)$ die Konzentration der fluoreszierenden Partikel an der Position \vec{r} zum Zeitpunkt t darstellt, und mit D der Diffusionskoeffizient bezeichnet

wird. Die Lösung dieser Differentialgleichung ist gegeben durch

$$C(\vec{r}, t) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{3/2}} \cdot \exp\left(-\frac{|\vec{r}|^2}{4Dt}\right). \quad (2.59)$$

Die Abweichung der mittleren Molekülkonzentration ist $\delta C(\vec{r}, t)$. Daraus folgt für Abweichungen vom durchschnittlichen Fluoreszenzsignal

$$\delta F(t) = \int W(\vec{r}) \delta(\eta C(\vec{r}, t)) dV = \eta \int W(\vec{r}) \delta(C(\vec{r}, t)) dV, \quad (2.60)$$

mit dem konstanten zusammengefassten Parameter $\eta = \kappa \sigma q$. Setzt man Gleichung 2.56 und Gleichung 2.60 in die normierte Autokorrelationsfunktion,

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}, \quad (2.61)$$

ein, erhält man

$$G(\tau) = \frac{\int \int W(\vec{r}) W(\vec{r}') \langle \delta C(\vec{r}, t) \delta C(\vec{r}', t+\tau) \rangle_t dV dV'}{(\int W(\vec{r}) \langle \delta C(\vec{r}, t) \rangle_t dV)^2}. \quad (2.62)$$

Wird nur eine Spezies fluoreszierender Moleküle verwendet, kann angenommen werden, dass Diffusionskoeffizient D und Konzentration $\langle C(\vec{r}, t) \rangle_t = \langle C \rangle$ konstant sind und kein Einfluss durch die Beobachtungszeit auf die Autokorrelationsfunktion gegeben ist. Mittels Gleichung 2.59 kann die Teilchenanzahldichte bestimmt werden zu

$$\langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', \tau) \rangle = \frac{\langle C \rangle}{(4\pi D\tau)} \cdot \exp\left(-\frac{|\vec{r} - \vec{r}'|^2}{4D\tau}\right). \quad (2.63)$$

Dadurch ergibt sich für die Autokorrelationsfunktion

$$G(\tau) = \frac{\frac{\langle C \rangle}{(4\pi D\tau)} \int \int W(\vec{r}) W(\vec{r}') \cdot \exp\left(-\frac{|\vec{r} - \vec{r}'|^2}{4D\tau}\right) dV dV'}{(\langle C \rangle \int W(\vec{r}) dV)^2}. \quad (2.64)$$

Um weiter zur Autokorrelationsfunktion frei diffundierender Moleküle zu gelangen, geht man davon aus, dass die laterale Diffusionszeit τ_D durch den Radius des konfokalen Volumens r_0 mit dem Diffusionskoeffizienten D verknüpft wird, zu

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D}. \quad (2.65)$$

Mit Gleichung 2.57 ergibt sich für das konfokale Volumen V_{eff}

$$V_{\text{eff}} = \frac{(\int W(\vec{r})dV)^2}{\int W^2(r)dV} \quad (2.66)$$

$$= \frac{(\int \exp(-2\frac{x^2+y^2}{r_0^2}) \cdot \exp(-2\frac{z^2}{z_0^2})dV)^2}{\int \exp(-4\frac{x^2+y^2}{r_0^2}) \cdot \exp(-4\frac{z^2}{z_0^2})dV} \quad (2.67)$$

$$= \pi^{3/2} \cdot r_0^2 \cdot z_0. \quad (2.68)$$

Aus Gleichung 2.64 ergibt sich mit Gleichung 2.65 und Gleichung 2.68 die Autokorrelationsfunktion $G(t)$ frei diffundierender Moleküle zu

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{\text{eff}}\langle C \rangle} \cdot (1 + \frac{\tau}{\tau_D})^{-1} \cdot (1 + (\frac{r_0}{z_0})^2 \frac{\tau}{\tau_D})^{-1/2}. \quad (2.69)$$

Die Parameter r_0 und z_0 werden mit einer Referenzprobe bestimmt. Anhand der Amplitude kann die Konzentration der Probe bestimmt werden.

Zwei-Fokus-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (2fFCS): Im Jahre 2007 führten Dertinger et al. als neue Methode die 2fFCS ein [119]. Das Messprinzip ist identisch zur konventionellen FCS Methode, d.h., es werden die Fluktuationen des zeitabhängigen Fluoreszenzsignals aufgrund der Diffusion von Molekülen analysiert. Allerdings werden zwei räumlich verschobene, überlappende Foki generiert. Dadurch wird neben den jeweiligen Autokorrelationsfunktionen die Kreuzkorrelation, d.h., die Korrelation zwischen beiden Foki, berechnet. Auf diese Weise kann die benötigte Diffusionszeit der Moleküle von einem zum anderen Fokus gemessen und durch den bekannten Abstand der beiden Foki (Inter-Foki-Abstand) eine externe Längenskalierung in Bezug auf die Probe eingeführt werden. Dies stellt eine bedeutende Verbesserung zur konventionellen FCS Methode dar [120, 121].

Im Folgenden soll die Kreuzkorrelationsanalyse genauer betrachtet werden. Beschreibt die Autokorrelation die Ähnlichkeit eines Signals mit sich selbst nach einer Verzögerung, wird durch die Kreuzkorrelation die Ähnlichkeit zweier Signale bestimmt. Dadurch ergibt sich analog zu Gleichung 2.61

$$G_{12}(\tau) = \frac{\langle F_1(t)F_2(t + \tau) \rangle}{\langle F_1(t) \rangle \langle F_2(t) \rangle} - 1. \quad (2.70)$$

Unter Beachtung der Verschiebung der beiden Foki zu einem Abstand d , folgt für Gleichung 2.63

$$\langle \delta C(\vec{r}, 0) \delta C(\vec{r}', \tau) \rangle = \frac{\langle C \rangle}{(4\pi D\tau)} \cdot \exp\left(-\frac{|\vec{r} - \vec{r}' - \vec{x}d|^2}{4D\tau}\right), \quad (2.71)$$

mit dem Einheitsvektor \vec{x} in x-Richtung. Analog zu Gleichung 2.64 gilt für die Kreuzkorrelation

$$G(\tau) = \frac{\frac{\langle C \rangle}{(4\pi D\tau)} \int \int W(\vec{r}) W(\vec{r}') \cdot \exp\left(-\frac{|\vec{r} - \vec{r}' - \vec{x}d|^2}{4D\tau}\right) dV dV'}{(\langle C \rangle \int W(\vec{r}) dV)^2}. \quad (2.72)$$

Geht man erneut von freier Diffusion der Partikel durch die Foki aus, ergibt sich mit Gleichung 2.65

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{\text{eff}} \langle C \rangle} \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \cdot \left(1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1/2} \cdot \exp\left(\frac{-d^2}{4D\tau + r_0^2}\right). \quad (2.73)$$

Der erste Term von Gleichung 2.73 entspricht dabei der Autokorrelationsfunktion wie sie in Gleichung 2.69 bereits vorgestellt wurde. Der Exponentialterm ist für die Kreuzkorrelation ausschlaggebend und trägt bei der Berechnung der einzelnen Autokorrelationen aufgrund von $d = 0$ nicht mehr bei.

Betrachtung von zeitabhängiger Diffusion

Betrachtet man eine zeitabhängige Diffusion, muss Gleichung 2.58 zu

$$\frac{\partial C(\vec{r}, t)}{\partial t} = D(t) \nabla^2 C(\vec{r}, t) \quad (2.74)$$

umgeschrieben werden, mit der Konzentration der fluoreszierenden Partikel $C(\vec{r}, t)$ an der Position \vec{r} zum Zeitpunkt t und mit $D(t)$ als zeitabhängigem Diffusionskoeffizienten. Die mittlere quadratische Verschiebung $\langle r^2 \rangle$ ist nicht mehr proportional zur Zeit, allerdings gilt

$$\langle r^2 \rangle \propto t^b, \text{ mit } b \leq 1. \quad (2.75)$$

Der Quotient aus Zeitpunkt t und Diffusionszeit τ_D muss dabei in den Korrelationsfunktionen ersetzt werden [118, 122, 123] durch den Quotienten

$$\left(\frac{t}{\tau_D}\right)^b. \quad (2.76)$$

Betrachtung von Helligkeitsfluktuationen

In den bisherigen Betrachtungen wurde davon ausgegangen, dass sich das Fluoreszenzverhalten der Fluorophore im Detektionsvolumen nicht verändert. Häufig trifft dies, besonders bei hohen Anregungsintensitäten nicht zu.

(a) Triplett-Term

Die häufigste Ursache für ein verändertes Fluoreszenzverhalten ist durch Relaxationswege über einen Triplett-Zustand verursacht (siehe ISC, Unterkapitel 2.4). Diese Relaxation ist quantenmechanisch verboten, wodurch eine längere Zeit für das Molekül nötig ist, um zum Grundzustand zurückzukehren. Der dadurch hervorgerufene Zustand des Wechsels zwischen Fluoreszenz und Nicht-Fluoreszenz nennt man Blinken. Die Verweildauer im Triplett-Zustand ist meist wesentlich kürzer als die Zeit, um durch das konfokale Volumen zu diffundieren. In diesem Fall kann die Autokorrelationsfunktion aus zwei separaten dynamischen Prozessen zusammengesetzt werden: einer Komponente aufgrund freier Diffusion und einer Komponente aufgrund des Triplett-Zustands. Es gilt für die Gesamtautokorrelationsfunktion

$$G_{\text{Gesamt}}(\tau) = G_{\text{Diffusion}}(\tau) \cdot G_{\text{Triplett}}(\tau), \quad (2.77)$$

mit der Triplettkomponente

$$G_{\text{Triplett}}(\tau) = 1 + \frac{T}{1-T} \cdot \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{\text{T}}}\right). \quad (2.78)$$

und $G_{\text{Diffusion}}$ als Autokorrelationsfunktion einer freien Diffusion analog zu Gleichung 2.69. Mit τ_{T} wird die Relaxationszeit aus dem Triplettzustand bezeichnet, und T benennt die Anzahl der Moleküle im Triplett-Zustand.

Der Triplettbeitrag wird in der Autokorrelationskurve durch eine Schulter bei kurzen Zeitskalen sichtbar. Mit der Betrachtung eines Triplettzustandes können beliebige photophysikalische Prozesse beschrieben werden, die aus reversiblen Übergängen zwischen fluoreszenten und nicht-fluoreszenten Zuständen resultieren.

(b) Kinetik-Term

Weitere Ursachen für Fluktuationen in der Helligkeit sind aufgrund von strukturellen Veränderungen im Gesamtsystem möglich. Dabei kann es zu einem veränderten Fluoreszenzverhalten aufgrund einer Veränderung der Anordnung des Moleküls in Relation zum Fluoreszenzmarker kommen. Eine weitere

Möglichkeit stellt eine Veränderungen des umgebenden Mediums dar, das die Quantenausbeute beeinflusst. Erneut kann ein solcher Effekt mit einer Gesamtautokorrelationsfunktion G_{Gesamt} , aus freier Diffusion $G_{\text{Diffusion}}(t)$ und einer Autokorrelationsfunktion aufgrund der Kinetik $G_{\text{Kinetik}}(t)$ gebildet werden. Diese kann definiert werden als

$$G_{\text{Gesamt}}(\tau) = G_{\text{Diffusion}}(\tau) \cdot G_{\text{Kinetik}}(\tau), \quad (2.79)$$

mit der Kinetikkomponente

$$G_{\text{Kinetik}}(\tau) = 1 + \frac{K}{1 - K} \cdot \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_K}\right), \quad (2.80)$$

und der freien Diffusion aus Gleichung 2.69. Mit τ_K wird die Relaxationszeit bezeichnet und K benennt die Anzahl der Moleküle in diesem Zustand.

Da oft $K \ll 1$ gilt, kann dieser Term auch geschrieben werden als

$$G_{\text{Kinetik}}(\tau) = 1 + K \cdot \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_K}\right). \quad (2.81)$$

2.5 Weitere Mikroskopie- und Messverfahren

Im folgenden Unterkapitel werden zwei weitere Mikroskopieverfahren vorgestellt, die nicht auf Fluoreszenz beruhen. Dabei handelt es sich zum einen um die Transmissionselektronenmikroskopie, die als ein Charakterisierungsverfahren verwendet wurde, und zum anderen um die Schwingquarzwaage, die zur Untersuchung der Lipid-Protein Interaktion diene.

2.5.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Zur Transmissionselektronenmikroskopie (*transmission electron microscopy*; TEM) werden Elektronen verwendet, um die zu untersuchende Probe damit zu durchstrahlen und anhand der Beugungsbilder Aussagen über ihre Struktur zu erhalten [28, 124–126]. Besonders zur Charakterisierung von Kristallstrukturen ist diese Methode daher von Bedeutung.

Messprinzip

Bei der Elektronenmikroskopie treffen Elektronen auf die zu untersuchende Probe und werden daran elastisch und inelastisch gestreut. Das daraus resultierende Beugungsbild gibt Aufschluss über die Struktur der Probe. Aufgrund der viel größeren Masse des Streuers M im Vergleich zur Masse des Elektrons m_E , d.h., $M \gg m_E$, kann die kinetische Energie des Elektrons vor und nach dem Streuer als gleich betrachtet werden (elastische Streuung) und der Streuer kann durch ein elektrisches Potential beschrieben werden. Dieses ist durch das Coulombpotential des Kerns und dem abschirmenden Anteil durch die Elektronenhülle bestimmt. Betrachtet man die inelastische Streuung kann es dadurch zur Veränderung der Struktur des Streuers kommen, das wiederum zu Energieverlusten des Elektrons führt.

Bei der Elektronenmikroskopie treten verschiedene Möglichkeiten auf, wie Kontrast erzeugt wird. Möglichkeiten sind gegeben durch

- Dickenkontrast, d.h., dickere Bereiche der durchstrahlten Probe ergeben einen anderen Kontrast als dünnere Bereiche,
- Streu- bzw. Beugungskontrast, d.h., aufgrund der Streufähigkeit der zu untersuchenden Probe und damit deren Elemente.

Je nach Ordnungszahl der Probe muss diese sehr dünn sein (einige Nanometer bis wenige Mikrometer), um einen Kontrast erzeugen zu können.

Experimenteller Aufbau

In Abbildung 2.18 wird eine schematische Darstellung eines Elektronenmikroskops und seines Strahlengangs gezeigt. Es ist analog zu einem Lichtmikroskop aufgebaut. Anstelle von Glaslinsen werden allerdings Magnetlinsen zum Fokussieren des Elektronenstrahls verwendet. Diese bestimmen entscheidend das Auflösungsvermögen. Der gesamte Aufbau befindet sich in einem Gehäuse (grau), mit Zugang zu einer Pumpe, um das nötige Vakuum zu erzeugen. Von der Elektronenquelle (grün), die sowohl Strahlintensität als auch Durchmesser entscheidend beeinflusst, wird der Strahl (orange) zuerst justiert und durch Kondensorenspulen (= magnetische Linsen; blau) fokussiert. Der Strahl trifft auf die Probe (schwarz), wird an deren Kristallgitter gebeugt und gelangt durch Objektiv- und Projektivlinse (türkis) auf einen Leuchtschirm (weiß) oder andere bildgebende Systeme wie z.B. eine CCD-Kamera (*charge-coupled device*).

Man unterscheidet zwischen Hellfeld- und Dunkelfeldabbildung. Wichtiges Detail für diese Unterscheidung ist die Objektivblende (Abbildung 2.18; grau), die sich im Brennpunkt der Objektivlinse befindet. Bei der Hellfeldabbildung werden alle gebeugten Strahlen, die stärker gebeugt werden als der Öffnungswinkel der Objektivblende, ausgeblendet. Stark streuende Elemente weisen dadurch eine geringe Elektronenintensität im Vergleich zu gering streuenden Elementen auf. Bei der Dunkelfeldabbildung wird der Elektronenstrahl oder die Objektivblende gekippt, sodass gebeugte Strahlen ausgewählt werden können. Die ausgewählten, stark streuenden Bereiche weisen eine hohe Elektronenintensität auf.

Auflösungsvermögen

Die Wellenlänge λ von Elektronen einer bestimmte Energie kann mit der de-Broglie Gleichung (vgl. zudem Gleichung 2.36) beschrieben werden, die gegeben ist durch

$$\lambda = \frac{h}{p}. \quad (2.82)$$

Mit h bezeichnet man das Plancksche Wirkungsquantum und mit p den Impuls des Teilchens. Mit der Beziehung $p = m \cdot v$ und dem relativistischen Energiesatz erhält man für ein Elektron die Wellenlänge

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_0 \cdot eU_A \left(1 + \frac{eU_A}{2m_0c^2}\right)}}, \quad (2.83)$$

mit der Ruhemasse m_0 , der Elementarladung e und der Beschleunigungsspannung U_A des Elektrons, und der Lichtgeschwindigkeit c .

Betrachtet man eine Beschleunigungsspannung von $U_A = 200$ keV, ergeben sich Wellenlängen im Picometer-Bereich. Dadurch ergibt sich eine höhere Auflösung als in der konfokalen Mikroskopie momentan möglich ist, allerdings erhält man aufgrund der Güte der Linsen und die dadurch entstehenden Fokussiermöglichkeiten ein Auflösungsvermögen von $2 - 3 \text{ \AA}$.

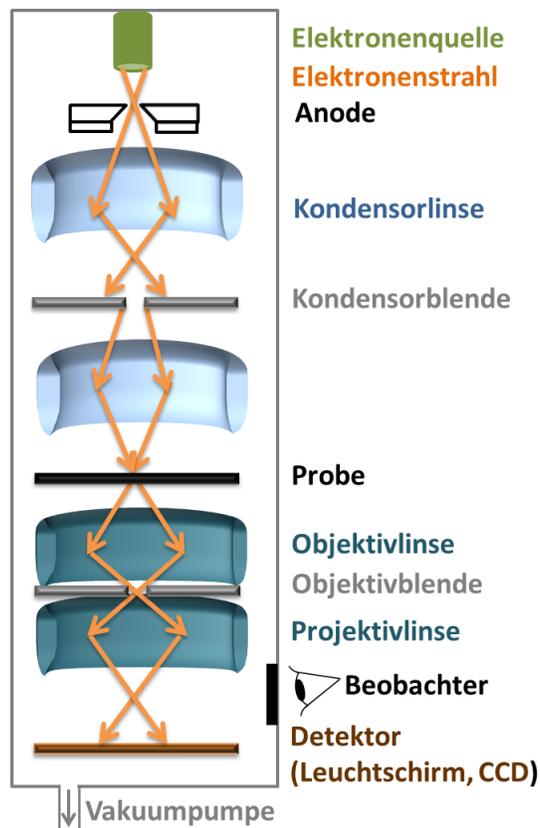


Abbildung 2.18: Schematische Darstellung eines Elektronenmikroskops. Der Aufbau ist analog zum Lichtmikroskop mit dem Unterschied, dass Kondensorlinsen anstelle von Glaslinsen verwendet werden.

2.5.2 Schwingquarzwaage

Die Methode der Schwingquarzwaage mit gleichzeitiger Dämpfungsmessung (*quartz crystal microbalance with dissipation monitoring*; QCM-D) ist eine sensorbasierte Messtechnik, basierend auf dem inversen piezoelektrischen Effekt [127–129]. Als Sensor dient ein Quarzkristall, der zu Schwingungen angeregt wird und dessen Frequenzverschiebung aufgrund von absorbiertem Masse und ebenfalls dessen Dämpfung aufgezeichnet wird. Die Schwingquarzwaage wird zur Messung von Bindungen, Bindungskinetiken, und zeitabhängiger Messung viskoelastischer Eigenschaften adsorbierter Schichten herangezogen. Laut Hersteller kann eine Sensitivität von $0,5 \text{ ng cm}^{-2}$ erzielt werden.

Piezoelektrizität

Die Sensoren der Schwingquarzwaage bestehen aus Quarzkristallen (SiO_2), die ein piezoelektrisches Material darstellen. Voraussetzungen für die Piezoelektrizität bei Kristallen sind, dass sie nichtleitend sind, keine Verzwilligung vorliegt und die Elementarzelle kein Symmetriezentrum besitzt. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen Direktem und Inversen Piezoeffekt (*griech. $\pi\acute{\epsilon}\zeta\epsilon\upsilon\nu$, drücken*) [130]. Von **Direktem Piezoeffekt** spricht man, wenn es im Material durch Anlegen einer Kraft (= Verformung) zu einer Ladungsverschiebung und damit zu einer Polarisierung kommt. D.h., es entsteht ein Dipolmoment bzw. eine elektrische Spannung. Von einem **Inversen Piezoeffekt** spricht man, wenn umgekehrt aufgrund einer angelegten Spannung eine Kraft (= Verformung) erzeugt wird.

Elektronische Betrachtung

Schaltet man das an einen Quarzkristall angelegte elektrische Feld aus, wird durch das Zurückkehren in die ursprüngliche Form des Schwingquarzes eine elektrische Spannung erzeugt. Durch eine Rückkopplungsschaltung wird das Signal in eine mechanische Resonanzschwingung übersetzt.

Mit dem Butterworth-Van Dyke Ersatzschaltbild (BVD) kann das Verhalten eines Schwingquarzes mit einem einfachen Modell dargestellt werden [131]. Abbildung 2.19 (a) zeigt das Ersatzschaltbild des Quarzkristalls. Diese Parallelschaltung besteht aus einem akustischen Zweig und einem elektrischen Zweig, die im Folgenden betrachtet werden sollen.

Der **akustische Zweig** ist als Analogon zu einem mit Wechselspannung betriebenen gedämpften harmonischen Oszillator zu verstehen (Abbildung 2.19 (b)). Der elektrische Serienschwingkreis besteht aus einer Spule L (grün),

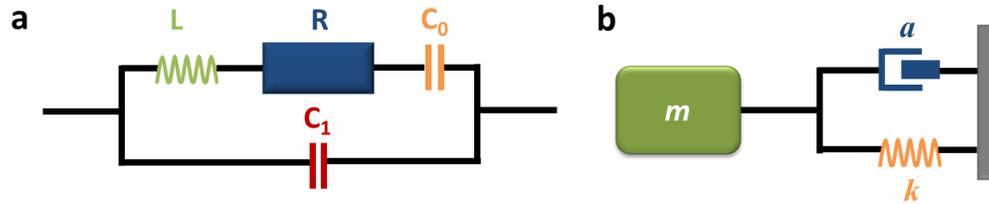


Abbildung 2.19: Butterworth-Van Dyke Ersatzschaltbild eines Quarzkristalls. (a) Dieser besteht aus einem Bewegungsweig mit Induktivität L (grün), Widerstand R (blau), und Kapazität C_0 (orange), sowie einer parasitären Kapazität C_1 (rot). (b) In Analogie zum Serienschwingkreis steht der gedämpfte harmonische Oszillator mit der Masse m (grün), Dämpfungskonstanten a (blau), und Federkonstanten k (orange).

die mit der Massenänderung während der Schwingung in Verbindung gebracht werden muss, einem Widerstand R (blau), korrespondierend mit der Dämpfung durch aufgelagertes Material auf dem Sensor und dem Einfluss des umgebenden Mediums, und einer Kapazität C_0 (orange) aufgrund der gespeicherten Energie während der Oszillation. Im Vergleich zum gedämpften harmonischen Oszillator ist die Induktivität der Spule L als mechanische Masse m , der Widerstand R als Dämpfung a , und die Kapazität C_0 als reziproke Federkonstante k aufzufassen. Der gedämpfte harmonische Oszillator kann beschrieben werden durch die Differentialgleichung

$$m \frac{dx^2}{dt^2} + a \frac{dx}{dt} + kx = 0. \quad (2.84)$$

Übertragen auf den Serienschwingkreis gilt

$$L \frac{dQ^2}{dt^2} + R \frac{dQ}{dt} + \frac{1}{C} Q = 0. \quad (2.85)$$

Die Lösung der Differentialgleichung ist in allgemeiner Form gegeben durch

$$A(t) = A_0 e^{-\pi f D t} \sin(\pi f t + \phi), \quad (2.86)$$

mit der Amplitude $A(t)$, abhängig von der Zeit t . Dabei bezeichnet A_0 die Amplitude zum Zeitpunkt $t = 0$, f gibt die Frequenz an, mit D wird die Dämpfung beschrieben und ϕ bezeichnet den Phasenwinkel.

Der **elektrische Zweig** besteht aus einer parasitären Kapazität C_1 (rot), die

sich aus Beiträgen von Kapazitäten der Elektroden, der Befestigung und der Verbindungen zusammensetzt. Die bisherigen Betrachtungen der Einflüsse aus den Komponenten des akustischen Zweiges gelten nur bei Resonanzen nahe der Eigenfrequenz. Bei Anregungen weit entfernt von der Eigenfrequenz, trägt nur der kapazitive Teil C_1 des elektrischen Zweiges bei und der Quarzkristall kann als reiner Plattenkondensator angesehen werden.

Experimenteller Aufbau

Eine kommerziell erhältliche Schwingquarzwaage mit der Möglichkeit, nicht nur Frequenzverschiebungen, sondern ebenso den Dämpfungsfaktor zu bestimmen, wird im Folgenden vorgestellt. Abbildung 2.20 zeigt schematisch den Aufbau einer solchen Apparatur. Der Sensor (Quarzkristall; grau) wird in einer Messkammer (blau) befestigt. Von einer Seite kann Flüssigkeit in die Kammer eingebracht werden, auf der anderen Seite befindet sich ein Auslassventil. Die Flüssigkeit kann entweder in die Messkammer über erwärmte Schläuche eingegeben und durch die Messzelle zum Auslass geleitet werden oder direkt ohne Weg über die Messkammer ausgeleitet werden. Letztere Möglichkeit dient hauptsächlich dem Reinigen. Kontrolliert wird der Flüssigkeitsweg durch einen Hebel, der in der Abbildung grün eingezeichnet ist.

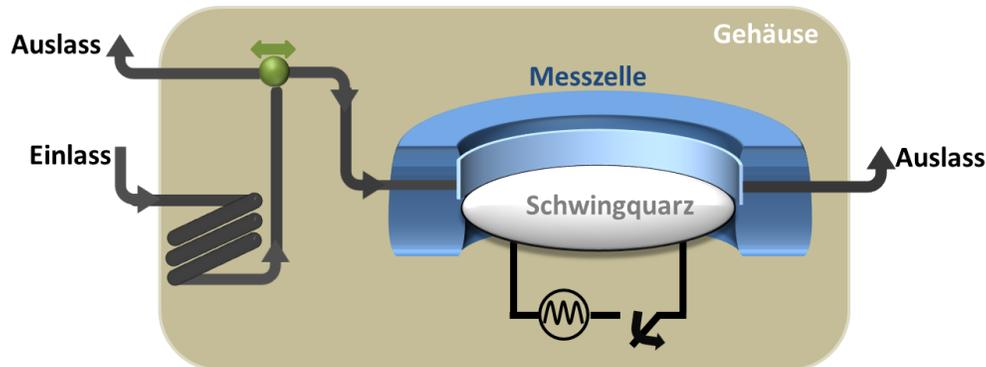


Abbildung 2.20: Experimenteller Aufbau einer Schwingquarzwaage. Der Sensorchip (Quarzkristall) wird in einer Messkammer befestigt. Einlass- und Auslassventil ermöglichen die Probenzu- und abführung. Durch eine angelegte Wechselspannung wird der Kristall aufgrund des Inversen Piezoeffekts zu Schwingungen angeregt.

Abbildung 2.21 (a) zeigt schematisch den Aufbau des Schwingquarzsensors, bestehend aus einem Quarzkristall, auf dessen Ober- und Unterseite je eine Elektrode angebracht ist. Bei Anlegen einer Wechselspannung wird der Kristall aufgrund des Inversen Piezoeffekts mit seiner Eigenfrequenz deformiert und in Schwingung versetzt. Dies wird in Abbildung 2.21 (b) dargestellt. Für den Schwingquarz ergeben sich stehende transversale akustische Wellen, die senkrecht zur Quarzoberfläche orientiert sind.

Datenauswertung

Die Eigenfrequenz f_0 des Quarzkristalls ist bestimmt durch seine Dicke d_Q und durch den Winkel zwischen Oberfläche und Kristallachse. Es gilt

$$f_0 = \frac{1}{2d_Q} \sqrt{\frac{\mu_Q}{\rho_Q}}. \quad (2.87)$$

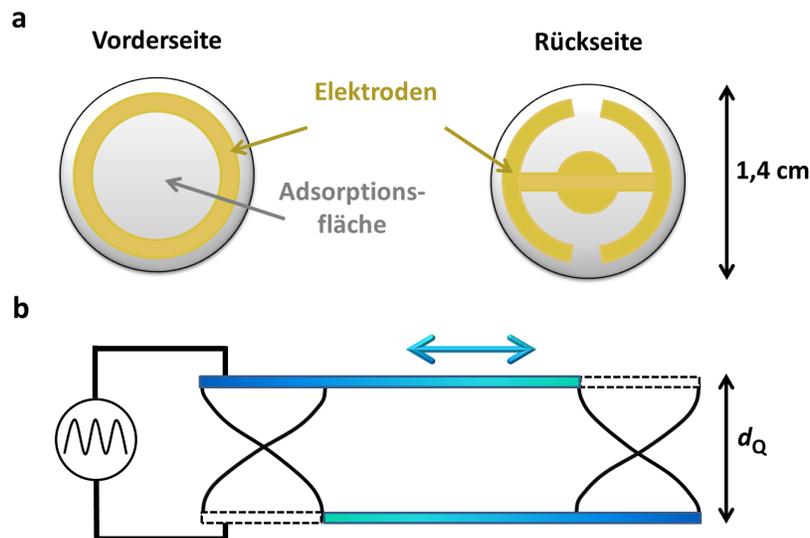


Abbildung 2.21: Schematische Darstellung des Schwingquarzsensors. (a) Auf der Ober- und Unterseite sind Elektroden angebracht. (b) Bei angelegter Wechselspannung deformiert sich der Kristall (Inverser Piezoeffekt). Je nach Massenadsorption vergrößert sich die effektive Kristalldicke d_Q , wodurch die Wellenlänge der stehenden Welle vergrößert wird und dadurch die Resonanzfrequenz sinkt.

Die Dichte des Quarzkristalls ist gegeben als $\rho_Q = 2,648 \text{ g cm}^{-3}$ und der Schermodul als $\mu_Q = 2,9 \cdot 10^{10} \text{ N m}^{-2}$.

Zum ersten Mal beschrieb Sauerbrey 1959 den Zusammenhang der Frequenzveränderung von Schwingquarzen aufgrund einer Massenlagerung und damit das Prinzip der QCM-D Technik [132]. Mit der Sauerbrey-Gleichung (Gleichung 2.88) wird der Zusammenhang zwischen Frequenzänderung Δf und Massenänderung Δm von starren Oberflächen beschrieben,

$$\Delta f = -\frac{f_0 \Delta d}{d_Q} = -\frac{2f_0^2 \Delta m}{A \sqrt{\rho_Q \mu_Q}} = -C \Delta m. \quad (2.88)$$

Mit A wird die Elektrodenfläche auf dem Quarz bezeichnet, und C ist die Massensensitivitätskonstante mit $C = 17,7 \text{ ng cm}^{-2} \text{ Hz}^{-1}$ bei einem 5 MHz Kristall. Die Bedeutung von C ist, dass bei einem 5 MHz Kristall eine Massenlagerung von 17,7 ng auf einer Fläche von 1 cm^{-2} eine Frequenzverschiebung von 1 Hz hervorruft.

Gemessen wird die Frequenzverschiebung durch Vergleich der Resonanzfrequenz des unbeladenen Quarzkristalls mit der des beladenen Kristalls. Ist der Quarz mit einer dünnen Schicht beladen, so vergrößert sich die effektive Dicke des Kristalls. Dadurch steigt die Wellenlänge der stehenden Welle. Während der Messung wird die erste Grundfrequenz ($n = 1$; $f = 5 \text{ MHz}$), dritte ($n = 3$; $f = 15 \text{ MHz}$), fünfte ($n = 5$; $f = 25 \text{ MHz}$) und siebte ($n = 7$; $f = 35 \text{ MHz}$) Obertonschwingung aufgezeichnet.

Durch Umformung ergibt die Sauerbrey-Gleichung (vgl. Gleichung 2.88)

$$\Delta f = \frac{\Delta f_n}{n}, \quad (2.89)$$

mit n als Obertonzahl und der zugehörigen Frequenzverschiebung Δf_n .

Neben der Resonanzfrequenz kann zudem die Dämpfung betrachtet werden. Dabei wird ein 'ring-down' Verfahren verwendet, d.h., zwischenzeitlich wird die Spannung ausgeschaltet und die Dämpfung der Kristalloszillation aufgezeichnet. Dadurch können detailliertere Informationen, besonders in Hinblick auf viskoelastische Eigenschaften des adsorbierten Probenmaterials, gewonnen werden. Besitzt ein adsorbierter Probenfilm hohe viskoelastische Eigenschaften, wird die Frequenzverschiebung aufgrund der hervorgerufenen Dämpfung geringer ausfallen. Dies zeigt, dass in der Kombination beider Messparameter, Frequenzverschiebung und Dämpfungsmessung, eindeutig eine viel detailliertere Charakterisierung möglich ist. Die Dämpfung D

wird mit dem Quotienten aus dem Energieverlust während des Oszillationszyklus E_{Verlust} und der Gesamtenergie E_{Gesamt} , die im Oszillator gespeichert ist, beschrieben,

$$D = \frac{E_{\text{Verlust}}}{2\pi E_{\text{Gesamt}}}. \quad (2.90)$$

Abbildung 2.22 zeigt eine Bildschirmaufnahme der aufgezeichneten Dämpfung eines oszillierenden Schwingquarzes in Puffer (a) und in Luft (b). Man erkennt deutlich, dass die Schwingung im Puffersystem gedämpft wurde im Vergleich zu Luft. Je nach adsorbierter Schicht auf dem Schwingquarz entsteht eine andere Dämpfungskonstante, sodass Aussagen über die viskoelastischen Eigenschaften des Systems getroffen werden können.

Untersuchungen von Lipidoberflächen mit der Schwingquarzwage wurden vielfach in den vergangenen Jahrzehnten aufgezeigt: Durch unterschiedliche Oberflächenbeschichtungen können Liposome immobilisiert und Lipidmono- oder Lipiddoppelschichten generiert werden [55, 133–136]. Als weiterer Schritt kann Polyethylenglycol integriert werden [137–140] und die Interaktion mit biologischen Systemen [141], insbesondere mit Proteinen, aufgezeigt werden [24, 142].

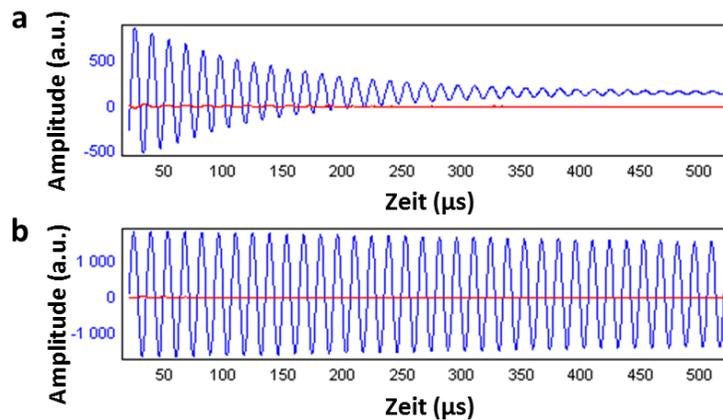


Abbildung 2.22: Beobachtung der Oszillation eines Schwingquarzes. (a) in Puffer und (b) in Luft.

In diesem Kapitel wurden Grundlagen zu Lipiden, Proteinen, insbesondere dem C3 Protein, und die mathematische Beschreibung von Bindungsereignissen erläutert. Im Anschluss wurden die Methoden der (Zwei-Fokus-) Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS/2fFCS), sowie Transmissions-elektronen-mikroskopie (TEM) und Schwingquarzwaage (QCM-D) detailliert vorgestellt. Im folgenden Kapitel werden die auf diesen Grundlagen aufbauenden Messungen dieser Arbeit vorgestellt und die Ergebnisse präsentiert.

Kapitel 3

Untersuchungen zur C3-Lipid Interaktion

In Unterkapitel 2.2 wurden bereits das Komplementsystem und das Komplementprotein C3 vorgestellt. Als erster Schritt wird in diesem Kapitel in Unterkapitel 3.1 die Komplementaktivierung aufgrund von Liposomenzugabe zu menschlichem Blutplasma analysiert. Gemessen wird diese anhand der Reaktionsprodukte C3a und sC5b-9. Dazu wird das biochemische Verfahren des Immunoassays (ELISA) herangezogen. Die Interaktion von C3 mit planaren Lipidoberflächen wird daraufhin mit Immunoblotting in Abschnitt 3.2.1 und der Methode der Schwingquarzwage in Abschnitt 3.2.2 untersucht, um die Bindung des C3 Proteins und dessen Konformation, gebunden an Lipidoberflächen, direkt zu charakterisieren. Um ein Gesamtbild der C3-Lipid Interaktion zu erhalten, das nicht nur planare Oberflächen beinhaltet, wird in Unterkapitel 3.3 eine Methodenkombination zur Detektion der C3-Interaktion mit stark gekrümmten Lipidoberflächen vorgestellt. Abschließend werden die erzielten Messergebnisse erläutert.

Die Messungen der Komplementaktivierung, Immunoblotting und Schwingquarzwage beruhen auf einer Veröffentlichung [143] und wurden bei den Kooperationspartnern Prof. Kristina Nilsson-Ekdahl und Prof. Bo Nilsson an der Universität Uppsala, Schweden, durchgeführt. Die Entwicklung der neuartigen Methodenkombination sowie zugehörige Messungen zur Auflösung von Interaktionsereignissen wurden zur Veröffentlichung vorbereitet.

3.1 Komplementaktivierung

Die Komplementaktivierung in menschlichem Blutplasma durch neutrale Liposomen diente als Ausgangspunkt für alle weiteren Interaktionsstudien. Dazu wurden Liposomen in menschlichem Blutplasma bis zu 60 min inkubiert und die Konzentration der Aktivierungsprodukte der Komplementkaskade C3a und sC5b-9 anhand von Immunoassays (ELISA) nachgewiesen.

Probenpräparation

Liposomen: DMPC (1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholin; Lipoid, Ludwigshafen, Deutschland) wurde in Ethanol (C_2H_6O ; Roth, Karlsruhe, Deutschland) gelöst und in einem Glasröhrchen verdampft, sodass ein dünner Lipidfilm an den Glaswänden entstand (Filmmethode). Dieser wurde in Puffer (PBS; *phosphate buffered saline* mit Ca^{2+} und Mg^{2+} , PAA Labs, Cölbe, Deutschland) zu einer Endkonzentration von 20 mM Lipidlösung resuspendiert. Die entstandenen Lipidvesikel wurden durch eine Polycarbonatmembran (Whatman, Maidstone, Großbritannien) mit einer Porengröße von $0,2 \mu m$ bei einer Temperatur von $40 - 50 \text{ }^\circ C$ extrudiert. Die hohe Temperatur wurde gewählt, um oberhalb der Übergangstemperatur des festen Aggregatzustandes der Lipide zu gelangen und das Ausbilden einer homogenen Doppelschicht zu gewährleisten. Durch Dynamische Lichtstreuung (DLS) mit einem Gerät der Firma Malvern (Zetasizer ZS90, Malvern, Herrenberg, Deutschland) wurde der Liposomendurchmesser zu $d = 169 \pm 4 \text{ nm}$ und ein ζ -Potential von $\zeta = -6 \pm 3 \text{ mV}$ im verwendeten Puffer bestimmt. Im Anschluss wurden die Liposomen bei $-24 \text{ }^\circ C$ gelagert, vor jedem Gebrauch für 30 min im Ultraschallbad behandelt, und erneut die Größe gemessen.

Menschliches Blutplasma: Die Blutproben wurden von gesunden Blutspendern in 6 ml Vacutainer Röhrchen (BD Vacutainer Z, Plymouth, Großbritannien), die mit dem Thrombininhibitor Lepirudin ($70 \mu M$; Refludan, Schering AG, Berlin, Deutschland) befüllt waren, direkt vor dem Experiment abgenommen. Durch Lepirudin wurde sichergestellt, dass das Gerinnungssystem nicht aktiviert wurde und das zu untersuchende Komplementsystem voll funktionsfähig blieb [144]. Die Proben wurden zweimal bei 2000 g, 15 min (Raumtemperatur) zentrifugiert und werden im Folgenden als Lepirudin-Plasma bezeichnet.

Durchführung der Experimente

Die Liposomen ($1,5 \text{ mg ml}^{-1}$) wurden in Lepirudin-Plasma 0, 15, 30 oder 60 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und die Reaktion mit 10 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA; Merck, Darmstadt, Deutschland) gestoppt. Durch den Chelator EDTA werden sowohl Mg^{2+} - als auch Ca^{2+} - Ionen der Reaktion entzogen, sodass das Komplementsystem umgehend zum Erliegen kommt. Weitere Proben wurden aus Lepirudin-Plasma hergestellt, das vor der Liposomenzugabe mit einem Zusatzstoff versetzt wurde:

- Mit EDTA (10 mM),
- mit Compstatin ($10 \text{ }\mu\text{M}$), einem spezifischen C3-Inhibitor, oder
- mit dem Chelator EGTA (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetra-essigsäure ; Merck; 10 mM).

Da die Aktivierung des Klassischen Komplementweges sowohl Mg^{2+} - als auch Ca^{2+} -Ionen, der Alternative Komplementweg nur Mg^{2+} -Ionen bedarf, konnte mit EGTA untersucht werden, ob eine Ca^{2+} -Abhängigkeit der Aktivierung besteht. EGTA bildet stark Chelate mit Ca^{2+} -Ionen, stärker als EDTA, und kann aus diesem Grund für eine Unterscheidung der Komplementwege herangezogen werden. EDTA hat eine größere Affinität zu Mg^{2+} -Ionen [145] und unterbindet damit sowohl Klassischen als auch Alternativen Komplementweg. Compstatin wurde von Prof. J.D. Lambris, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, USA, zur Verfügung gestellt. Lepirudin-Plasma ohne Liposomenzugabe oder Inhibitoren wurde als Kontrolle verwendet. Insgesamt wurden zwei verschiedene Immunoassays durchgeführt, um die Komplementaktivierung durch die Liposomen zu untersuchen. Das Protein C3a und der terminale Komplementkomplex sC5b wurden in der flüssigen Phase detektiert.

- Ein monoklonaler **C3a** Antikörper wurde als Fangantikörper verwendet und daran gebundenes C3a mit einer biotinylierten Form dieses Antikörpers detektiert, gefolgt von Streptavidin konjugierter Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*; HRP; Amersham, Little Chalfont, Großbritannien).
- Anti-human C5b-9 (Diatec, Oslo, Norwegen) wurde als Fangantikörper verwendet und gebundene **sC5b-9** Komplexe mit einem polyklonalen Komplement C5 erkennenden Antikörper (Acris, Herford,

Deutschland), gefolgt von HRP-konjugiertem polyklonalen Anti-Schaf Immunoglobulin Antikörper (Dako, Glostrup, Dänemark) detektiert.

Als Waschpuffer wurde PBS mit 0,05% Tween20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), als Arbeitspuffer dieser mit 1% (w/v) bovinem Serumalbumin (BSA; Sigma-Aldrich) und 10 mM EDTA versetzt, verwendet. Als Substrat diente 3,5',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB; Invitrogen). DeltaSoft (BioMetallics Inc., Princeton, NJ, USA) wurde zur Auswertung verwendet.

Ergebnisse

Abbildung 3.1 zeigt die Komplementaktivierung, gemessen an der detektierten C3a und sC5b-9 Konzentration. Man erkennt deutlich, dass zeitabhängig eine erhöhte Konzentration sowohl an C3a (Abbildung 3.1 (a)) als auch an sC5b-9 (Abbildung 3.1 (b)) gebildet wurde, wenn Liposomen in Lepirudin-Plasma ohne Zusatz inkubiert wurden. Die Kontrolle, bestehend aus reinem Lepirudin-Plasma ohne Liposomenzugabe, zeigte keinerlei Erhöhung (dunkelgelb). Zudem wurde gezeigt, dass die Aktivierung des Komplementsystems durch EDTA (grün), Compstatin (blau) und EGTA (grau) unterbunden werden konnte. Der C3 Inhibitor Compstatin unterband die Komplementaktivierung. Damit wurde gezeigt, dass dem C3 Protein eine entscheidende Rolle beim Voranschreiten der Komplementaktivierung oblag. Anhand der Zugabe von EGTA konnte dargestellt werden, dass die Aktivierung des Komplementsystems von Ca^{2+} abhängig war. Der einzige Weg der Komplementaktivierung, der unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration verläuft, ist der Alternative Weg. Aus diesem Grund kann dieser als möglicher Aktivierungsweg der Immunantwort ausgeschlossen werden. Sowohl der Klassische als auch der Lektin-Weg können involviert sein.

Insgesamt wurde gezeigt, dass neutrale Liposomen aus DMPC das Komplementsystem in der flüssigen Phase aktivieren. Das C3 Protein ist daran beteiligt, und der Alternative Weg kann ausgeschlossen werden. Durch die Verwendung von Immunoassays konnte noch keine spezifische Betrachtung der Interaktion auf der Lipidoberfläche aufgeklärt werden. Um weiter Aufschluss über den Mechanismus der Komplementaktivierung durch neutrale Lipidoberflächen zu erlangen, wurden im Folgenden SDS-PAGE Analysen mit anschließendem Immunoblotting und die Methode der Schwingquarzwage angewandt.

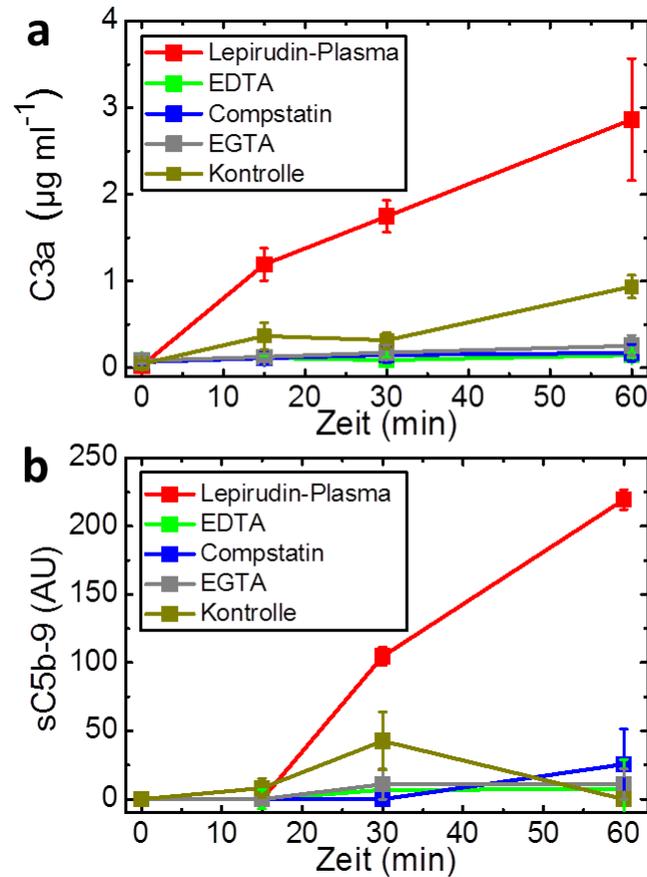


Abbildung 3.1: Liposomen induzierte Komplementaktivierungen, gemessen als C3a und sC5b-9 Konzentration mittels ELISA. Liposomen aus DMPC (Durchmesser ≈ 170 nm) wurden in Lepirudin-Plasma bis zu 60 min inkubiert (rot). Des Weiteren wurden Proben gemessen, bei denen vor der Liposomenzugabe EDTA (grün), Compstatin (blau) oder EGTA (grau) zugeführt wurden. EDTA dient als Kontrollexperiment, um jegliche Komplementaktivierung zu unterbinden, Compstatin, als Inhibitor von C3 zur Untersuchung der C3-Abhängigkeit, und EGTA, zur Untersuchung der Ca^{2+} -Abhängigkeit der Aktivierung. Reines Lepirudin-Plasma wurde als Kontrolle verwendet (dunkelgelb).

3.2 Planare Lipidoberflächen

Das folgende Unterkapitel beschäftigt sich mit der Untersuchung der Interaktion von C3 mit planaren Lipidoberflächen, wobei es um eine direkte und keine indirekte Messung durch die Detektion von Reaktionsprodukten des C3 geht. Es wird nicht mehr mit Lepirudin-Plasma gearbeitet, sondern mit einem aufgereinigten C3 Protein, um eindeutig die Auswirkungen der Lipidoberfläche auf dieses ohne weitere Faktoren untersuchen zu können. Dabei wird im ersten Abschnitt die Methode des Immunoblotverfahrens verwendet, um an Liposomen gebundenes C3 zu detektieren. Im Anschluss daran wird auf die Methode der Schwingquarzwage eingegangen, um zeitaufgelöst die C3-Interaktion mit planaren Lipidoberflächen quantitativ zu messen. Die dargebotene Liposomenoberfläche sowie planare Lipidoberflächen sollten zu einer ähnlichen Bindungseigenschaft des C3 führen. Annahme ist, dass das Protein im Vergleich zur Liposomenoberfläche klein ist. In dieser Arbeit werden Liposomen mit einem Durchmesser von 170 nm verwendet. Das C3 Molekül besitzt eine Größe von $9 \text{ nm} \times 7 \text{ nm} \times 15 \text{ nm}$ [146]. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass die Liposomenoberfläche als planare Lipidoberfläche betrachtet werden kann und keine Krümmung der Liposomen die Bindung des C3 Proteins beeinflusst.

3.2.1 Immunoblot

Zur Untersuchung der C3-Interaktion mit Liposomen wurden zuerst SDS-PAGE Analysen mit anschließendem Immunoblotting (Western Blot) eingesetzt und einzelne Bereiche (Epitope) des C3 Proteins auf der Liposomenoberfläche mit unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern detektiert. Dadurch wird die gebildete Konformation des gebundenen C3 aufgelöst.

Probenpräparation

Liposomen wurden wie in Unterkapitel 3.1 beschrieben hergestellt. C3 und Ko-Faktor H wurden nach Hammer et al. [147] von menschlichem Plasma und Serum gewonnen. Faktor I wurde nach Fearon [148] hergestellt. C3 wurde ohne Salz nach der Präparation bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Damit das Protein beim Auftauen nicht sofort aufgrund von sich bildenden Eiskristallen hydrolysiert wird und zudem wieder seine physiologischen Eigenschaften, d.h. Salzkonzentration, erlangte, musste das Protein beim Auftauen kurz auf $38 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt und danach mit fünffach konzentriertem PBS im Verhältnis 1:5 um-

gepuffert werden. Die Proteinkonzentration wurde durch eine Absorptionsmessung bestimmt. Dazu wurde das Lambert-Beersche Gesetz aus Gleichung 2.13 herangezogen. Eine Küvette mit einer freien Weglänge (= Probendicke) von $d = 3$ mm und die Absorption bei $\lambda = 280$ nm wurden zur Berechnung verwendet. Der Extinktionskoeffizient von C3 wurde zuvor durch die Protein-datenbank ExPASy bei $\lambda = 280$ nm zu $\epsilon(\lambda) = 180055 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ermittelt. Von dieser Stammlösung ausgehend wurde die Probe in PBS auf die gewünschte Konzentration für die Messung verdünnt und auf Eis gelagert. C3, monoklonale Antikörper gegen C3 (4SD17.3, 7D.236.2, 7D.398.1, 7D.9.2), Faktor I und Ko-Faktor H wurden vom Kooperationspartner zur Verfügung gestellt.

Durchführung der Experimente

Liposomen (1 mg ml^{-1}) wurden in $0,2 \text{ mg ml}^{-1}$ aufgereinigtem C3 für 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde Faktor I ($8 \mu\text{g ml}^{-1}$) mit Ko-Faktor H ($32 \mu\text{g ml}^{-1}$) zugegeben und für weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Diese Faktoren dienten dazu, aktiviertes C3 weiter aufzuspalten. Nur die aktive Form des C3 lässt eine Spaltung durch Faktor I in Kombination mit Ko-Faktor H zu. Erst dadurch können alle zu untersuchenden Bereiche des C3 Moleküls zugänglich gemacht werden. Die Proben wurden erhitzt und auf ein 10% SDS-PAGE aufgetragen und anschließend auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) transferiert. Nachdem die Membran mit 1% BSA gegenüber unspezifischen Bindungen blockiert worden war, wurde die Membran mit dem jeweiligen biotinylierten Antikörper inkubiert: einem polyklonalen C3c Antikörper (Dako), oder den monoklonalen Antikörpern 4SD17.3 zur Detektion des C3a (α_1), 7D.398.1 zur Detektion des 20 kDa Polypeptides von C3c (α_2), 7D.9.2 zur Detektion des C3d (α_4) und 7D.236.2 zur Detektion des 40 kDa Polypeptides von C3c (α_2) (vgl. Abbildung 3.2 (b)). Nach Waschung der Membran wurden die gebundenen Antikörper mit HRP-konjugiertem Streptavidin und Diaminobenzidin (DAB; Sigma-Aldrich) detektiert.

Ergebnisse

Abbildung 3.2 (a) zeigt einen Immunoblot zur Detektion und Charakterisierung des an Liposomen gebundenen C3. Dargestellt ist in Bande 1 die Kontrolle des nativen C3 (ohne Liposomenkontakt), bei welchem ausschließlich α - und β -Kette ohne weitere Aufspaltung mit einem polyklonalen C3c Antikörper detektiert werden konnten. Bande 2 zeigt das mit Liposomen in-

kubierte C3 unter Verwendung desselben Antikörpers, der zur Detektion des nativen C3 in Bande 1 verwendet wurde. Man erkennt deutlich, dass ein Konformationswandel stattfand, da mehrere Bindungsstellen für den polyklonalen Antikörper gefunden werden konnten.

Detailliertere Untersuchungen, um die genaue Konformation des gebundenen C3 zu analysieren, führen zur Verwendung monoklonaler Antikörper gegen unterschiedliche spezifische Bindungsstellen der α -Kette. Bande 3 – 6 zeigen das Ergebnis der Detektion der in Abbildung 3.2 (b) schematisch dargestellten Bindungsstellen (gelb): Bande 3 gegen C3a, Bande 4 gegen den 20 kDa-C3c Bereich, Bande 5 gegen C3d und Bande 6 gegen den 40 kDa-C3c Bereich. Anhand der monoklonalen Antikörper konnte die Konformation des gebundenen C3 Moleküls untersucht werden. Da alle Antikörper zum selben Bandenmuster führten, muss C3 in voller Länge gebunden worden sein. Zudem muss das Protein die Form des C3(H₂O) besitzen, da alle Epitope für die Antikörper zugänglich waren. Beim nativen C3 ist dies nicht der Fall. C3(H₂O) ist eine aktive Form des nativen C3, das die Komplementkaskade weiter antreibt.

Mit dieser Methode konnte qualitativ die Bindung des C3 an Lipidoberflächen nachgewiesen und die Konformation des C3 Moleküls untersucht werden. Als C3(H₂O) liegt das gebundene C3 in einer aktiven Form auf der Oberfläche vor, das die Komplementkaskade weiter vorantreiben kann. Da mit dieser Methode keine quantitative Analyse der Interaktion erhalten werden konnte, wurde als nächster Schritt die Methode der Schwingquarzwage verwendet.

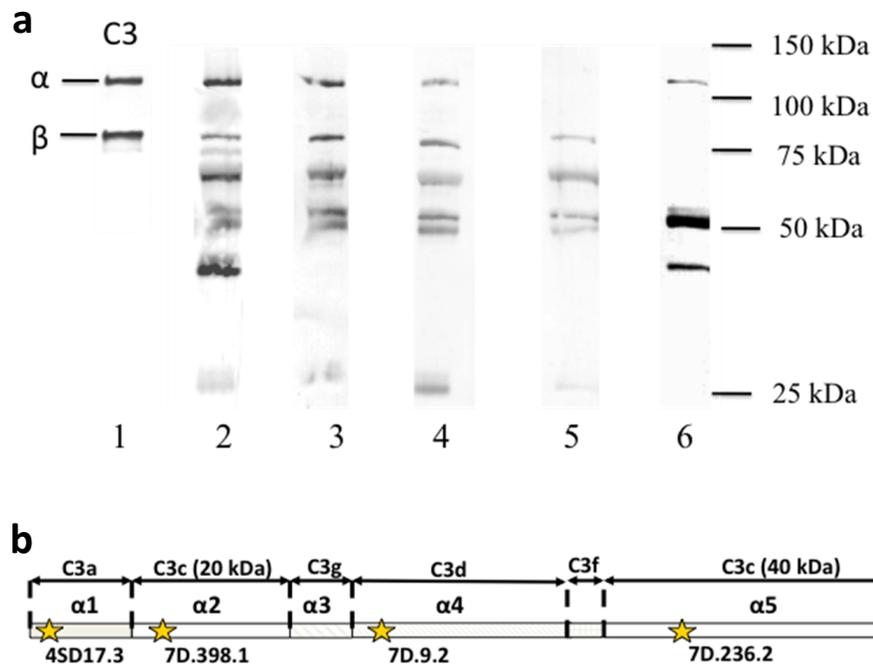


Abbildung 3.2: Immunoblot zur Charakterisierung des an Liposomen gebundenen C3. Unterschiedliche monoklonale Antikörper wurden zur Detektion verwendet, um die Bindung und die Konformation von C3 an Liposomenoberflächen zu untersuchen. (a) Bande 1: natives C3; Bande 2: C3 inkubiert mit Liposomen, jeweils mit polyklonalem Anti-C3c; Bande 3: Anti-C3a; Bande 4: Anti-C3c (20 kDa Bereich); Bande 5: Anti-C3d; Bande 6: Anti-C3c (40 kDa-Bereich). (b) Schematische Darstellung der Antikörperbindungsstellen (gelb) an der α -Kette des C3.

3.2.2 Schwingquarzwaage

Zur quantitativen und gleichzeitig zeitaufgelösten Untersuchung des Bindungsverhaltens von C3 an planare Lipidoberflächen wurden Messungen mit der Schwingquarzwaage durchgeführt.

Probenpräparation

Zur Herstellung einer planaren Lipidschicht wurden Liposomen verwendet, die durch Aufplatzen auf der SiO₂-Sensoroberfläche eine Lipiddoppelschicht bildeten. Liposomen- und Proteinpräparation wurden in Unterkapitel 3.1 und Abschnitt 3.2.1 dargestellt. Allerdings wurden hierfür die Liposomen mit einem 50 nm Filter extrudiert, die somit einen Durchmesser von $d = 70 \pm 5$ nm besaßen.

Durchführung der Messung

Für die Messungen wurde eine Schwingquarzwaage QCM-D 300 (Q-Sense, Göteborg, Schweden) sowie ein Sensor mit reiner SiO₂-Oberfläche (Q-Sense) verwendet. Dieser wurde (trocken) in die Messzelle eingebaut. Danach wurde die Temperatur auf 37,0 °C eingestellt und das System 30 min equilibriert. Jede verwendete Flüssigkeit wurde vorher im Wärmebad erwärmt und blasenfrei zugegeben.

Lipidschicht: Eine Liposomenlösung (0,1 mg ml⁻¹; Durchmesser 70 ± 5 nm) wurde in die Messzelle gegeben und die Ausbildung der Lipiddoppelschicht zeitaufgelöst beobachtet. Im Anschluss wurden überschüssige Liposomen von der Oberfläche mit Puffer abgewaschen. Dadurch wurde die Lipidschicht gleichzeitig auf Stabilität getestet.

Proteinzugabe: Durch Zugabe von C3 (200 µg ml⁻¹) konnte die Proteinbindung an die Lipidoberfläche zeitaufgelöst beobachtet werden. Die Oberfläche wurde nach der Proteinzugabe mit Puffer gewaschen, um eine Bindung des Proteins und nicht nur reine Absorption zu garantieren.

Datenverarbeitung: In dieser Arbeit wurde die Frequenzverschiebung Δf_n der fünften Obertonschwingung ($n = 5$; $\Delta f = 25$ Hz) für alle Messungen analysiert. Mit Gleichung 2.89 wurden diese in eine Massenänderung umgerechnet. QSoft 301 (Q-Sense) wurde zur Datenauswertung herangezogen.

Reinigung: Nach jeder Messung müssen Messzelle sowie Zu- und Abfuhrschläuche gereinigt werden. Dazu wird das System mit 10 ml einer 0,1 M SDS-Lösung gespült und im Anschluss für 30 min mit dieser Lösung inkubiert. Derselbe Vorgang wird mit H₂O und mit C₂H₆O wiederholt. Die Reinigung wird ebenso für die direkte Verbindung zwischen Ein- und Auslass, ohne Weg durch die Messzelle, durchgeführt. Im Anschluss wird mit Stickstoff (N₂) getrocknet. Der verwendete Sensorchip wird nach der Reinigung in der Messzelle über Nacht in eine 2%-ige Hellmanex (Hellma) Lösung gelegt. Vor der nächsten Messung wird der Sensor mit H₂O und C₂H₆O gereinigt, für 30 min in Piranha Lösung (3:1 Schwefelsäure (H₂SO₄), 30% Wasserstoffperoxid (H₂O₂)) inkubiert, mit H₂O und C₂H₆O abgespült und mit N₂ getrocknet.

Ergebnisse

Abbildung 3.3 zeigt die Ausbildung einer planaren Lipiddoppelschicht. Aufgezeichnet wurde sowohl die Frequenzverschiebung Δf (schwarz) als auch die Dämpfung (grau) in Abhängigkeit von der Messzeit. Nach Equilibrierung der Messkammer wurden Liposomen zugegeben (schwarzer Pfeil bei 21 min), die sich auf der Oberfläche anlagerten: die Frequenz verschob sich aufgrund des Massenzuwachses; die Dämpfung erhöhte sich aufgrund der höheren Viskoelastizität der aufgelagerten, pufferbefüllten Liposomen. Um die Ausbildung von Lipidschichten zu gewährleisten, ist die zugegebene Liposomenkonzentration von großer Bedeutung. Bei einer zu hohen Konzentration bilden sich keine Lipidschichten aus, da die Packungsdichte zu groß ist und die Liposomen nicht aufplatzen können. Im Beispiel erkennt man nach wenigen Minuten deutlich das Aufplatzen der Liposomen zur Lipidschicht auf der SiO₂-Oberfläche: Frequenzverschiebung sowie Dämpfung nahmen ab. Durch die Zugabe von Puffer 15 min nach der Liposomenzugabe (schwarzer Pfeil bei 35 min) veränderte sich weder die Frequenzverschiebung noch die Dämpfung. Dies lässt auf eine stabil ausgeformte Lipidschicht auf der SiO₂-Oberfläche schließen. Mit der Sauerbrey-Gleichung (Gleichung 2.88) ergab sich ein Massenzuwachs von

$$\Delta m = -\frac{C\Delta f}{n} = 440 \text{ ng cm}^{-2}. \quad (3.1)$$

In diesem Versuch wurden DMPC-Phospholipide verwendet, die eine molare Masse von 677 g mol⁻¹ besitzen. Umgerechnet ergab dies

$$440 \text{ ng cm}^{-2} : 677 \cdot 10^{-9} \text{ ng mol}^{-1} \cdot 6,233 \cdot 10^{23} = 4 \cdot 10^{14} \text{ Lipide cm}^{-2}. \quad (3.2)$$

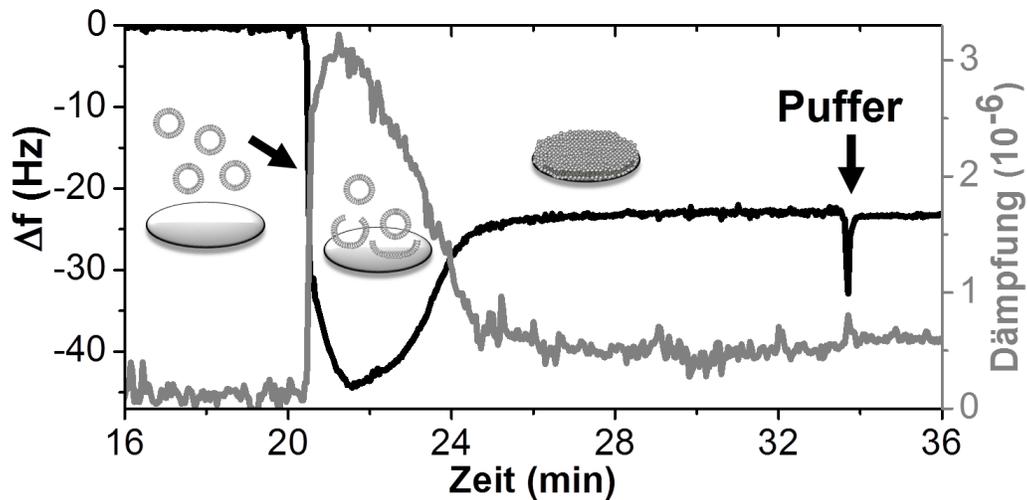


Abbildung 3.3: Beobachtung der Ausbildung einer Lipiddoppelschicht mittels Schwingquarzzaage. Frequenzverschiebung Δf (schwarz) und Dämpfung (grau) wurden gleichzeitig aufgezeichnet. Nach Equilibrierung des Systems wurden Liposomen zugegeben, die sich auf dem Sensor anlagerten, aufplatzten und eine Lipiddoppelschicht bildeten. Durch Zugabe von Puffer wurden überschüssige Liposomen entfernt und die Stabilität der Schicht getestet.

Dies entspricht einer Lipidanzahl von vier Lipiden pro nm^2 . Geht man von einer Kopfgruppengröße von ungefähr $0,7 \text{ nm}^2$ aus, ergibt sich mit diesen Berechnungen eine Lipiddoppelschicht auf der Sensoroberfläche.

Nachdem die Lipidoberfläche charakterisiert wurde, konnte das Bindungsverhalten von C3 an diese untersucht werden, wie in Abbildung 3.4 gezeigt wird. C3 wurde in einer Konzentration von $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ in PBS zugegeben (100 min; schwarzer Pfeil). Es war wichtig, dass derselbe Puffer während der gesamten Messung verwendet wurde, um Artefakte ausschließen zu können. Man erkennt deutlich eine Verschiebung der Frequenz nach Zugabe des Proteins, welche mit einer Massenzunahme gleichzusetzen ist. Ferner nahm die Dämpfung zu, das mit einer erhöhten Viskoelastizität einhergeht. Auf der Oberfläche entstanden durch die Proteine Kavitäten, die Wasser beinhalten bzw. flexibler und beweglicher waren als die 'starre' Lipiddoppelschicht. Mit Puffer (115 min; schwarzer Pfeil) wurde überschüssiges Protein entfernt. Sowohl Frequenzverschiebung als auch Dämpfung blieben jedoch konstant.

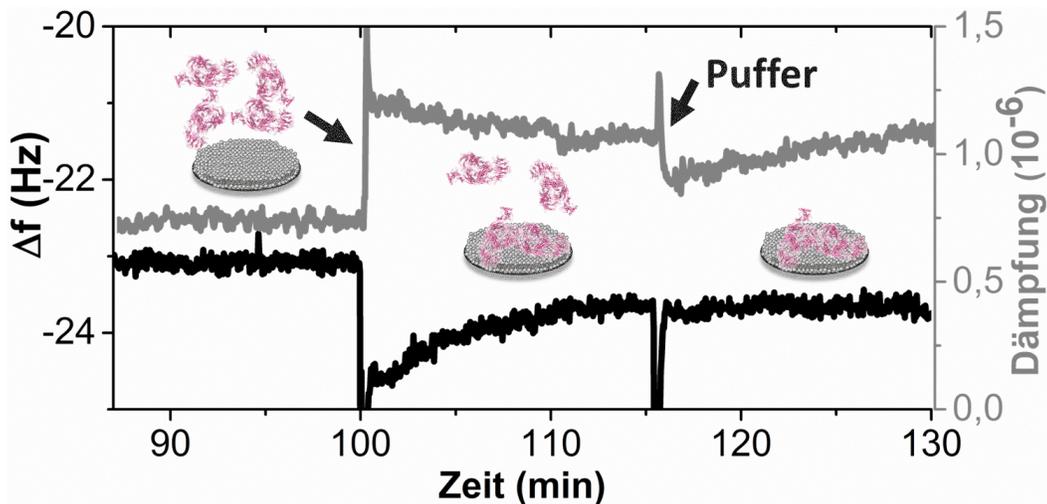


Abbildung 3.4: Bindungsverhalten von C3 an planare Lipidoberflächen. Nach Zugabe von C3 (100 min; schwarzer Pfeil) band das Molekül an die Oberfläche. Durch Spülen mit Puffer (115 min; schwarzer Pfeil) wurde überschüssiges C3 entfernt.

Betrachtet man die erhaltenen Ergebnisse quantitativ, berechnet sich die Dichte an aufgelagertem C3 zu 22 ng cm^{-2} . Eine Berechnung der Gesamtanzahl an C3 Molekülen pro cm^2 , die eine molekulare Masse von 187 kDa ($= 1,87 \cdot 10^5 \text{ g mol}^{-1}$) haben, ergibt eine Anzahl von $7,7 \cdot 10^{10}$ Molekülen pro cm^2 . Geht man von $9 \text{ nm} \times 7 \text{ nm} \times 15 \text{ nm}$ als Größe eines Moleküls aus [69], bedeckt dies eine Fläche von $1,8 - 4,2 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2$, je nach Proteinorientierung auf der Oberfläche. Dies führt zu einem theoretischen Wert an gebundenem Protein von $55,6 - 23,7 \cdot 10^{10}$ Molekülen pro cm^2 . Mit diesen Überlegungen gelangt man zu einer Abschätzung einer 15–30%-igen Oberflächenbedeckung durch das C3 Molekül. Damit wurde nicht nur das vorausgehende Experiment mit Immunoblotting bestätigt, dass C3 auf DMPC-Lipidoberflächen bindet; zudem konnte eine quantitative und zeitaufgelöste Analyse des Bindungsverhaltens von C3 durchgeführt werden.

Um weiter die Konformation der gebundenen C3 Moleküle zu untersuchen, wurden Ko-Faktor H und Faktor I sukzessive, mit Pufferspülungen als Zwischenschritte, zugegeben. Abbildung 3.5 zeigt das Ergebnis dieser Unter-

suchung. Man erkennt deutlich, dass die Zugabe von Ko-Faktor H zu einer Frequenzverschiebung durch Massenzuwachs führte, die trotz Zugabe von Puffer stabil erhalten blieb. Ebenso zeigt sich ein Zuwachs in der Dämpfung, d.h., eine erhöhte Viskoelastizität. Die weitere Zugabe von Faktor I führt zu einer Massenabnahme und ist ebenso als Rückgang der Dämpfung zu beobachten. Dies bedeutet, dass eine Konformationsänderung des gebundenen C3 Proteins hervorgerufen worden war, die eine Bindung des Ko-Faktor H an dieses ermöglichte, und für Faktor I eine Schnittmöglichkeit eröffnete. Nur an C3 in der aktiven Form des C3(H₂O) konnte Ko-Faktor H gebunden werden und für Faktor I eine Schnittmöglichkeit am C3 Molekül dargeboten werden. Durch diese Messungen konnte damit nicht nur die Bindung des C3 Proteins an die Lipidoberfläche quantifiziert, sondern ebenso die hervorgerufene Konformationsänderung bestätigt werden.

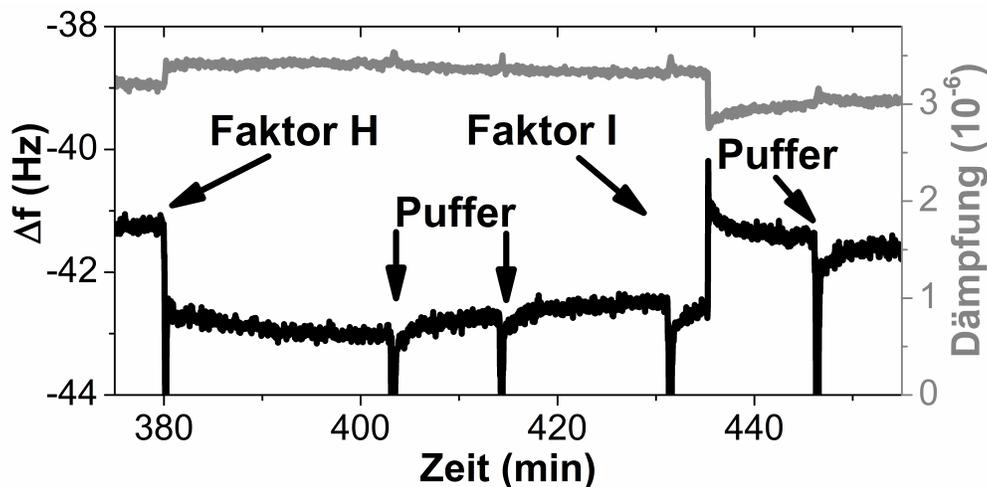


Abbildung 3.5: Untersuchung der Konformation von gebundenem C3. Nach Zugabe von Ko-Faktor H band dieser an die C3-Lipidoberfläche. Mit Puffer wurde überschüssiger Ko-Faktor H entfernt. Durch Zugabe von Faktor I wurde eine Massenabnahme detektiert.

In diesem Unterkapitel konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung der Schwingquarzwaage eine quantitative und zeitaufgelöste Analyse der C3 Interaktion mit planaren Lipidoberflächen möglich war. Dadurch konnte eine Bedeckung der Oberfläche mit 30% C3 berechnet werden. Zudem konnte die Konformationsänderung des nativen C3 zur aktiven Form des C3(H₂O) durch die Zugabe von Faktor I und Ko-Faktor H bestätigt werden, da diese nur einen Einfluss auf eine aktivierte Form des C3 haben. Auf diese Weise konnten die Ergebnisse der Immunoblotanalysen bekräftigt werden, unter der Annahme, dass Liposomen mit großem Durchmesser (170 nm) ähnliche Bindungseigenschaften für das C3 Protein liefern wie planare Oberflächen.

3.3 Stark gekrümmte Lipidoberflächen

Die vorgestellten Untersuchungen in Unterkapitel 3.1 konnten eine Komplementaktivierung anhand der Produkte C3a und sC5b-9 aufzeigen. Die Bindung des C3 an planare Lipidoberflächen und dessen Konformationsänderung zur Form C3(H₂O) wurde ebenfalls in Unterkapitel 3.2 belegt. Im Folgenden sollen, ergänzend zu planaren Lipidoberflächen, stark gekrümmte Lipidoberflächen betrachtet werden. Allerdings musste hierfür zuerst eine geeignete Messmethode gefunden werden. Vorüberlegungen dazu sollen erläutert werden, bevor Vorgehen und Ergebnisse dargestellt werden.

Vorüberlegungen

Zur Aufklärung der Proteinbindung an Nanopartikel ist die Methode der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) seit mehreren Jahren etabliert und stellt ein sensitives Verfahren zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten dar [79,81]. Um mit FCS eine Interaktion zweier Bindungspartner messen zu können, muss allerdings einer der beiden fluoreszent markiert werden. Zur Anwendung bei der Untersuchung der Interaktion von stark gekrümmten Lipidoberflächen mit dem C3 Protein bedeutet dies, dass entweder die Lipidoberfläche oder das Protein mit einem Fluorophor markiert werden muss. Da das C3 Protein, aufgrund der Gefahr der Hydrolyse während des Markierungsprozesses, nicht markiert werden sollte, kann nur die Lipidoberfläche markiert werden. Eine Möglichkeit eines Membranmodells gekrümmter Lipidoberflächen stellen Liposomen dar. Herausforderung ist allerdings, dass Liposomen eine Standardabweichung im Radius von ± 5 nm besitzen. Die Methode der FCS ist sehr sensitiv im Hinblick auf den gemessenen Radius der fluoreszierenden Partikel, sodass sich eine Analyse der Proteinbindung bei solchen Standardabweichungen im Radius schwierig gestaltet. Da die Methode der FCS allerdings als zielführend erschien, wurde mit diesen Vorüberlegungen eine neuartige Methodenkombination vorgeschlagen: Quantenpunkte sollten als fester Kern einer Lipidoberfläche verwendet werden und das Messsignal liefern. Die Abweichung im Radius ist dadurch sehr gering, und das Protein kann ohne Modifizierung durch einen Farbstoff verwendet werden. Lipidquantenpunkte sind bereits aus der Literatur bekannt, und in Kombination mit der Methode der FCS wurden bereits deren Größe abhängig von verschiedenen Liganden untersucht [149]. Ein Ansatz, Lipidquantenpunkte in Kombination mit FCS zur Untersuchung von Bindungsereignissen zu verwenden, wurde jedoch noch nicht verfolgt. Ein weiterer Vor-

teil an der Methode ist, dass die Fluoreszenzmarkierung ebenso nicht an der Interaktionsfläche stattfindet und einen störenden Einfluss ausüben kann. Somit ist es möglich, eine unbeeinflusste Interaktion zwischen C3 und der Lipidoberfläche zu untersuchen. Um zudem keine Referenzprobe für die Messungen zu benötigen, wird auf die Methode der 2fFCS mit externer Referenzprobe zurückgegriffen und ein genaueres Ergebnis der Größenbestimmung dieser erzielt.

Im Folgenden werden Herstellung, Charakterisierung und Ergebnisse des Charakterisierungsprozesses der Lipidquantenpunkte erläutert. Im Anschluss werden die Bindungsstudien von C3 an Lipidquantenpunkte vorgestellt. Als Vergleichsuntersuchung werden Messungen an Quantenpunkten derselben Materialkombination (Cadmiumselenid/Zinksulfid) angeführt, die einen DHLA-Liganden (Dihydroliponsäure) auf der Oberfläche tragen. Dadurch konnte erst die Bindung von C3 an die Lipidquantenpunkte vollständig aufgeklärt werden und zusätzlich der Einfluss der Lipidbeschichtung auf die Bindungsaffinitäten genauer untersucht werden. Die Messungen mit DHLA-Quantenpunkten wurden gemeinsam mit Pauline Maffre, Angewandte Physik, KIT, das Anbringen der DHLA-Liganden an die Quantenpunkt-oberfläche von Dr. Li Shang, Angewandte Physik, KIT, durchgeführt. Um einen weiteren Vergleich von Bindungsaffinitäten an stark gekrümmte Lipidoberflächen und DHLA-Quantenpunkte zu erhalten, werden Bindungsstudien mit menschlichem Serumalbumin (*human serum albumin*; HSA; Sigma-Aldrich), menschlichem Serum, (Sigma-Aldrich) und des Weiteren mit Apolipoprotein E3 (ApoE3; Sigma-Aldrich) angeführt. Die Charakterisierung der DHLA-Quantenpunkte wurden von Dr. Stefan Brandholt [150] und ebenso von Treuel et al. [151] bereits dargestellt. Ein Vergleich aller Bindungsmessungen, sowohl in Bezug auf die beiden verwendeten Nanopartikel, als auch in Bezug auf die verwendeten Proteine, schließt dieses Unterkapitel ab.

3.3.1 Lipidquantenpunkte als Membranmodell

In Hinblick auf die Lipidquantenpunkte ist neben der Anbringung der Lipidhülle deren Charakterisierung von Bedeutung. Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit Quantenpunkten aus Cadmiumselenid und Zinksulfid durchgeführt. Bis auf die Charakterisierung mittels TEM wurden kommerzielle Quantenpunkte verwendet (CdSe/ZnS; Qdot 605 ITK Organic Quantum Dots; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Für TEM-Studien wurden Quantenpunkte von Dr. Li Shang synthetisiert. Als Lipidhülle wurden Lysophospholipide mit Phosphocholin-Kopfgruppe angebracht. Dies wird im Folgenden erläutert.

Herstellung von Lipidquantenpunkten

Vorbereitung der Quantenpunkte: Die Quantenpunkte wurden in einer Decanlösung geliefert. Um für das Anbringen der Lipidschicht die Quantenpunkte in das dafür besser geeignete organische Lösungsmittel Chloroform (CHCl_3 ; VWR, Karlsruhe, Deutschland) zu überführen, musste dieses durch eine Fällung mit Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$; Sigma-Aldrich) ersetzt werden. Dazu wurde die gewünschte Menge an Quantenpunkten mit $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ zu einem Volumen von 1 ml ergänzt, gemischt und für 10 min bei 12000 g zentrifugiert. Das $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ wurde entfernt und CHCl_3 hinzugegeben.

Anbringen der Lipidschicht: Das Anbringen der Lipidschicht basiert auf einer hydrophoben Wechselwirkung zwischen den Fettsäureketten der Lysophospholipide und der Quantenpunktoberfläche. Zuerst wurde die Anzahl der Lipide berechnet, die nötig ist, um die Quantenpunkte vollständig mit einer Monoschicht zu bedecken. Dazu wurde die Fläche abgeschätzt, die pro gebundener Fettsäurekette auf dem Quantenpunkt benötigt wird. Um die Lipide auf die Quantenpunkte zu drücken, wurde ein 50-facher Überschuss an Lipid verwendet. Lysophosphocholin (MHPC, Myristoyl-hydroxylphosphatidylcholine; Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) wurden in einer 20 mM Stammlösung in Methanol (CH_4O ; Sigma-Aldrich) und CHCl_3 im Verhältnis 20:1 gelagert ($-24\text{ }^\circ\text{C}$). Stearinsäure (SA) wurde als 90 mM Stammlösung in CHCl_3 aufbewahrt. Vor jeder Funktionalisierung wurden alle Komponenten für 30 min bei Raumtemperatur equilibriert. Vor und nach dem Mischen der Komponenten wurden diese für 20 s in das Ultraschallbad gestellt und umgehend danach weiterverarbeitet. Abbildung 3.6 zeigt eine Übersicht des Herstellungsprozesses. Die Komponenten wurden ge-

mischt, mit CHCl_3 zu 1 ml ergänzt und tröpfchenweise ($20 \mu\text{l}$ Schritte) in 2 ml H_2O zugegeben. Während der gesamten Zeit wurde die Lösung mit einem Magnetrührer auf höchster Stufe gemischt. Innerhalb von 45 – 50 min wurden durch Erhitzen ($85 \text{ }^\circ\text{C}$) im darauffolgenden Schritt die organischen Lösungsmittel aus dem Wasser verdampft und die nun lipidumhüllten Quantenpunkte vollständig in die wässrige Phase überführt. Aus diesem Grund musste bei kommerziellen Quantenpunkten das Lösungsmittel getauscht werden, damit deren vollständiges Entfernen gewährleistet war. Die Probe wurde für 90 min in das Ultraschallbad gestellt und im Anschluss für 3 min bei 8000 rpm zentrifugiert, um Aggregate zu entfernen. Überschüssige Lipide bzw. Lipid-Mizellen ohne Quantenpunktkern konnten durch Zentrifugation in einer 30%-igen Saccharose-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) entfernt werden. Die Lipidquantenpunkt-Lösung wurde vorsichtig auf die Saccharose-Lösung aufgetragen und für 30 min bei 25000 rpm zentrifugiert. Unter UV-Beleuchtung war ein scharf getrenntes Fluoreszenzband zu sehen, das die aufgereinigten Lipidquantenpunkte darstellte und leicht mit einer Spritze entnommen werden konnte. Um die Saccharose vollständig zu entfernen, wurden mehrere Zentrifugationszyklen (je 15 min, 14000 rpm) durchgeführt, bei denen die Lipidquantenpunkte mit H_2O gereinigt wurden (Nanosep 10k OMEGA, Pall Life Science, Ann Arbor, MI, USA).

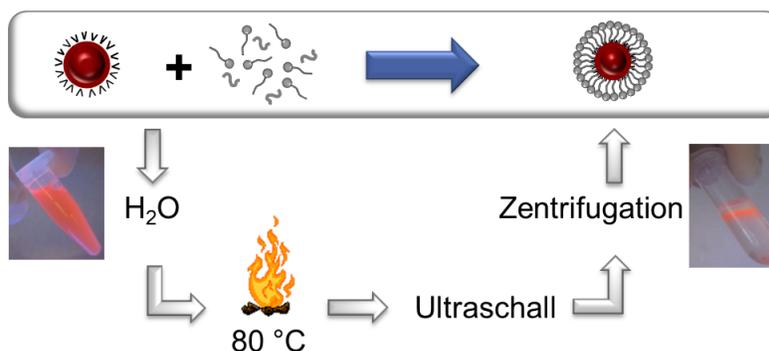


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Herstellung von Lipidquantenpunkten. Lipide, gelöst in organischem Lösungsmittel, werden in Wasser zugegeben und durch Erhitzen in die wässrige Phase überführt. Nach einer Ultraschallbehandlung folgt eine Zentrifugation in 30%-iger Saccharose, um überschüssiges Lipid zu entfernen. Unter UV-Beleuchtung kann deutlich ein Fluoreszenzband, das den aufgereinigten Lipidquantenpunkten entspricht, der Saccharose-Lösung entnommen werden.

Methoden zur Charakterisierung der Lipidquantenpunkte

Zur Charakterisierung der Lipidquantenpunkte wurden mehrere Methoden angewandt, um einen größtmöglichen Informationsgehalt über die präparierten Lipid-Nanoteilchen zu erhalten.

Absorptions- und Fluoreszenzspektren: Absorptionsspektren wurden mittels eines UV/Vis Spektrophotometer (Cary 100, Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) in einer Quarz-Küvette (Hellma) mit einer optischen Weglänge von $d = 3$ mm vermessen. Emissions- und Anregungsspektren wurden mit einem Fluorolog-3- Spectrofluorometer (Horiba Jobin Yvon, Kyoto, Japan) in derselben Küvette aufgezeichnet. Die Emissionswellenlänge wurde für eine Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm bestimmt.

Lichtstreuung: Mit einem Zetasizer Nano-ZS (Malvern) wurde neben der Dynamischen ebenso die Elektrophoretische Lichtstreuung vermessen und Radius sowie ζ -Potential bestimmt. Für die DLS Messungen wurde die Lipidquantenpunktlösung 1:6 mit H_2O verdünnt, in eine Quarzküvette gegeben und die Lichtstreuung im Winkel von 173° aufgezeichnet. Es wurden jeweils fünf Messungen durchgeführt und Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Das ζ -Potential wurde in einer speziellen ζ -Potentialmessküvette (Malvern) untersucht, die Probe mit Wasser 1:20 verdünnt und die Lichtstreuung im Winkel von 73° detektiert.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM): Die Untersuchung mittels TEM wurden durch den Kooperationspartner Simon Hettler, Laboratorium für Elektronenmikroskopie, KIT, durchgeführt. Dabei wurden von Dr. Li Shang hergestellte CdSe/ZnS Quantenpunkte ähnlicher Größe verwendet. Die Aufnahmen wurden an einem CM 200 FEG/ST (Philips, Amsterdam, Niederlande) TEM aufgezeichnet, das mit einer 4k CCD Kamera (Tietz Video and Image Processing Systems, Gauting, Deutschland) ausgestattet ist. Um die Lipidhülle sichtbar zu machen, wurde 1% Osmium (OsO_4 ; Osmium (VIII) oxide, 4% aq. soln., Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland) zur Probe hinzugegeben, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, und 1:1 mit H_2O verdünnt. Zur Herstellung der TEM Proben wurde $5 \mu\text{l}$ Lösung auf einen löchrigen Kohlenstofffilm (Ted Pella Inc., Redding, CA, USA) aufgetragen. Mit ImageJ 1.42h (Wayne Rasband, NIH, USA) wurde der Radius der (Lipid)Quantenpunkte durch Kreise um die aufgenommenen Partikel und damit der Berechnung des Radius analysiert.

Ergebnisse zur Charakterisierung der Lipidquantenpunkte

Die Ergebnisse der Charakterisierung der Lipidquantenpunkte werden nun vorgestellt, beginnend bei den Absorptions- und Fluoreszenzmessungen, der Lichtstreuung bis hin zur Untersuchung mittels TEM.

Absorptions- und Fluoreszenzspektren: Das Absorptionsspektrum zeigt eine abnehmende Absorptionsfähigkeit zu größeren Wellenlängen (Abbildung 3.7 (a); (blau)). Bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm zeigt sich ein deutliches Emissionsmaximum bei $\lambda_{\text{em}} = 605$ nm (rot) mit einer Halbwertsbreite von 26 nm. Dies deutet auf eine schmale Größenverteilung der Quantenpunkte hin. Abbildung 3.7 (b) zeigt eine Lipidquantenpunktlösung bei Tageslicht (links) und unter UV-Beleuchtung (rechts).

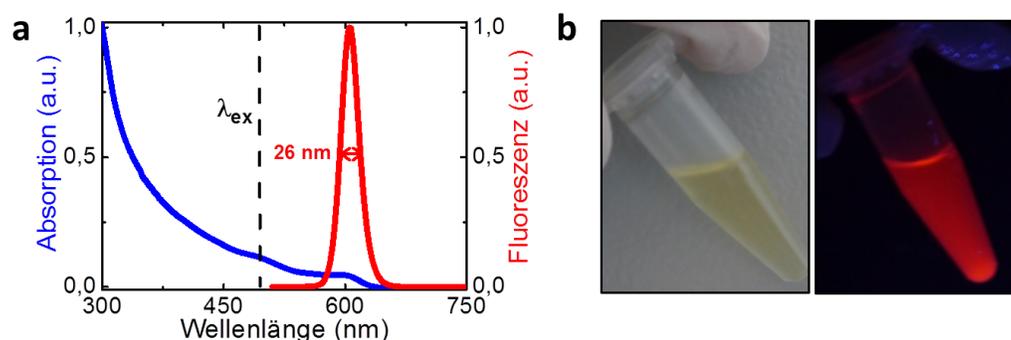


Abbildung 3.7: Charakterisierung der Lipidquantenpunkte. (a) Absorptions- (blau) und Emissionsspektren (rot) in Wasser. Das Emissionsspektrum mit einer Halbwertsbreite von 26 nm, wurde bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm aufgezeichnet. (b) Lipidquantenpunktlösung bei Tageslicht (links) und unter UV-Beleuchtung (rechts).

Lichtstreuung: Die Größe der (Lipid)Quantenpunkte konnten mit Dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt werden. Für reine Quantenpunkte in n-Tetradecan ergab sich ein Radius von $R = 3,9 \pm 0,2$ nm und für Lipidquantenpunkte von $R = 6,8 \pm 0,9$ nm. Das ζ -Potential für Lipidquantenpunkte wurde mit Elektrophoretischer Lichtstreuung zu $\zeta = -9,3 \pm 0,5$ mV bestimmt.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM): Durch TEM Untersuchungen konnte die Kristallstruktur und die Größe der Lipidquantenpunkte sowie ihrer Lipidhülle sichtbar gemacht werden. Abbildung 3.8 zeigt Lipidquantenpunkte ohne (a) und mit (b) Osmiumeinfärbung zur Markierung der Lipide. Betrachtet man den durchschnittlichen Radius der Lipidquantenpunkte, ist dieser ohne Osmium $r = 2,6 \pm 0,4$ nm (Abbildung 3.8 (c)) und mit Osmium $r = 3,1 \pm 0,5$ nm (Abbildung 3.8 (d)). Betrachtet man die Kristallstruktur, muss bei einer genaueren Auswertung der Gitterabstände beachtet werden, dass sich der Quantenpunkt aus verschiedenen Halbleitermaterialien zusammensetzt: der Kern aus CdSe, die Hülle aus ZnS. Durch eine einfache Analyse konnte der Gitterabstände im reziproken Raum zu $\approx 0,2$ nm bestimmt werden.

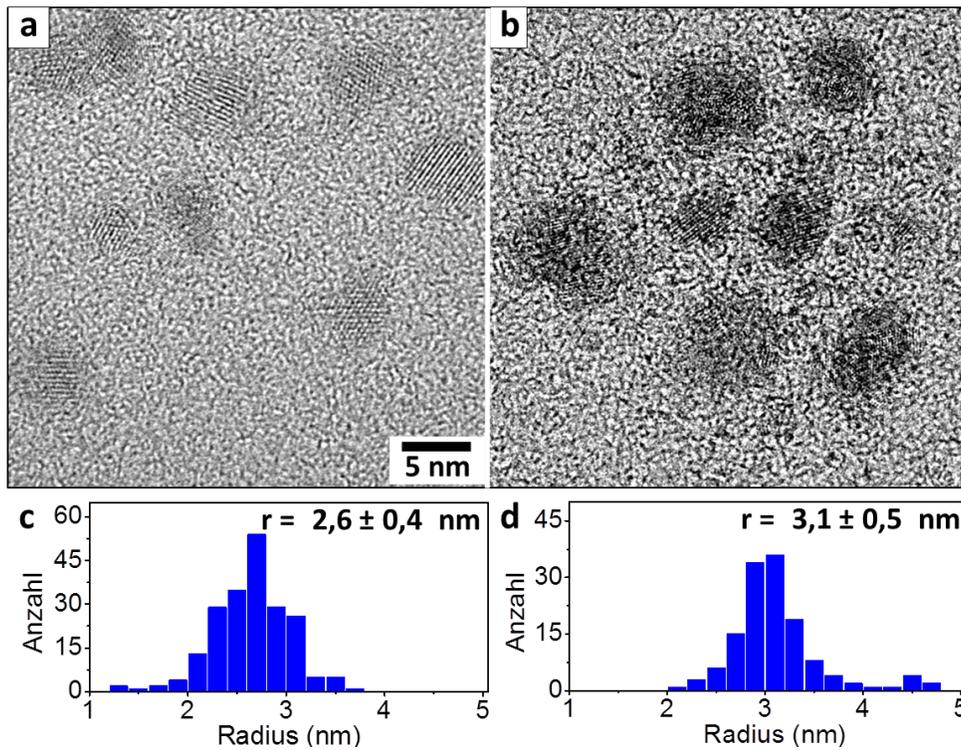


Abbildung 3.8: Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) von Lipidquantenpunkten ohne (a) und mit (b) Zugabe von Osmium. (c) und (d) zeigen die zugehörigen Histogramme der gemessenen Radien r .

3.3.2 Interaktionsmessungen mit 2fFCS

Durch 2fFCS konnten die Lipidquantenpunkte hinsichtlich ihrer Größe untersucht und ebenso die Bindungsmessungen der verschiedenen Proteine an Lipid- und DHLA-Quantenpunkten durchgeführt werden. Die Methode, Messaufbau, Probenpräparation, und Optimierung der Messparameter werden in diesem Abschnitt erläutert. Im Anschluss werden die Bindungsstudien und dazu erhaltenen Ergebnisse vorgestellt.

Messaufbau

Für die Messungen wurde eine Messapparatur (MicroTime 200, PicoQuant, Berlin, Deutschland), bestehend aus einem inversen Mikroskop IX71 (Olympus, Hamburg, Deutschland) mit zwei senkrecht zueinander polarisierten, gepulsten Diodenlasern LDH-D-C-485 (PicoQuant) mit einer Anregungswellenlänge von 485 nm verwendet. Um die Laserleistung bestimmen zu können, wird direkt ein Teil des Anregungslichtes in eine Photodiode geleitet. Für die Bestimmung der z-Position der Probe wird zurückreflektiertes Licht von der Probe in eine CCD Kamera gerichtet und dann über einen xyz-Piezo gesteuert. Die Diodenlaser wurden mit einem PDL 828 L Sepia II Laser Driver (PicoQuant) synchronisiert.

Abbildung 3.9 stellt schematisch den Messaufbau dar. Um parallele Laserstrahlung zu erzielen, wird der Strahl (blau) durch zwei Linsen kollimiert, bevor er durch einen dichroitischen Spiegel (470/635 nm, AHF, Tübingen, Deutschland/Chroma, Bellows Falls, Vermont, USA) auf ein Nomarski-Prisma (U-DICTHC, Olympus) trifft, um die senkrecht zueinander polarisierten Laserstrahlen in zwei räumlich getrennte Foki aufzuteilen. Das Anregungslicht trifft auf das Wasserimmersionsobjektiv UPLSAPO (60XW, 60x/1.2W, Olympus) und wird auf die Probe mit einer damit festen radialen Ausdehnung gelenkt. In den erzeugten konfokalen Volumen (gestrichelte Ellipsoide) werden die Fluoreszenzfluktuationen der Probe getrennt gemessen. Die erhaltenen Signale in Fokus 1 und Fokus 2 sind zeitlich versetzt und können dadurch aufgelöst werden. Das Emissionslicht (rot) gelangt gesammelt durch das Objektiv zurück, durch den dichroitischen Spiegel, der nur Emissionslicht durchlässt, wodurch eine erste Trennung von Anregungs- und Emissionslicht zustande kommt. Das emittierte Licht wird durch einen Langpassfilter von 545 nm (AHF) gelenkt und dadurch Anregungslicht aus dem Strahlengang gefiltert. Das Emissionslicht - durch eine weitere Linse fokussiert - gelangt auf eine Lochblende mit einem Durchmesser von 100 μm (Thorlabs, New-

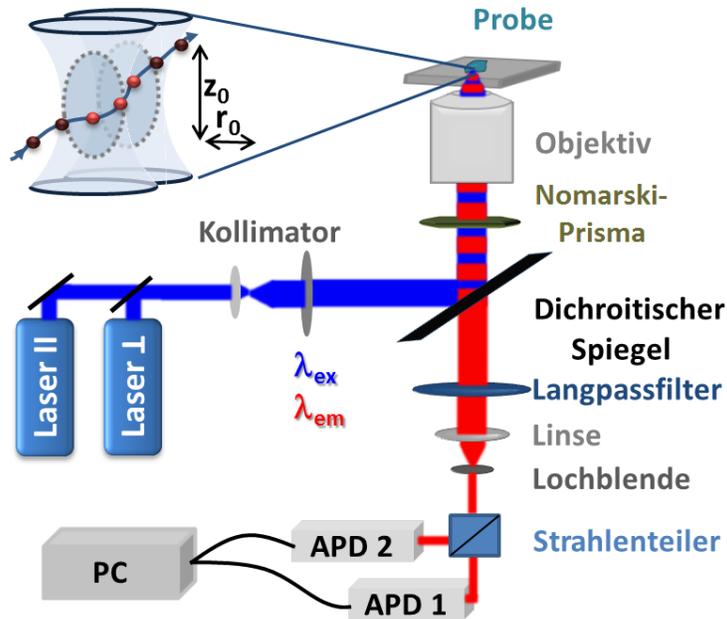


Abbildung 3.9: Aufbau eines Mikroskops zur Zwei-Fokus-Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (2fFCS). Das Laserlicht (blau) wird kollimiert, gelangt über einen dichroitischen Spiegel, über ein Prisma, durch ein Objektiv fokussiert auf die Probe. Fluoreszenzfluktuationen in den beiden kleinen konfokalen Volumina (gestrichelte Ellipsoide) werden aufgezeichnet, d.h., das von der Probe emittierte Licht (rot) gelangt über den dichroitischen Spiegel, über einen Langpassfilter, durch Linse und Lochblende auf einen 50/50 Strahlenteiler und zu zwei Avalanche Photodioden (APD1, APD2). Das aufgenommene Signal wird durch eine Computersoftware (PC) weiterverarbeitet.

ton, NJ, USA), wodurch die axiale Ausdehnung des Detektionsvolumens des Emissionslichtes entlang der z-Achse separiert und so der Hintergrund verringert wird. Nach Passieren eines 50/50 Strahlenteilers wird das Fluoreszenzsignal auf zwei Avalanche-Photodioden (APD; SPCM-CD 3017, PerkinElmer, Boston, MA, USA) zur Aufzeichnung gelenkt. Um Afterpulsing Artefakte der Detektoren zu unterbinden, werden zwei Detektoren zur Berechnung der Autokorrelationsfunktionen herangezogen und mittels einer Software (SymphoTime, PicoQuant) ausgewertet.

Inter-Foki-Abstand: Zur Bestimmung des Inter-Foki-Abstandes wurde als Referenzprobe Atto 488 (ATTO-TEC GmbH, Siegen, Deutschland) verwendet. Zur Kurvenanpassung wurde eine freie Diffusion nach Gleichung 2.73 gewählt. Mit dem Diffusionskoeffizienten $D = (4,0 \pm 0,1) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ bei 25°C [152] wurde der Inter-Foki-Abstand zu $d = 321 \pm 18 \text{ nm}$ bestimmt. Zudem wurde mit der Referenz der Quotient aus radialer und axialer Ausdehnung des konfokalen Volumens zu $S = 0,041 \pm 0,001$ festgesetzt und für alle folgenden Messungen verwendet. Abbildung 3.10 zeigt eine zugehörige Messkurve. Die Autokorrelationsfunktionen ACF 1 und ACF 2 liegen im Idealfall übereinander. Da allerdings sehr geringe Intensitäten für die Messungen verwendet wurden, kann es bei der Einstellung zu leichten Unterschieden in den Laserintensitäten beider Laser kommen. Dadurch entsteht eine leichte Verschiebung zwischen ACF 1 und ACF 2 aufgrund abweichender konfokaler Foki. Die globale Anpassung wurde unter der Annahme zweier identischer Foki mit derselben Anpassungsfunktion für ACF 1 und ACF 2 durchgeführt. Aus diesem Grund liegt die globale Anpassung auf dem Mittelwert von ACF 1 und ACF 2. Der Mittelwert von ACF 1 und ACF 2 ist ebenso zur Bestätigung in die Abbildung eingezeichnet.

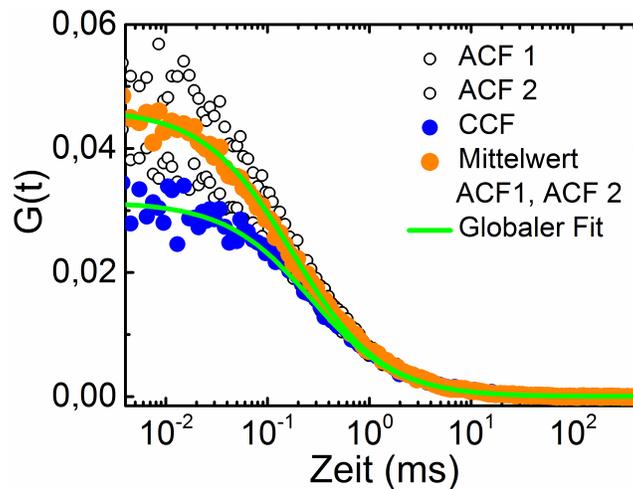


Abbildung 3.10: Bestimmung des Inter-Foki-Abstandes mit Atto 488. Dargestellt sind beide Autokorrelationsfunktionen (ACF 1/ACF 2: schwarz), deren Mittelwert (orange) und die Kreuzkorrelationsfunktion (CCF: blau) mit globaler Anpassungsfunktion (grün).

Datenauswertung

Anpassungsfunktion: Für die Lipidquantenpunkte wurden verschiedene Anpassungsfunktionen untersucht. Dazu wurde zuerst nur eine Anpassung an eine Autokorrelationsfunktion zur Vereinfachung betrachtet. Folgende Autokorrelationsfunktionen, die in Abbildung 3.11 dargestellt sind, wurden untersucht, mit der Teilchenanzahl im konfokalen Volumen N und der Diffusionszeit τ_D :

- Mit einer freien 3D-Diffusion aus Gleichung 2.73 wurde als einfachste Modellannahme begonnen (Abbildung 3.11 (a)). Obwohl eine freie Diffusion der Partikel im konfokalen Volumen aus physikalischer Sicht vorliegt, finden aufgrund von Blinking-Effekten Messpunkte und Ausgleichsgerade keine absolute Übereinstimmung. Die erhaltenen Parameter aus der Anpassung sind $N = 1,96 \pm 0,01$ und $\tau_D = 1,46 \pm 0,04$ ms.
- Eine Anpassung mit Dehnungsparameter b zur freien Diffusion wird in Abbildung 3.11 (b) dargestellt. Ein solcher Dehnungsparameter wird zur Kurvenanpassung für anormale Diffusion verwendet, d.h., wenn die Diffusion zeitabhängig ist (vgl. Unterkapitel 2.4). Eine solche anormale Diffusion, die beispielsweise in Zellen auftritt, spielt hier allerdings keine Rolle. Durch dieses Anpassungsmodell werden allein Blinking-Effekte berücksichtigt bzw. eine bessere Kurvenanpassung gewährleistet und keine physikalische Bedeutung darf diesem Dehnungsparameter beigegeben werden. Die erhaltenen Parameter für die Autokorrelation sind $N = 1,88 \pm 0,01$, $\tau_D = 1,25 \pm 0,03$ ms und $b = 0,82 \pm 0,01$.

Anhand der untersuchten Anpassungsmodelle wird deutlich, dass die Modellannahme mit Dehnungsparameter die beste Übereinstimmung mit den Messdaten liefert. Der Dehnungsparameter stellt allerdings keine physikalisch relevante Größe dar, sondern dient allein der besseren Anpassung an die Messdaten. Physikalisch sinnvoll ist eine freie Diffusion. Weitere Modellannahmen aus der Literatur mit einer Anpassung durch Hinzunahme eines Kinetik-Terms (vgl. Unterkapitel 2.4) wurde zur besseren Anpassung an die Messdaten von Quantenpunkten in Röcker et al. [79] vorgeschlagen und ist ebenso eine reine Modellannahme ohne physikalische Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurde keine bessere Anpassung an die Messdaten mit diesem Modell gefunden. Unterschiede zwischen den Messungen von Röcker et al. [79] und in der vorliegenden Arbeit, müssen in den verwendeten Quanten-

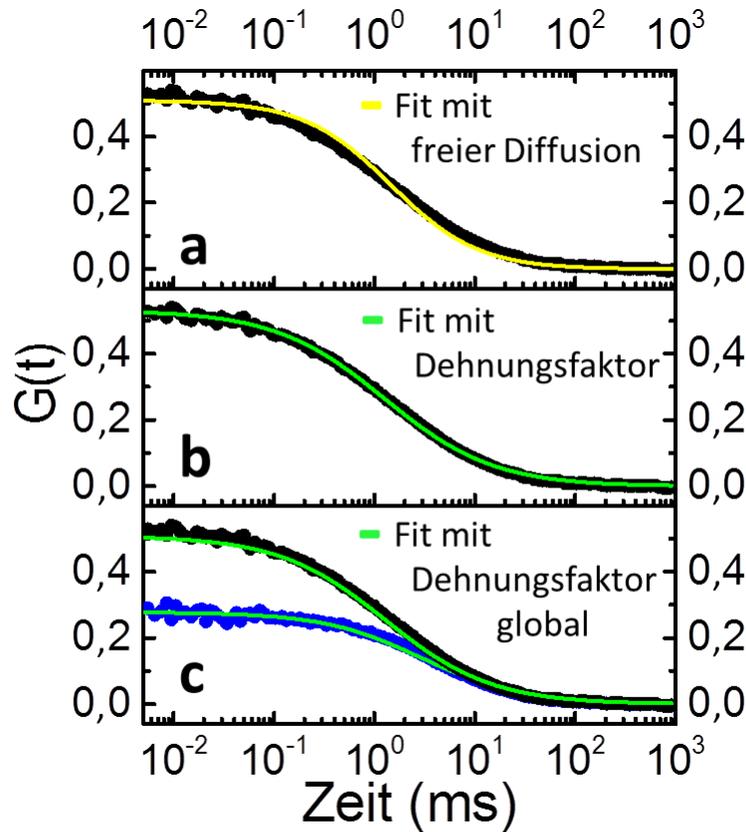


Abbildung 3.11: Untersuchung der Anpassungsfunktionen. Zuerst wurde zur Vereinfachung nur eine Autokorrelationsfunktion (ACF; schwarz) von Lipidquantenpunkten durch eine Modellannahme (a) der freien Diffusion (gelb), (b) mit Dehnungsfaktor (grün) untersucht. (c) Globale Anpassung mit Dehnungsfaktor (grün) an beide Autokorrelationsfunktionen und Kreuzkorrelationsfunktion.

punkten liegen, die beide aus CdSe/ZnS bestanden, allerdings mit unterschiedlichen Liganden und Emissionswellenlängen (Röcker et al.: Carboxylierte Qdot ITK 655; Vorliegende Arbeit: QD ITK 605 mit DHLA-Ligand bzw. Lipidschicht). Vergleicht man nochmals die Modellannahme der freien Diffusion mit der Anpassung mit Dehnungsparameter, können mit beiden Modellannahmen hydrodynamische Radien berechnet werden. Bei beiden Modellen liegen die erhaltenen Parameter in einem sinnvollen Bereich.

Die berechneten hydrodynamischen Radien unterscheiden sich nur durch eine Verschiebung, nicht in der Aussage über die Bindungsaffinitäten von Proteinen an Partikeln. Grund hierfür ist, dass für die Berechnung des hydrodynamischen Radius die Diffusionszeit, bzw. der Diffusionskoeffizient, bestimmt werden muss, der im Wendepunkt der Autokorrelationsfunktion liegt. Aus diesem Grund ist die Verwendung des Dehnungsparameters allein zur besseren Übereinstimmung von Messdaten und Anpassungskurve verwendet worden. Abbildung 3.11 (c) zeigt die beiden Autokorrelationsfunktionen, sowie die Kreuzkorrelationsfunktion mit globaler Anpassung (grün). Für die Korrelationsfunktionen ergibt sich mit Gleichung 2.76

$$G(t) = \frac{1}{N} \left(1 + \left(\frac{4Dt}{r_0^2}\right)^b\right)^{-1} \left(1 + S^2 \left(\frac{4Dt}{r_0^2}\right)^b\right)^{-1/2} \exp\left(\frac{-d^2}{r_0^2 \left(1 + \left(\frac{4Dt}{r_0^2}\right)^b\right)}\right) \quad (3.3)$$

mit den Parametern N für die Anzahl an Partikeln im konfokalen Volumen, r_0 für die radiale Ausdehnung des konfokalen Volumens, S als Quotient von radialer und axialer Ausdehnung des konfokalen Volumens, D als Diffusionskoeffizient, b als Dehnungsparameter, und d als Inter-Foki-Abstand, der für die Autokorrelationen den Wert $d = 0$ annimmt. Die erhaltenen Parameter dieser Anpassung sind: $N = 1,90 \pm 0,01$, $D = (0,32 \pm 0,01) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $b = 0,82 \pm 0,02$ und $r_0 = 415 \pm 6 \text{ nm}$.

Die Korrelationskurven für die folgenden Untersuchungen wurden mit der Programmsoftware SymphoTime (PicoQuant) erstellt und im Anschluss mit einem Matlab-Skript (Matlab R2013a) global angepasst.

Hydrodynamischer Radius: Je Lipidquantenpunktcharge wurde der Parameter b durch mehrere Messungen an reinen Lipidquantenpunkten bestimmt und alle folgenden Anpassungskurven mit dem fixierten Wert angepasst. Aus der Kurvenanpassung ergaben sich unter anderem der Wert für den Diffusionskoeffizienten D , und die Anzahl an Partikeln im konfokalen Volumen N . Durch die Stokes-Einstein Gleichung werden die Diffusionskoeffizienten D in hydrodynamische Radien R_h umgerechnet [85, 118], mit der Temperatur T , Viskosität η und Boltzmann-Konstanten k_B zu

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}. \quad (3.4)$$

Mit steigender Proteinkonzentration besitzt die zu untersuchende Lösung

nicht mehr dieselben viskosen Eigenschaften wie reine Pufferlösung. Um Bindungsstudien mit Proteinkonzentrationen über mehrere Größenordnungen vergleichbar zu machen, muss die Veränderung der Viskosität, d.h., der Einfluss der intrinsischen Proteinviskosität, bei der Berechnung des hydrodynamischen Radius R_h berücksichtigt werden. Bei zunehmender Viskosität erscheint R_h größer als dieser in Wirklichkeit ist. Die korrigierte Viskosität η_{korrr} ergibt sich abhängig von der Proteinkonzentration $[P]$ als Produkt aus der Viskosität von Wasser $\eta_{\text{H}_2\text{O}}$ und der intrinsischen Proteinviskosität η_{int}

$$\eta_{\text{korrr}} = \eta_{\text{H}_2\text{O}}(1 + [P]\eta_{\text{int}}). \quad (3.5)$$

Oftmals ist es schwer, die intrinsische Viskosität von Proteinen zu erhalten. Für das C3 Molekül kann diese nur abgeschätzt werden. Ein Vergleich bekannter Werte für Plasmaproteine lässt auf einen Wert von $4 - 10 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ schließen [153, 154]. Betrachtet man menschliches Serumalbumin ist dieser Parameter bekannt und liegt bei $4,2 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ [153, 154]. Geht man von diesem Beispiel aus, ergibt sich bei einer Proteinkonzentration von 1 mM eine scheinbare Erhöhung von R_h um einen Faktor 2 im Vergleich zu R_h ohne Proteinzugabe, allein aufgrund der intrinsischen Proteinviskosität. Unterhalb von $100 \mu\text{M}$ Proteinkonzentration ist der Effekt meist vernachlässigbar.

Bindungskurve: Binden Proteine an Nanopartikel, wird ein Radiuszuwachs abhängig von der Proteinkonzentration beobachtet. Die erhaltene Kurve der aufgetragenen Radien über der logarithmischen Proteinkonzentration wird als Bindungskurve bezeichnet. Dabei ist deren Mittelpunkt aufgrund unterschiedlicher Bindungsaffinitäten abhängig von den verwendeten Proteinen bzw. Nanopartikel-Oberflächen und kann quantitativ ausgewertet werden. Er gibt die Bindungsaffinität zwischen Protein und Nanopartikel an. D.h., die Proteinkonzentration in diesem Wendepunkt entspricht dem apparenten Dissoziationskoeffizienten K'_D , bei welcher Konzentration 50% der Nanopartikel mit Protein bedeckt sind. Quantitativ kann der apparente Dissoziationskoeffizienten K'_D durch die Abschätzung der Protein-beladenen Nanopartikel als Kugel im Volumenmodell (vgl. Unterkapitel 2.3) analysiert werden. Allerdings gilt dies nur für kleinere Proteine, d.h., sofern viele (> 5) Bindungsplätze vorhanden sind. Der maximale Radiuszuwachs entspricht der Dicke der aufgelagerten Proteinschicht. Mit Beachtung der Proteindimensionen kann dadurch die Orientierung der Proteine auf der Nanopartikeloberfläche abgeschätzt werden. Es muss beachtet werden, dass bei hohen Bindungsaffinitäten

immer die freie Proteinkonzentration und nicht die totale Proteinkonzentration zur Auswertung verwendet wird. Bei geringen Bindungsaffinitäten ist dies immer gegeben, da ein großer Überschuss an Protein vorhanden ist.

Vorbereitungen

Proteinpräparation: Die Proteinlösungen wurden in unterschiedlichen Verdünnungen vorbereitet und bei Raumtemperatur gelagert. 10 min vor Messbeginn wurden die Proteine mit den jeweiligen Nanopartikeln bei Raumtemperatur inkubiert. Als Puffer wurde bei den Lipidquantenpunkten PBS mit Ionen, bei DHLA-Quantenpunkten eine 1:1 Mischung aus PBS mit und ohne Ionen aus Stabilitätsgründen verwendet. Insgesamt wurde jeweils 10 μl Probe vorbereitet, bei der Messung mit der niedrigsten Proteinkonzentration begonnen und insgesamt 5 min gemessen. Die Laserleistung wurde vor jeder Messung kontrolliert und die Temperatur am Probentisch aufgezeichnet.

Messkanäle: Für die Messungen wurden Polyethylenglycol (PEG) beschichtete Kanäle verwendet, die in Abbildung 3.12 dargestellt sind. Dadurch wurde die Adsorption von Nanopartikeln und Proteinen an die Wände der Messzelle reduziert und ebenso die Denaturierung durch die ansonsten hydrophile Glasschicht minimiert. Zur Herstellung der PEG-Schicht wurde ein modifiziertes Protokoll von Diao et al. [155] verwendet, das weiter erläutert werden soll. Objektträger dienten als Deckel und ein Deckglas als Boden. In ersteren wurden am Rand gegenüberliegend auf der kürzeren Seite Löcher gebohrt, die später als Ein- und Ausgang der Kanäle fungierten (vgl. Abbildung 3.12 (a)). Deckel und Boden wurden nach gründlicher Reinigung mit Aminosilan silanisiert und anschließend mit einer PEG-Schicht überzogen (vgl. Abbildung 3.12 (b)). Im Detail erfolgte die Herstellung wie folgt:

- **Reinigung:** Deckgläschen und Objektträger wurden im Ultraschallbad gereinigt (CH_4O 15 min; 1 M Kaliumhydroxid (KOH; Sigma-Aldrich) 20 min; H_2O 10 min), wobei zwischen jedem Schritt die Gläser mit H_2O abgespült wurden. Abschließend wurden diese mit N_2 getrocknet und mit einem Bunsenbrenner kurz erhitzt. Zur Abkühlung wurde eine Pipettenbox seicht mit H_2O befüllt und die Gläser darin auf Pipettenspitzen abgelegt.
- **Aminosilanisierung:** Ein Erlenmeyerkolben wurde zuerst sorgfältig im Ultraschallbad gereinigt (1 M KOH 20 min; H_2O 10 min; CH_4O 20 min; danach N_2). CH_4O (100 ml), Essigsäure ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$; Sigma-Aldrich; 5 ml) und

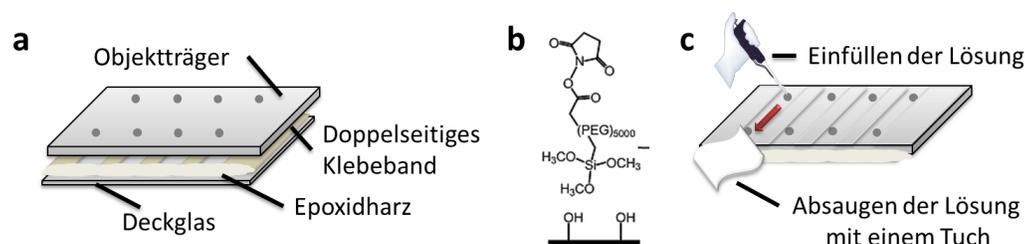


Abbildung 3.12: Darstellung der Messkanäle. (a) Aufbau aus Deckglas, Objektträger mit Bohrungen, doppelseitigem Klebeband zur Herstellung von Kanälen mit Epoxidharz als Abschluss. (b) Chemische Struktur der Beschichtung. (c) Fertiger Messkanal.

Aminosilan (N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl-trimethoxy-silan; UCT Specialities, Bristol, PA, USA; 1,4 ml), das bei $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und vor jeder Verwendung 30 min bei Raumtemperatur equilibrierte, wurden gemischt und die Glasoberflächen in einem Glascontainer für zweimal 10 min inkubiert, mit Ultraschall für 1 min als Zwischenschritt. Die Glasplättchen wurden abschließend mit CH_4O und H_2O abgespült und mit N_2 getrocknet.

- **PEGylierung:** Zur PEGylierung mit PEG (Methoxy-Polyethylenglycol-Succinimidyl-Valeriansäure, Molekulargewicht 5000 g mol^{-1} ; M-PEG-SVA MW 5000, Laysan Bio Inc., Arab, AL, USA) wurde dieses mit 100 mM Bicarbonat Puffer (NaHCO_3 ; Roth, Karlsruhe, Deutschland) auf 50 mM verdünnt. Die Lösung wurde kurz bei 10000 rpm zentrifugiert und je $60\text{ }\mu\text{l}$ auf die Objektträger gegeben. Ein Deckgläschen wurde (blasenfrei) auf den Objektträger gelegt, und dieses Sandwich für mindestens 4 h an einem dunklen Ort inkubiert, mit H_2O abgespült, mit N_2 getrocknet und zur Messkammer zusammengebaut.

Die PEG-Kanäle wurden von einer Seite befüllt und mit einem Tuch überschüssige Probe entfernt (vgl. Abbildung 3.12 (c)). Für jede Messung wurde ein neuer Messkanal verwendet, vorbereitete Kanäle bei $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Festlegung der Messparameter: Bevor die Bindungsmessungen durchgeführt werden konnten, musste die Laserleistung P_{Laser} , Messzeit und die Konzentration in Hinblick auf die erzeugte Zählrate optimiert werden. Abbildung 3.13 zeigt Autokorrelationsfunktionen der Lipidquantenpunkte

abhängig von der verwendeten Laserleistung P_{Laser} . Bei zunehmender Laserleistung wird eine kleinere Amplitude generiert, da mehr Teilchen im konfokalen Volumen aufgrund der größeren Energie angeregt wurden. Die angelegte Laserleistung P_{Laser} kann als Quotient aus zugeführter Energie E pro Zeit t , in welcher diese Energie abgegeben wurde, mit

$$P = \frac{E}{t} \quad (3.6)$$

beschrieben werden. Die Zeit t ist als reziproke Laserpulsfrequenz f_{Laser} zu verstehen. Aufgrund von Blinken können bei zu hohen Laserleistungen Bindungsereignisse nicht mehr erkannt werden, da sie von diesem Prozess überlagert werden. Aus diesem Grund ist es wichtig, eine niedrige Laserleistung zu verwenden. Es muss beachtet werden, dass genügend Fluktuationen während der Messzeit aufgezeichnet werden. Eine niedrige Laserleistung geht folglich mit einer längeren Messzeit oder größeren Probenkonzentration einher. Für alle Messungen wurde eine Laserpulsfrequenz von $f_{\text{Laser}} = 4$ MHz, eine Leistung von $P_{\text{Laser}} = 0,5 \mu\text{W}$, eine Anzahl von Partikeln im konfokalen Volumen von 1 – 5 und eine Messzeit von 5 min verwendet.

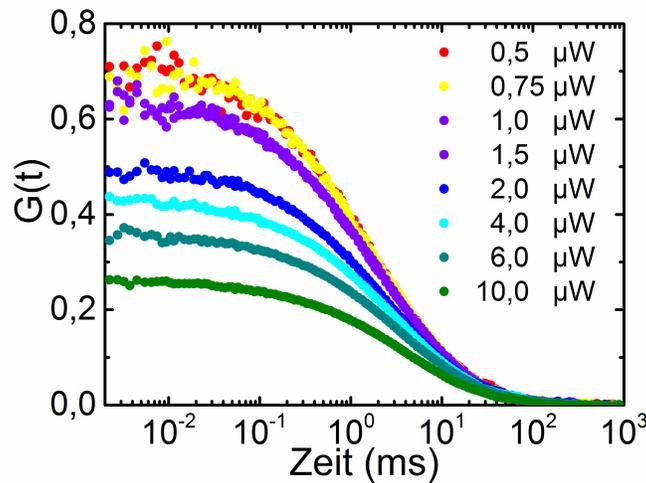


Abbildung 3.13: Autokorrelationsfunktion in Abhängigkeit von der Laserleistung P_{Laser} . Die Amplitude der Autokorrelationsfunktion $G(t)$ nimmt bei Erhöhung von P_{Laser} ab, da mehr Lipidquantenpunkte angeregt werden.

Ergebnisse

Im Folgenden werden zuerst 2fFCS Messungen an reinen Quantenpunkten ohne und danach mit Lipid- oder DHLA-Beschichtung vorgestellt. Im Anschluss folgen die Ergebnisse der Messungen zur Wechselwirkung von C3 mit Lipid- und DHLA-Quantenpunkten und der Analyse von Bindungsaffinitäten. Im letzten Schritt werden Messungen mit beiden Nanopartikeln und weiteren Serumproteinen, d.h., mit menschlichem Serumalbumin (HSA), menschlichem Serum und dem Apolipoprotein E3 (ApoE3), angeführt. Alle Ergebnisse werden abschließend einander gegenüber gestellt.

Quantenpunkte ohne Lipid- oder DHLA-Beschichtung: Zuerst wurde der Radius der wasserunlöslichen Quantenpunkte in n-Tetradecan bestimmt. Abbildung 3.14 zeigt die Autokorrelationsfunktionen (ACF 1, ACF 2), deren Mittelwert, Kreuzkorrelationsfunktion (CCF), sowie die zugehörigen globalen Anpassungskurven (grün). Als Parameter wurden die Diffusionszeit zu $D = (0,16 \pm 0,01) \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, die Teilchenanzahl zu $N = 1,04 \pm 0,01$, die radiale Ausdehnung des konfokalen Volumens zu $r_0 = 411 \pm 5 \text{ nm}$ und der Dehnungsparameter zu $b = 0,82 \pm 0,01$ bestimmt. Mit einer Viskosität von n-Tetradecan von $\eta = 2,335 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ [156], erhält man für mehrere Messungen einen hydrodynamischen Radius von $R_h = 4,3 \pm 0,2 \text{ nm}$.

Lipid- und DHLA-Quantenpunkte: Lipid- und DHLA-Quantenpunkte bestehen aus einem CdS/ZnS-Quantenpunktkern. Der Unterschied liegt in der äußeren Beschichtung, d.h., zum einen mit Lipiden, zum anderen mit DHLA. Tabelle 3.1 stellt hydrodynamische Radien und ζ -Potential-Werte der beiden Nanopartikel gegenüber. Diese lassen ähnliche Bindungseigenschaften, d.h., eine ähnliche Geometrie gebundener Proteine auf den Partikeln, vermuten. Radius, und damit Krümmung, liegen im gleichen Bereich. In Bezug auf das ζ -Potential weisen DHLA-Quantenpunkte leicht negativere Werte auf.

Tabelle 3.1: Charakteristische Parameter der Lipid- (LQD) und DHLA-Quantenpunkte (DQD). $R_{h,0}$: hydrodynamischer Radius; ζ : ζ -Potential.

	LQD	DQD
$R_{h,0}$ (nm)	$6,8 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,2$
ζ -Potential (mV)	$-9,3 \pm 0,5$	$-24,6 \pm 2,2$

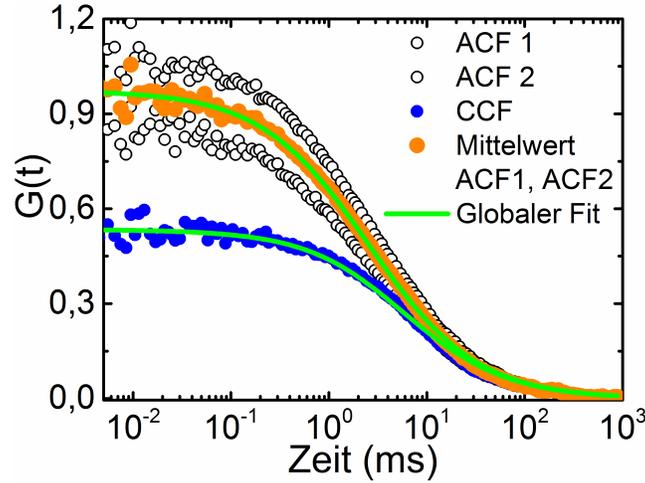


Abbildung 3.14: 2fFCS Messung von reinen Quantenpunkten in n-Tetradecan. Beide Autokorrelationen (ACF 1/ACF 2: schwarz), deren Mittelwert (orange) sowie die Kreuzkorrelation (CCF: blau) mit globaler Anpassungsfunktion (grün) sind dargestellt.

Bindung von C3 an Lipidquantenpunkte: Abbildung 3.15 zeigt die Autokorrelationsfunktionen $G(t)$ (jeweils ACF 1) der Messungen von Lipidquantenpunkten mit unterschiedlichen C3-Konzentrationen c_{C3} . Dabei werden in Abbildung 3.15 (a) die aufgezeichneten, in (b) die normierten Autokorrelationsfunktionen $G(t)$ dargestellt. Für den Dehnungsparameter b wurde ein Wert von $b = 0,82$ verwendet, welcher dem Wert von reinen Lipidquantenpunkten entspricht. Betrachtet man das Messsignal, zeigt sich eine minimal abnehmende Amplitude mit steigender Proteinkonzentration c_{C3} . Dies kann durch Bindung von Lipidquantenpunkten an die Messkammerwände erklärt werden. Da dieser Effekt allerdings sehr gering ist, muss er nicht weiter beachtet werden. Anhand der normierten Autokorrelationsfunktionen $G(t)$ erkennt man eine Verschiebung zu längeren Diffusionszeiten bei steigender Proteinkonzentration c_{C3} . Dies lässt darauf schließen, dass Proteine an die Lipidquantenpunkte gebunden haben, der hydrodynamische Radius R_h sich dadurch vergrößerte und es dadurch zu einer längeren Diffusionszeit kam. Die erhaltenen Diffusionskoeffizienten D wurden für die Berechnung der hydrodynamischen Radien R_h verwendet (vgl. Stokes-Einstein Gleichung 3.4). Tabelle 3.2 fasst die erhaltenen Parameter zusammen.

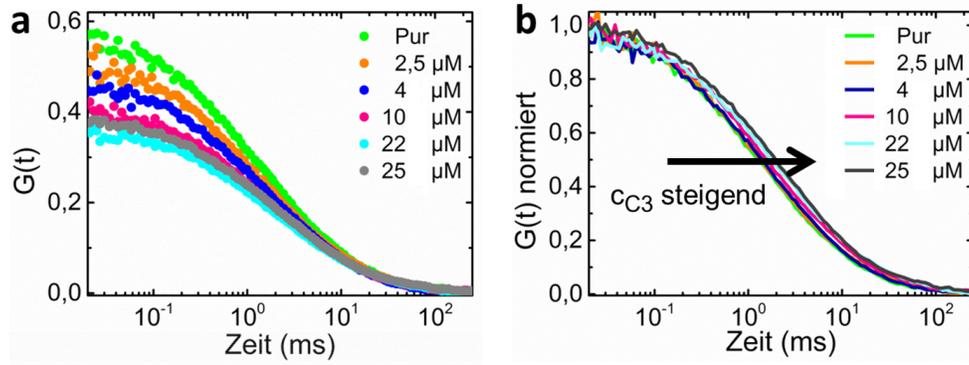


Abbildung 3.15: Autokorrelationsfunktionen $G(t)$. Dargestellt sind die Messungen von Lipidquantenpunkten original (a) und normiert (b) in Abhängigkeit von der C3-Konzentration c_{C3} .

Tabelle 3.2: Erhaltenen Parameter der Anpassung an die Autokorrelationsfunktionen $G(t)$, abhängig von der C3-Konzentration c_{C3} aus Abbildung 3.15 mit Dehnungsparameter $b = 0,82$. N : Teilchenanzahl; D : Diffusionskoeffizient; r_0 : radiale Ausdehnung des konfokalen Volumens.

c_{C3} (μM)	N	D ($10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)	r_0 (nm)
0	$1,90 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$	415 ± 6
0,25	$2,05 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$	414 ± 5
0,5	$1,90 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,01$	424 ± 6
0,75	$2,06 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$	416 ± 5
1	$1,99 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,01$	422 ± 6
2,5	$2,13 \pm 0,14$	$0,31 \pm 0,01$	415 ± 5
4	$2,34 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,01$	414 ± 6
7,5	$2,62 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,01$	419 ± 6
10	$2,66 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,01$	420 ± 5
13	$2,55 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,01$	420 ± 6
17,5	$2,67 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,01$	423 ± 6
22	$3,02 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,01$	421 ± 6
25	$2,85 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,01$	413 ± 5

Abbildung 3.16 (a) zeigt eine schematische Darstellung des Proteins, sowie das zugehörige elektrostatische Potential. In Abbildung 3.16 (b) werden die berechneten hydrodynamischen Radien R_h , aufgetragen über der logarithmischen Proteinkonzentration, dargestellt. Es wird deutlich, dass eine Sättigung der Bindungskurve mit den verwendeten Proteinkonzentrationen nicht erreicht und damit keine direkte Analyse des maximalen Radiuszuwachses und der Bindungsaffinität durchgeführt werden konnte. Eine Aufkonzentration des Proteins war aufgrund der Löslichkeit des C3 Proteins nicht möglich.

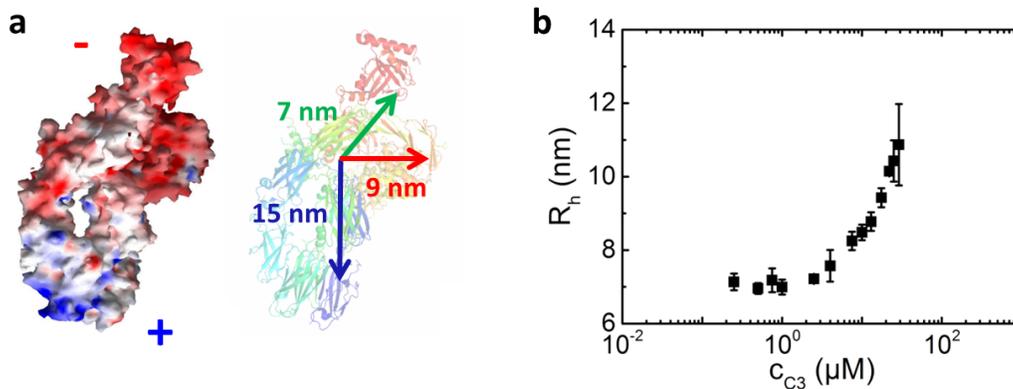


Abbildung 3.16: C3 Protein und hydrodynamischer Radius R_h der Lipidquantenpunkte, abhängig von der C3-Konzentration c_{C3} . (a) Proteingeometrie und elektrostatisches Potential (rot: $-12 k_B T$; blau: $+12 k_B T$ aus [146]; pdb: 2a73). (b) Hydrodynamischer Radius R_h der Lipidquantenpunkte, abhängig von der C3-Konzentration c_{C3} .

Um die Bindungsaffinität von C3 an den Lipidoberflächen abschätzen zu können, werden im Folgenden die Bindungsmessungen an DHLA-Quantenpunkte vorgestellt.

Bindung von C3 an DHLA-Quantenpunkte: Mit DHLA-Quantenpunkten konnte eine Sättigung der Bindungskurve, wie in Abbildung 3.17 dargestellt wird, erreicht werden. Zur weiteren Analyse wurde das Volumenmodell (siehe Unterkapitel 2.3) und die Hill-Gleichung (Gleichung 2.28) verwendet, mit einem Volumen des Proteins von $V_P = 220 \text{ nm}^3$, das unter Verwendung einer durchschnittlichen Proteindichte von $1,35 \text{ g ml}^{-1}$ berechnet

wurde. Wichtig für die weiteren Untersuchungen ist der gemessene maximale Radiuszuwachs von $\Delta R_h = 15,9 \pm 0,8$ nm, der einem maximalen hydrodynamischen Radius von $R_h = 20,7 \pm 0,7$ nm, bei einer maximalen Anzahl gebundener Proteine von $N_{\max} = 168 \pm 18$, entspricht. Mit Betrachtung des elektrostatischen Potentials ergibt sich, dass in diesem Fall die positive Proteinseite an die leicht negativen DHLA-Quantenpunkte gebunden hat. Bei der hohen detektierten Bindungsaffinität musste die freie Proteinkonzentration für die Auswertung abgeschätzt werden. Dazu wurde als erster Schritt die maximale Anzahl an gebundenen Proteinen durch Oberflächenbetrachtungen berechnet: Durch die Messung des maximalen Radiuszuwachses konnte abgeschätzt werden, mit welcher Proteinseite die Bindungsreaktion stattfindet und die Interaktionsfläche C3-Lipid abgeschätzt werden. Berechnet man die mögliche Anzahl solcher Interaktionsflächen pro Nanopartikel, ergibt sich, dass ungefähr 15 Interaktionsflächen, d.h., 15 Proteine, auf der Oberfläche Platz finden. Mit dieser Abschätzung kann ein apparentes Verhältnis von Protein- zu Nanopartikelvolumen und damit die Konzentration an gebundenen Proteinen in Abhängigkeit der zugegebenen Proteinkonzentration berechnet werden. Die freie Proteinkonzentration ergibt sich abschließend als Differenz aus totaler Proteinkonzentration abzüglich gebundener Proteinkonzentration. Bei dieser Abschätzung müssen jedoch Fehler mit betrachtet und die Bindungsaffinitäten dürfen nicht als absolut genommen werden. Es wurde damit ein apparenter Dissoziationskoeffizient von $K'_D = 15 \pm 4$ nM und einem Hillkoeffizienten von $n = 2,1 \pm 0,6$ bestimmt. Durch die Bestimmung des Radiuszuwachses auf den DHLA-Quantenpunkten konnte die Bindungsaffinität von C3 an Lipidquantenpunkten abgeschätzt werden, wie im Folgenden gezeigt wird.

Auflösung der Bindungseigenschaft von C3 an Lipidquantenpunkte: Mit dem Vorwissen aus den Bindungsstudien von C3 an DHLA-Quantenpunkte wurden im Folgenden die Messung der C3 Bindung an Lipidquantenpunkte analysiert. Abbildung 3.18 zeigt die erhaltene Anpassungskurve an die Messpunkte und eine schematische Darstellung eines voll beladenen Lipidquantenpunktes mit C3. Die Bindungsaffinität liegt allerdings nicht mehr im nanomolaren, sondern im mikromolaren Bereich. Zur Berechnung wurde ausgehend von den DHLA-Quantenpunkt-Messungen die maximale Anzahl an gebundenem Protein auf den Lipidquantenpunkten zu $N_{\max} = 220$ bestimmt. Mit diesem Wert wird derselbe maximale Radius wie bei den DHLA-Quantenpunkten erhalten. Dieser Wert wurde fixiert und

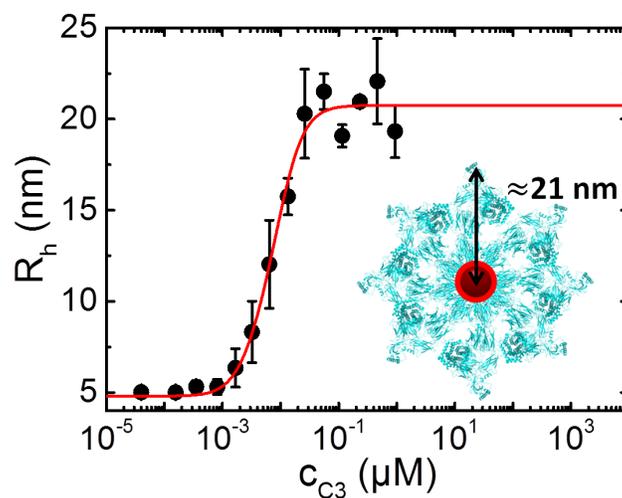


Abbildung 3.17: Radiuszuwachs von DHLA-Quantenpunkte, abhängig von der C3-Konzentration c_{C3} , mit einer schematischen Darstellung eines DHLA-Quantenpunktes mit Proteinmonolage.

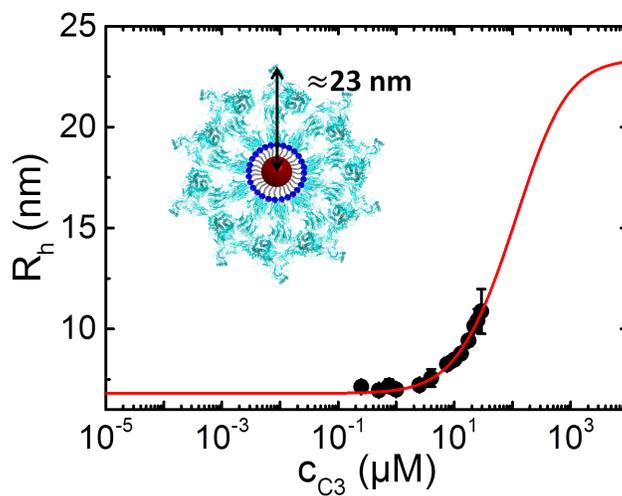


Abbildung 3.18: Radiuszuwachs von Lipidquantenpunkten, abhängig von der C3-Konzentration c_{C3} , mit einer schematischen Darstellung eines Lipid-quantenpunktes mit Proteinmonolage.

damit ein apparenter Dissoziationskoeffizient von $K_D' = 270 \pm 90 \mu\text{M}$ und ein Hillkoeffizient von $n = 1,1 \pm 0,1$ berechnet. Deutlich erkennbar ist die Verschiebung der Bindungsaffinität durch den direkten Vergleich von Abbildung 3.17 und Abbildung 3.18, da dieselben Skalierungen in Bezug auf die x-Achse verwendet wurden.

Mit diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass C3 an Lipidquantenpunkte binden kann, und eine Bindungsaffinität im mikromolaren Bereich vorliegt. Die Bindungsaffinität ist dabei entscheidend geringer als zu DHLA-Quantenpunkten. Mit dieser Abschätzung geht die Annahme einher, dass das C3 Protein an beide Nanopartikel in derselben Orientierung bindet. Um diese Annahme zu bekräftigen und ebenso die große Diskrepanz in der Bindungsaffinität weiter zu untersuchen, wurden zusätzliche Messungen durchgeführt, die im Folgenden vorgestellt werden.

Weitere Bindungsmessungen an Lipid- und DHLA-Quantenpunkte
Bindungseigenschaften von menschlichem Serumalbumin (HSA), von menschlichem Serum als Gemisch unterschiedlicher Proteine, sowie von Apolipoprotein E3 an beide Nanopartikel werden nun untersucht.

Abbildung 3.19 zeigt Proteingeometrie und elektrostatisches Potential (<http://kryptonite.ncr.net/pdb2pqr/>) von HSA (a) und ApoE3 (b). HSA wurde ausgewählt, da bis zu 60% der menschlichen Serumproteine aus HSA bestehen. Menschliches Serum ist von Bedeutung, um eine grobe Abschätzung zu bekommen, in welchem Bereich allgemein die Bindungsaffinität von solchen Proteingemischen an beide Nanopartikel im Vergleich liegt. Dem ApoE3 wurde aufgrund der Eigenschaft an Lipoproteine zu binden eine hohe Affinität an die Lipidquantenpunkte zugerechnet und aus diesem Grund als interessantes Protein für genauere Untersuchungen herangezogen.

Für alle dargestellten Messungen wurde erneut das Volumenmodell (vgl. Unterkapitel 2.3) und die Hill-Gleichung (Gleichung 2.28) herangezogen. Wiederum wurde für die Darstellung der nun folgenden Messungen die gleiche Skalierung der x-Achse verwendet, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. Zudem wird eine schematische Darstellung voll beladener DHLA- bzw. Lipidquantenpunkte gegeben. Abschließend werden die verschiedenen Protein-Messungen sowohl an DHLA- als auch an Lipidquantenpunkten hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität einander gegenübergestellt.

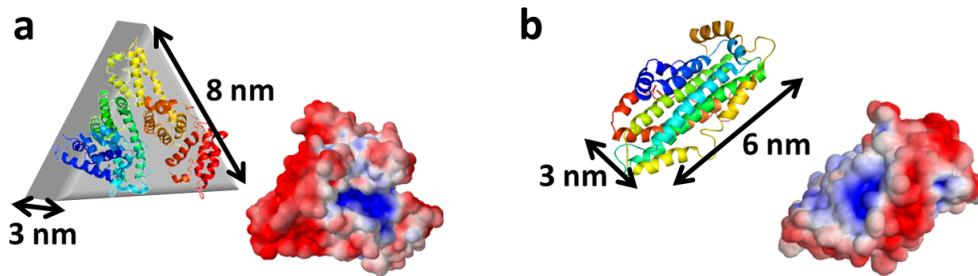


Abbildung 3.19: Menschliches Serumalbumin (HSA) und Apolipoprotein E3 (ApoE3). (a) HSA-Proteingeometrie und elektrostatisches Potential (blau: $+5 k_B T$; rot: $-5 k_B T$); pdb: 1uor;). (b) ApoE3-Proteingeometrie und elektrochemisches Potential (blau: $+5 k_B T$; rot: $-5 k_B T$); pdb: 2l7b).

Menschliches Serumalbumin (HSA): HSA besitzt ein Molekulargewicht von 67 kDa und eine prismenähnliche Struktur, mit einem abgeschätzten Volumen von $V_P = 100 \text{ nm}^3$. Messungen von HSA gebunden an Lipidquantenpunkte wurden mit Messungen an DHLA-Quantenpunkte aus Treuel et al. [151] verglichen. Abbildung 3.20 zeigt die Messung des hydrodynamischen Radius R_h in Abhängigkeit von der HSA-Konzentration c_{HSA} . Dabei sind in rot, mit zugehöriger linker y-Achse, die Messungen an DHLA-Quantenpunkten, in blau, mit zugehöriger rechter y-Achse, die Messungen an Lipidquantenpunkten dargestellt. Durch Anpassung einer Hill-Gleichung (vgl. Unterkapitel 2.3) an die Messpunkte erhält man den apparenten Dissoziationskoeffizienten K'_D , den Hillkoeffizient n , die maximale Anzahl an gebundenem Protein N_{max} , und den maximalen Radiuszuwachs ΔR_h . Tabelle 3.3 fasst die erhaltenen Parameter der Bindungsmessungen zusammen. Ein maximaler Radiuszuwachs von $\approx 3 \text{ nm}$ wurde für DHLA- und Lipidquantenpunkte gemessen, d.h., HSA bindet mit der positiven Grundfläche auf beide Nanopartikel. Damit wurde die Annahme bekräftigt, dass Proteine in derselben Orientierung auf beide Nanopartikel binden. Ebenso wurde gezeigt, dass HSA eine geringere Bindungsaffinität zu Lipid- als zu DHLA-Quantenpunkten aufweist.

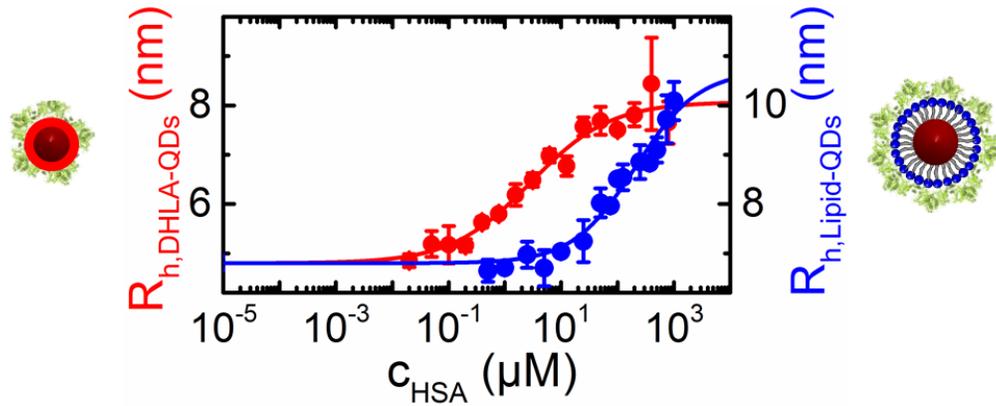


Abbildung 3.20: Bindung von HSA an DHLA- [151] und Lipidquantenpunkte. Hydrodynamischer Radius R_h für DHLA- (rot) und Lipidquantenpunkte (blau) abhängig von der HSA-Konzentration c_{HSA} , jeweils mit Ausgleichsgeraden (Hill-Gleichung) und schematischer Darstellung voll beladener Nanopartikel.

Tabelle 3.3: Parameter der Bindung von HSA an Lipid- (LQD) und DHLA-Quantenpunkte (DQD), letztere aus [151]. $R_{h,0}$: hydrodynamischer Radius ohne Protein; $R_{h,\text{max}}$: maximaler hydrodynamischer Radius mit Protein; ΔR_h : maximaler Radiuszuwachs; K'_D : apparenter Dissoziationskoeffizient; n : Hillkoeffizient; N_{max} : maximale Anzahl gebundener Proteine.

	LQD	DQD
$R_{h,0}$ (nm)	$6,8 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,2$
$R_{h,\text{max}}$ (nm)	$10,6 \pm 0,7$	$8,0 \pm 0,3$
ΔR_h (nm)	$3,8 \pm 0,7$	$3,3 \pm 0,6$
K'_D (μM)	360 ± 100	6 ± 3
n	$0,8 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1$
N_{max}	37 ± 10	17 ± 2

Menschliches Serum: Menschliches Serum besteht aus einer Vielzahl verschiedener Serumproteine unterschiedlicher Größe und Molekulargewichte. Aus diesem Grund kann keine molare Konzentration, sondern nur eine Konzentration in g ml^{-1} angegeben werden, mit der Abschätzung einer Protein-

menge von 60 g ml^{-1} in menschlichem Serum (Sigma-Aldrich). Das mittlere Volumen wird zu $V_P = 300 \text{ nm}^3$ abgeschätzt. Abbildung 3.21 zeigt die Bindungsmessung an DHLA- und Lipidquantenpunkte. Erneut wurden in rot, mit zugehöriger linker y-Achse, die Messungen an DHLA-Quantenpunkten, in blau, mit zugehöriger rechter y-Achse, die Messungen an Lipidquantenpunkten dargestellt. Tabelle 3.4 fasst die erhaltenen Ergebnisse der Serumuntersuchung zusammen. Man erkennt deutlich, dass auch bei dieser Messung ein großer Unterschied in der Bindungsaffinität an beide Nanopartikel besteht. Aus der Literatur ist bekannt, dass 60% der Proteine im menschlichen Serum HSA darstellt. Geht man von dieser Annahme aus und berechnet aus der erhaltenen Bindungskurve mit menschlichem Serum die Bindungskurve bei einer 100%-igen HSA-Konzentration, ergibt sich eine Verschiebung der Bindungskurve hin zu höheren Proteinkonzentrationen, d.h., zu niedrigeren Bindungsaffinitäten. Die Bindungsaffinität verschiebt sich folglich zum Affinitätsbereich von reinem HSA hin, ohne mit diesem übereinzustimmen. Dies liegt zum einen an der groben Abschätzung, zum anderen aber hauptsächlich an der Vielzahl weiterer Proteine, die einen Einfluss ausüben und höhere Bindungsaffinitäten an die Partikel besitzen.

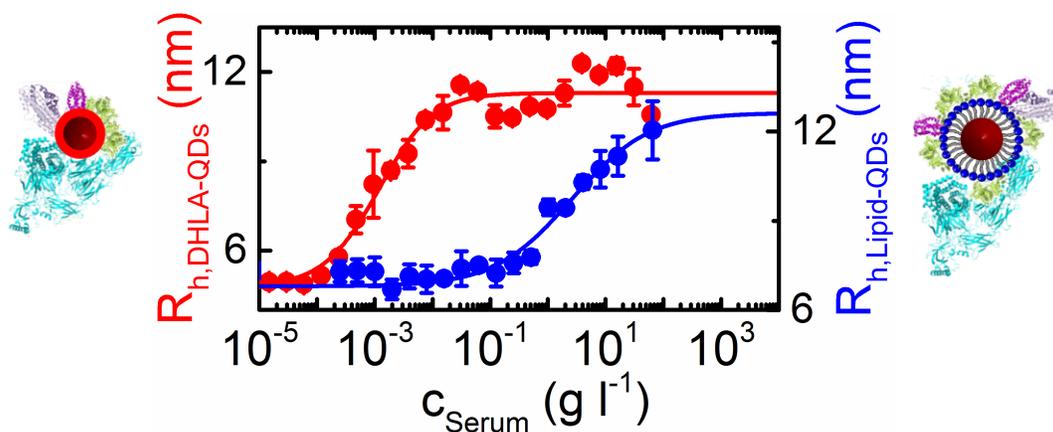


Abbildung 3.21: Bindung von menschlichem Serum an DHLA- und Lipidquantenpunkte. Hydrodynamischer Radius R_h von DHLA- (rot) und Lipidquantenpunkten (blau), abhängig von der verwendeten Serum-Konzentration c_{Serum} , jeweils mit Ausgleichsgeraden und schematischer Darstellung voll beladener Nanopartikel.

Tabelle 3.4: Parameter für die Bindung von menschlichem Serum an Lipid-(LQD) und DHLA-Quantenpunkte (DQD). $R_{h,0}$: hydrodynamischer Radius ohne Protein; $R_{h,max}$: maximaler hydrodynamischer Radius mit Protein; ΔR_h : maximaler Radiuszuwachs; K'_D : apparenter Dissoziationskoeffizient; n : Hillkoeffizient; N_{max} : maximale Anzahl an gebundenem Protein.

	LQD	DQD
$R_{h, \max}$ (nm)	$12,6 \pm 0,7$	$11,1 \pm 0,2$
ΔR_h (nm)	$5,5 \pm 0,6$	$6,5 \pm 0,3$
K'_D ($g\ l^{-1}$)	6 ± 4	$(3,0 \pm 0,1)10^{-3}$
n	$0,7 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$
N_{max}	71 ± 14	52 ± 2

Apolipoprotein E3: Apolipoprotein E3 (ApoE3), mit einem Molekulargewicht von 34 kDa und einem abgeschätzten Volumen von $V_P = 200\text{ nm}^3$, wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt, da eine besonders gute Affinität dieses Proteins an die Lipidoberflächen erwartet wurde. Apolipoproteine spielen eine wichtige Rolle als Liganden an Rezeptoren der Lipoproteine niedriger Dichte (LDL) [157]. Es besteht aus zwei strukturegebenden Bereichen: Der eine Bereich wird aus vier Helices, der andere aus einer abstehenden α -Helix Struktur zusammengesetzt. Eine ausführliche Darstellung findet sich in Mahley et al. [158]. Für die DHLA-Quantenpunkte konnte eine Sättigung der Bindungskurve erreicht werden, für die Lipidquantenpunkte nicht. Abbildung 3.22 zeigt die Bindungsmessungen von ApoE3 an DHLA- (rot) und Lipidquantenpunkte (blau) mit Anpassungskurve. Der gemessene Radiuszuwachs für die DHLA-Quantenpunkte ist größer als erwartet, betrachte man die molekulare Proteindimension. Annahme ist, dass dies aufgrund der flexiblen, abstehenden α -Helix Struktur zustande kommt. Um die Bindungsaffinität an Lipidquantenpunkte aufzulösen, wurde eine Anpassung durch Annahme desselben Radiuszuwachses wie bei den DHLA-Quantenpunkten durchgeführt. Dazu wurde eine maximale Anzahl gebundener Proteine von $N_{max} = 75$ gewählt. Der Hillkoeffizient wurde auf $n = 1$ zur Kurvenanpassung fixiert. Tabelle 3.5 fasst die erhaltenen Parameter zusammen. Erneut ist die Bindungsaffinität des ApoE3 an die Lipidquantenpunkte viel geringer als an die DHLA-Quantenpunkte. Da nur wenige Messpunkte den Anstieg in der Bindungskurve der Lipidquantenpunkte anzeigen, kann es nicht aus-

geschlossen werden, dass ApoE3 in einer anderen Konformation gebunden wird. Saito et al. [157] zeigten, dass Apolipoproteine in Kontakt mit Lipidoberflächen entfalten. Auch dieser Mechanismus ist denkbar. Begrenzung für weitere Messungen mit höheren Proteinkonzentrationen war die Löslichkeit des Proteins.

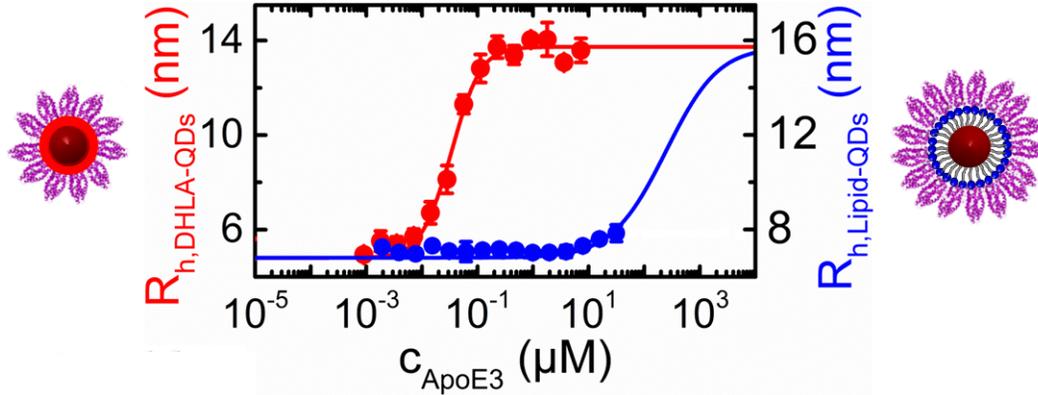


Abbildung 3.22: Bindung von Apolipoprotein E3 (ApoE3) an DHLA- und Lipidquantenpunkte. Hydrodynamischer Radius R_h von DHLA- (rot) und Lipidquantenpunkten (blau), abhängig von der verwendeten ApoE3-Konzentration c_{ApoE3} , jeweils mit Ausgleichsgeraden und schematischer Darstellung voll beladener Nanopartikel.

Tabelle 3.5: Bindung von ApoE3 an Lipid- (LQD) und DHLA-Quantenpunkte (DQD). $R_{h,0}$: hydrodynamischer Radius ohne Protein; ΔR_h : maximaler Radiuszuwachs; K'_D : apparer Dissoziationskoeffizient; n : Hillkoeffizient; N_{max} : maximale Anzahl an gebundenem Protein; *: fixiert.

	LQD	DQD
$R_{h,0}$ (nm)	$6,8 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,2$
ΔR_h (nm)	$8,6 \pm 0,3$	$8,5 \pm 0,3$
K'_D (μM)	530 ± 120	$0,06 \pm 0,02$
n	1*	$1,9 \pm 0,8$
N_{max}	75*	50 ± 8

Vergleich der Bindungsstudien

Alle Bindungsstudien an DHLA- und Lipidquantenpunkten wurden vergleichend in Abbildung 3.23 einander gegenübergestellt. Dabei sind in rot, mit zugehöriger linken y-Achse, die Messungen mit DHLA-Quantenpunkten und in blau, mit zugehöriger rechter y-Achse, die Messungen mit Lipidquantenpunkten aufgetragen. In dieser Darstellung wurden die hydrodynamischen Radien metrisch über der logarithmischen Proteinkonzentration in g l^{-1} dargestellt. Die metrische Darstellung dient zur besseren Vorstellung, welchen Radiuszuwachs die einzelnen Proteine auf den beiden Nanopartikeln verursachen. Grund für die Wahl der Konzentrationsdarstellung ist, dass für die Messungen mit Serum keine molare Konzentration angegeben werden kann, allerdings eine vergleichende Darstellung zur Betrachtung von Bindungsaffinitäten sinnvoll ist. Ebenso sind Näherungen der zugehörigen Bindungsaffinitäten angegeben, um einen direkten Größenvergleich zu erhalten. Man erkennt deutlich, dass die Bindungsaffinität aller Proteine an DHLA-Quantenpunkte deutlich höher liegt, als an Lipidquantenpunkte. Die Lipidhülle verhindert folglich das Anhaften von Proteinen. Der berechnete Anstieg im Radius, abhängig von der maximalen Proteinbeladung, lässt darauf schließen, dass eine ähnliche gebundene Proteinkonformation auf beiden Nanopartikeln vorliegt. Zudem konnte eine gute Übereinstimmung des Radiuszuwachs mit der molekularen Proteindimension gefunden werden. Das elektrostatische Potential wird als hauptverantwortlich für die Proteinorientierung gesehen.

Durch die vorgestellte Kombination aus Lipidquantenpunkten und 2fFCS konnte das Bindungsverhalten des C3 Proteins an stark gekrümmte Lipidoberflächen untersucht werden. Dadurch wurde belegt, dass C3 an stark gekrümmte Oberflächen binden kann. Allerdings bindet C3 mit einer geringen Bindungsaffinität, die mit Hilfe von Abschätzungen aus Vergleichsmessungen mit DHLA-Quantenpunkten aufgelöst wurde. Betrachtet man die vorgestellte Untersuchungsmethode, wurde mit den hergestellten Lipidquantenpunkten ein gut charakterisierbares und modulierbares Messsystem (Anregungs- und Emissionswellenlänge, Größe, Lipidwahl) vorgestellt, das für die Untersuchung von Lipid-Protein-Bindungen mittels 2fFCS geeignet ist. Durch die Verwendung von Quantenpunkten zur Fluoreszenzsignalgebung, mussten weder Protein, noch Lipid direkt markiert und Einflüsse durch die Fluoreszenzmarkierung können ausgeschlossen werden. Zusätzlich konnte durch den Vergleich der Bindung von weiteren Serumproteinen an DHLA- und Lipidquantenpunkten gezeigt werden, dass eine Lipidhülle die Bindung von Proteinen

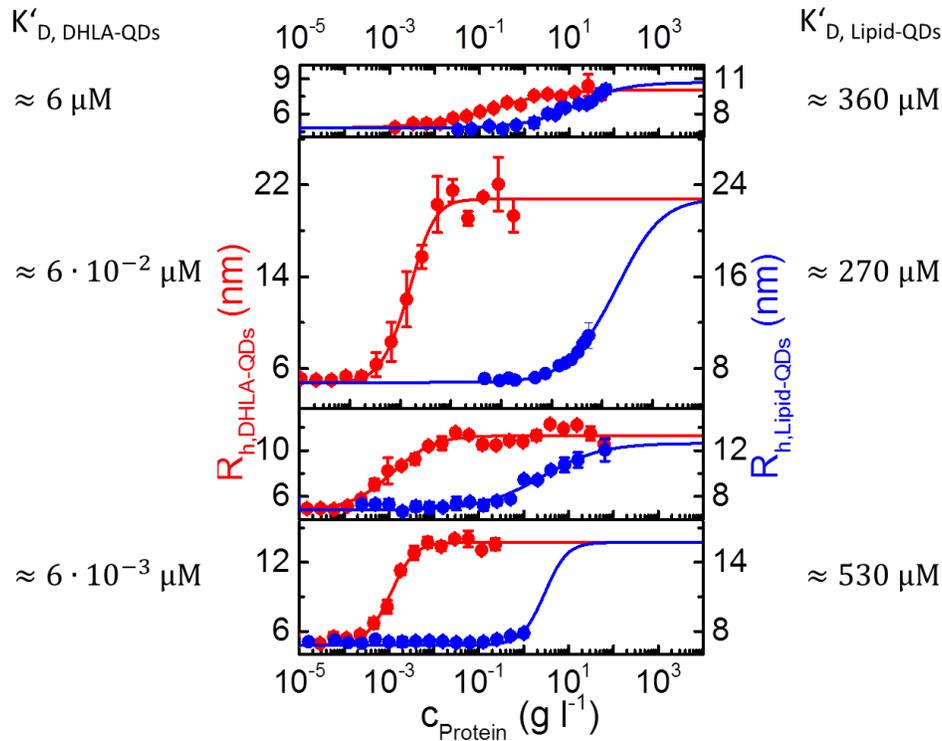


Abbildung 3.23: Vergleich des hydrodynamischen Radiuszuwachs von DHLA- (rot) und Lipidquantenpunkten (blau), abhängig von der Proteinkonzentration in g l^{-1} mit zugehörigen Anpassungskurven. (a) Menschliches Serumalbumin (HSA), (b) Komplement Komponente 3 (C3), (c) Menschliches Serum (d) Apolipoprotein E3 (ApoE3). Angegeben sind zudem Näherungen der erhaltenen apparenten Dissoziationskoeffizienten K'_D .

verhindert und dadurch zu einer geringeren Bindungsaffinität führt. Ebenso wurde gezeigt, dass von einer ähnlichen Proteinorientierung auf beiden Partikeln ausgegangen werden kann.

Im folgenden Kapitel werden die erhaltenen Ergebnisse und verwendeten Messmethoden diskutiert.

Kapitel 4

Diskussion der Ergebnisse und Messmethoden

4.1 C3 Aktivierung durch Lipidoberflächen

Mit der vorliegenden Arbeit konnte die Aktivierung des C3 Proteins und damit des Komplementsystems durch Phospholipidoberflächen aufgezeigt werden. Die im vorausgehenden Kapitel dargestellten Ergebnisse sollen nun diskutiert werden, um diesen wissenschaftlichen Sachverhalt nochmals deutlich herauszuarbeiten. Dabei wird mit den Ergebnissen zur Komplementaktivierung begonnen. Anschließend werden die Interaktionsstudien an planaren und stark gekrümmten Lipidoberflächen diskutiert.

4.1.1 Komplementaktivierung

Durch diese Arbeit konnte mit Immunoassayverfahren (ELISA) gezeigt werden, dass DMPC Liposomen in Lepirudin-Plasma das Komplementsystem aktivieren. Diese Aktivierung findet in der flüssigen Phase statt und ist unabhängig vom Alternativen Komplementweg.

Die Reaktionsprodukte C3a und sC5b-9 wurden jeweils durch ein Immunoassayverfahren (ELISA) detektiert und deren Konzentration kolorimetrisch bestimmt. Lepirudin-Plasma besteht aus menschlichem Blutplasma, dessen Gerinnung durch den Thrombininhibitor Lepirudin unterbunden wurde. Dadurch konnte unabhängig vom Gerinnungssystem die Komplementaktivierung

ung untersucht werden, die nicht von Lepirudin beeinflusst wird. Beide Reaktionsprodukte C3a und sC5b-9 des Komplementsystems, die auf die Aktivierung von C3 folgen, konnten nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 2.7). Dabei wurde eindeutig eine Zeitabhängigkeit der detektierten Reaktionsproduktkonzentration innerhalb 60 min gezeigt. Sowohl der C3 Inhibitor Compstatin, als auch die Chelatoren EDTA und EGTA konnten die Reaktion unterbinden und führten zu keiner messbaren Erhöhung der Konzentration, weder von C3a noch von sC5b-9. Da der Alternative Komplementweg nur von Mg^{2+} , der Klassische Komplementweg von Mg^{2+} und Ca^{2+} abhängt, kann durch die Verwendung von EGTA, das hauptsächlich Ca^{2+} bindet, im Gegensatz zu EDTA, das hauptsächlich Mg^{2+} bindet, zwischen den Aktivierungswegen unterschieden werden [145]. Der Alternative Komplementweg kann dadurch ausgeschlossen werden.

Der Mechanismus, auf welche Weise das Komplementsystem bei der medizinischen Anwendung durch lipidverkapselte Arzneimittel oder lipidumhüllte Kontrastmittel aktiviert wird, ist bisher noch nicht vollständig verstanden. Es ist bekannt, dass in der medizinischen Anwendung neutrale Lipide im Vergleich zu geladenen Lipiden oder Lipidgemischen mit Cholesterol eine längere Aufenthaltsdauer im Blutkreislauf aufweisen und deshalb als schwache Aktivatoren gelten. Vorausgehende Studien haben bereits gezeigt, dass das Komplementsystem durch negativ geladene Phospholipide mittels Klassischem Weg durch direkte Interaktion mit C1q aktiviert wird [159]. Allerdings wurde in der Literatur ebenso erwogen, dass der Aktivierungsmechanismus anders zur direkten Immunglobulin-abhängigen C1q Aktivierung verlaufen kann und das C-reaktive Protein (CRP) darin involviert ist [160]. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass positiv geladene Lipide das Komplementsystem über den Alternativen Weg aktivieren [17,33,36,161]. Trotz längerer Verweildauer von neutralen Liposomen in menschlichem Serum oder Plasma wird die Bindung von Komplementproteinen daran gemessen [162], jedoch ist der Mechanismus nicht geklärt. Während der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von EGTA die Aktivierung des Komplementsystems verhindert. Dies zeigt, dass die Aktivierung Ca^{2+} -abhängig und damit nicht der Alternative Weg dafür verantwortlich ist, sondern nur Klassischer oder Lektin Weg in Betracht kommen. Weitere Untersuchungen, die hier nicht dargelegt wurden, konnten zeigen, dass C1q für die Komplementaktivierung bei neutralen Lipidoberflächen mitverantwortlich ist.

4.1.2 Planare Lipidoberflächen

Durch die Untersuchungen an planaren Lipidoberflächen konnte eine Bindung von C3 an diese gezeigt und die gebundene C3 Konformation als aktive Form C3(H₂O) detektiert werden.

Eigene Untersuchungen mittels SDS-PAGE Analysen und Beispiele aus der Literatur zeigen deutlich, dass an Liposomen, die in Blutserum inkubiert worden waren, eine Vielzahl an gebundenen Proteinen nachgewiesen werden kann [163, 164]. Sabin et al. [165] zeigten konkret die Bindung der Proteine Fibrinogen und IgG an DMPC Liposomen. Die Anlagerung von C3 an Liposomenoberflächen wurde in der Literatur belegt [34, 166] und sollte in der vorliegenden Arbeit spezifisch durch die Untersuchung der Liposomenoberflächen ergänzt werden. Im Folgenden wurde von einem Untersuchungssystem in Lepirudin-Plasma zu einer gezielten Untersuchung der C3 Interaktion in einem aufgereinigten System aus reinem C3 übergegangen. Dadurch konnten Einflüsse auf die Bindungsreaktionen durch weitere Proteine und Faktoren ausgeschlossen werden, und grundlegende Studien zum Mechanismus der direkten C3 Aktivierung durchgeführt werden.

Qualitative Untersuchungen wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotting mit einem polyklonalen Antikörper gegen die 40 kDa Kette der α -Kette und die gesamte β -Kette durchgeführt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das C3 Molekül nicht in einen C3a und einen C3b Teil gespalten wurde, wie es durch die bekannte proteolytische Aktivierungsreaktion geschieht. Vielmehr war das Protein in seiner ganzen Länge auf der Liposomenoberfläche gebunden. Weitere Überlegungen führten zur Hypothese, dass C3 in der aktiven Form des C3(H₂O) vorlag. Untersuchungen mit Faktor I und Ko-Faktor H zeigten, dass die Form des vorliegenden C3 eine aktive Form darstellte und mittels der beiden Faktoren aufgetrennt werden konnte. Beide Faktoren können ausschließlich mit einer aktivierten C3 Form reagieren, da in der inaktivierten Form Bindungs- und Schnittstellen verdeckt sind. Die anschließenden Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern, die die verschiedensten Epitope des C3 spezifisch nachweisen konnten, lieferten detaillierte Informationen über die Konformation des gebundenen C3. Dadurch wurde die Hypothese der Bindung von C3(H₂O) auf der Oberfläche bekräftigt. Untersuchungen, die nicht dargestellt wurden, belegen zudem, dass durch Zugabe von Komplementsystem-Inhibitoren, die Bindung von C3

an die Oberfläche nicht unterbunden werden konnte. Dies zeigt eindeutig, dass eine nicht-proteolytische Aktivierung der Komplementkaskade vonstatten gegangen sein muss, die zur Aktivierung und Bindung von C3 geführt hat.

Der in der vorliegenden Untersuchung verwendete Nachweis zur Schlussfolgerung auf eine Konformationsänderung zu C3(H₂O) wurde in vorausgehenden Studien ebenso verwendet. Auf diese Weise konnte die Veränderung von nativem C3 zu C3(H₂O) analog an Polystyroloberflächen [167], Blutplättchen [168], der Blut-Gas Grenzfläche [169] und Plasma-Gas Grenzfläche [170] gezeigt werden. Die beiden letztgenannten konnten durch Immunoassays (ELISA) in Flüssigkeit untersucht werden, da die Gasblasen aus der Flüssigkeit entwichen und C3(H₂O) in der flüssigen Phase direkt mit geeigneten Antikörpern nachgewiesen werden konnte. Von den vorgestellten Studien ist Hamad et al. [168] besonders zu erwähnen, da es sich hierbei wie in der vorliegenden Arbeit um Lipidoberflächen, genauer um aktivierte Blutplättchen und Mikropartikel, die aus Blutplättchen hervorgehen, handelt. Ein ähnlicher Mechanismus kann vermutlich die Konformationsänderung von C3 zu C3(H₂O) durch DMPC Liposomen erklären.

Um ein mehr **quantitatives Ergebnis** der Bindungsreaktion zu erlangen, wurden Experimente mit der Schwingquarzwage (QCM-D) durchgeführt. Dabei ging es neben der Quantifizierung der C3 Bindung um die Detektion der Konformationsänderung C3 zu C3(H₂O). Es wurde ein ähnliches Bindungsverhalten von C3 an Liposomen (Durchmesser 170 nm) und planare Lipidoberflächen erwartet, da bei Betrachtung der Proteingröße die Krümmung der Liposomen vernachlässigbar ist. Die Messungen mit der Schwingquarzwage bestätigten die vorhergehenden Messungen, dass C3 eine stabile Proteinschicht auf einer vorgelegten DMPC Lipiddoppelschicht bildet und in der Form C3(H₂O) vorlag. Durch die Messung der Frequenzverschiebung und Dämpfung ließ sich eine Bedeckung der Oberfläche mit gebundenem C3 von 15 – 30% detektieren, verwendet man die von Janssen et al. [146] vorgeschlagenen Maße des C3 Proteins. Nilsson et al. [171] zeigten, dass gebundenes C3 auf Polymeroberflächen bei einer derartig geringen Proteindichte gänzlich entfaltet vorliegt und der Konformation des C3(H₂O) entspricht. Die sukzessive Zugabe von Ko-Faktor H und Faktor I zeigten einen Einfluss auf das gebundene C3 Protein, sowohl in der Frequenz als auch in der Dämpfung. Dies kann nur dann geschehen, wenn C3 in der Form des C3(H₂O) vorliegt, da sonst die Angriffspunkte für diese Faktoren am Protein verdeckt sind.

Betrachtet man die Konformationsänderung vom nativen C3 zur gebundenen Form des C3b, iC3b oder C3dg, zeigt sich diese als Darstellung von Neoepitopen auf der Oberfläche, d.h., einer Markierung, die zu weiteren Reaktionsprozessen führt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung von C3 in der Form des C3(H₂O) ein solcher **biologischer Mechanismus** zugrunde gelegt werden kann, ähnlich der proteolytisch aufgespaltenen C3 Fragmente und Aktivierungsprodukte (C3b, iC3b, C3dg), die aus der Literatur bekannt sind. Um der Frage nach der biologischen Relevanz der vorliegenden Ergebnisse abschließend Antwort zu leisten, soll diese Diskussion mit Untersuchungsergebnissen abgeschlossen werden, auf die in den vorangehenden Kapiteln nicht eingegangen wurde. Diese sind allerdings für ein Gesamtbild der Interaktion von C3 mit Liposomen bzw. planaren Lipidoberflächen anzuführen: Um zu untersuchen, ob die Komplementaktivierung und die Bindung von C3(H₂O) an die Liposomen eine biologische Funktion im Umsatz in Vollblut aufweisen, wurde die Phagozytose von Liposomen in Vollblut analysiert [143]. Es konnte gezeigt werden, dass Liposomen sowohl in der Membran als auch im Zytoplasma der Granulozyten aufgenommen wurden. Sowohl der C3 Inhibitor Compstatin, als auch ein weiterer Komplementsysteminhibitor (C5aR-Antagonist) konnten diesen Vorgang verhindern. Dies zeigt deutlich, dass C3(H₂O) bedeckte Liposomen entweder gebunden oder aufgenommen werden können an bzw. durch Granulozyten. Dadurch konnte eine biologische Funktion des gebundenen C3(H₂O) als mitverantwortlicher Initiator der Reaktionskaskade nachgewiesen werden.

4.1.3 Stark gekrümmte Lipidoberflächen

In Bezug auf stark gekrümmte Lipidoberflächen wurde gezeigt, dass C3 mit Bindungsaffinitäten im mikromolaren Bereich an diese binden kann. Da keine Sättigung der Bindungskurve erzielt werden konnte, waren Vergleichsmessungen nötig. Diese wurden mit Quantenpunkten derselben Materialkomposition (CdSe/ZnS), allerdings ohne Lipidhülle, dafür mit einem Liganden aus Dihydroliponsäure (DHLLA) auf der Oberfläche, durchgeführt. Das Bindungsverhalten an beide Nanopartikel von weiteren Serumproteinen (menschliches Serumalbumin, menschliches Serum und Apolipoprotein E3) wurde untersucht.

Zur Untersuchung von stark gekrümmten Lipidoberflächen wurde während dieser Arbeit eine **Methode** ausgearbeitet. Quantenpunkte wurden mit Lipiden umhüllt und - nach ausführlicher Charakterisierung - mittels Zwei-Fokus-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (2fFCS) untersucht. Die Kombination aus Lipidquantenpunkten und 2fFCS zur Analyse von Bindungsereignissen ist bisher in der Literatur noch nicht zu finden.

Bei der **Bindungsstudie von C3** an Lipidquantenpunkte konnte ein Radiuszuwachs mit zunehmender Proteinkonzentration aufgezeichnet werden. Allerdings konnte die C3 Konzentration zu nicht mehr als $30 \mu\text{M}$ erhöht und dadurch keine vollständige Bindungskurve erhalten werden. Um dennoch Bindungsaffinitäten auflösen zu können, wurden Vergleichsmessungen an DHLLA-Quantenpunkten durchgeführt. Die verwendeten Nanopartikel sind sowohl in der Größe (DHLLA-QDs: $R_h = 4,8 \pm 0,2 \text{ nm}$; Lipid-QDs: $R_h = 6,8 \pm 0,1 \text{ nm}$) und damit in der Krümmung, als auch im ζ -Potential vergleichbar (DHLLA-QDs: $\zeta = -24,6 \pm 2,2 \text{ mV}$; Lipid-QDs: $\zeta = -9,3 \pm 0,5 \text{ mV}$).

Für beide Nanopartikel wurde das Volumenmodell (vgl. Unterkapitel 2.3) zur Berechnung der Parameter verwendet. Dazu wurde die aufgelagerte Proteinschicht als Volumenzuwachs betrachtet und damit apparenter Dissoziationskoeffizient K'_D , Hillkoeffizient n , sowie die maximale Anzahl an gebundenem Protein berechnet. Betrachtet man die erhaltenen Parameter, so zeigt sich, dass bei großen Proteinen wie dem C3 die maximale Anzahl an Proteinen überschätzt wird, da nicht die komplette Proteinhülle mit Protein ausgefüllt ist. Die Dicke der aufgelagerten Proteinschicht, d.h., der maximale hydrodynamische Radiuszuwachs, kann mit der molekularen Proteingeometrie in Verbindung gebracht werden. Ein Vergleich mit dem elektrostatischen Poten-

tial des Moleküls zeigt, dass die positiv geladene Proteinseite an die Partikeloberfläche gebunden haben muss. Mit dem erhaltenen Radiuszuwachs der C3-DHLA-Quantenpunkt Messungen konnte die Bindungsaffinität an die Lipidquantenpunkte bestimmt werden (Lipid-QDs: $K'_D = 270 \pm 90 \mu\text{M}$). Die Bindungsaffinität an die DHLA-Quantenpunkte lag deutlich höher als an die Lipidquantenpunkte (DHLA-QDs: $K'_D = 15 \pm 4 \text{ nM}$). Allerdings muss hier beachtet werden, dass bei einer solch hohen Bindungsaffinitäten die freie Proteinkonzentration abgeschätzt werden musste, die jedoch einem Fehler unterliegt. Aus diesem Grund ist bei diesen sensitiven Messungen der Wert der Bindungsaffinität nicht als absoluter Wert zu nehmen, sondern es kann die Aussage getroffen werden, dass die Bindungsaffinität im nanomolaren Bereich liegt. Eine weitere Bemerkung zur Messung der C3 Bindung an DHLA-Quantenpunkte ist der Hillkoeffizient, der zudem in einem solchen Fall überschätzt wird, d.h., die Bindungskurve zu steil verläuft aufgrund der umgehenden Bindung von C3 an die Partikel.

Annahme für die Abschätzung der Bindungsaffinität an die Lipidquantenpunkte durch die Messungen an den DHLA-Quantenpunkten war, dass von derselben Proteinorientierung auf beiden Nanopartikeln ausgegangen werden kann. Um diesen Sachverhalt zu bestätigen, und ebenso weiteren Aufschluss über die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten an beide Nanopartikel zu erhalten, wurden Untersuchungen mit **weiteren Serumproteinen** durchgeführt: menschliches Serumalbumin (HSA), menschliches Serum mit einer Vielzahl an Proteinen, Apolipoprotein E3 (ApoE3). Bei allen Vergleichsmessungen konnte gezeigt werden, dass eine größere Bindungsaffinität an DHLA- als an Lipidquantenpunkten besteht. Molekulare Proteindimension und gemessener Radiuszuwachs stimmen, sofern die Messparameter eine Abschätzung zulassen, überein und können mit dem elektrostatischen Potential in Verbindung gebracht werden. Im Allgemeinen können durch den Kontakt mit der Oberfläche Konformationsänderungen der Proteine entstehen. Allerdings weisen ebenso die durch diese Arbeit erhaltenen Ergebnisse darauf hin, dass die Gesamtstruktur der Proteine trotz Bindungsereignis erhalten bleibt. Dadurch, dass über den Radiuszuwachs eine Aussage über die Orientierung des Proteins auf der Oberfläche getroffen werden kann, zeigt sich, dass das elektrostatische Potential ausschlaggebend für die Orientierung des Proteins auf der Oberfläche zu sein scheint. Dies bedeutet, dass nicht die Gesamtladung für Bindungsereignisse, sondern die Ladungsverteilung von Bedeutung ist, wie bereits bei Maffre et al. [81] für die Bindung unterschiedlicher

Serumproteine auf Eisen-Platin-Partikeln herausgearbeitet wurde. Mit Beachtung des elektrostatischen Potentials können folgende Aussagen für die einzelnen Proteine getroffen werden

- HSA, mit einem Molekulargewicht von 67 kDa, band an beide Partikel mit der positiven Grundseite, das zu einem maximalen Radiuszuwachs von ≈ 3 nm führte. Im Vergleich wurde eine um Faktor $100\times$ geringere Affinität zu den lipidbeschichteten Quantenpunkten aufgezeigt. Besonders interessant ist, dass im Vergleich mit allen gemessenen Bindungsaffinitäten an DHLA-Quantenpunkten keine Affinität im nanomolaren Bereich, sondern im mikromolaren Bereich aufgezeigt wurde. Für beide Nanopartikel ergab der Hillkoeffizient ein leicht antikooperatives Verhalten der Bindungsreaktion.
- C3, mit einem Molekulargewicht von 187 kDa, band ebenfalls mit der positiven Grundseite an die DHLA-Quantenpunkte, das zu einem Radiuszuwachs von ≈ 15 nm führte. Angewandt zur Abschätzung der Bindungsaffinität für die Lipidquantenpunkte, ergab sich im Vergleich eine um Faktor $10000\times$ geringere Affinität zu diesen. Betrachtet man die erhaltenen Hillkoeffizienten, zeigt sich für die DHLA-Quantenpunkte ein stark kooperatives Verhalten, das allerdings mit der Berechnung der freien Proteinkonzentration in Verbindung gebracht werden muss und möglicherweise keine Kooperativität im eigentlichen Sinn darstellt. Für Lipidquantenpunkte liegt weder eine kooperative noch antikooperative Bindungsreaktion vor.
- Menschliches Serum band mit einer um Faktor $1000\times$ geringeren Affinität an die Lipidquantenpunkte. Die Hillkoeffizienten lagen um den Wert 1 bzw. für DHLA-Quantenpunkte zeigte sich ein leicht antikooperatives Verhalten. Von einem realen Dissoziationskoeffizienten kann aufgrund der fehlenden Möglichkeit eine molare Konzentration angeben zu können, nicht gesprochen werden. Ein Vergleich zwischen beiden Partikeln hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität ist allerdings möglich. Interessant ist zudem, dass sich ein unterschiedlicher maximaler Radiuszuwachs (Unterschied ≈ 1 nm) an beiden Partikeln ergab. Dies kann durch eine unterschiedliche Zusammensetzung der Proteinbeladung erklärt werden.
- ApoE3, mit einem Molekulargewicht von 34 kDa, führte bei den Bindungsmessungen an DHLA-Quantenpunkten zu einem maximalen

Radiuszuwachs von $\approx 8,5$ nm. Zum einen ist es möglich, dass das Protein mit der 3 nm kurzen oder zum anderen mit der 6 nm langen Grundfläche an die Nanopartikel bindet. Vergleicht man den Radiuszuwachs mit der molekularen Proteingeometrie, muss der flexible α -Helix Bereich von der Oberfläche abstehen. Dadurch lässt sich der Radiuszuwachs erklären. Für die Bindung an Lipidquantenpunkten konnte keine Sättigung der Bindungskurve erreicht werden. Zwei Konformationen des Proteins auf der Lipidoberfläche sind möglich: Entweder in derselben Weise wie auf DHLA-Quantenpunkte, oder in einer entfalteten Form, wie in Saito et al. [157] beschrieben wird. Eine genauere Analyse ist aufgrund der Löslichkeit von ApoE3 nicht möglich, da keine Messungen bei höheren Proteinkonzentrationen durchführbar sind. Dennoch ergibt sich für die Abschätzung der Bindungsaffinität im Vergleich eine um mindestens Faktor 10000 \times geringere Affinität zu den Lipid- als zu den DHLA-Quantenpunkten, ähnlich wie bei C3. Beachtet man, dass Apolipoproteine für den Stoffwechsel von Lipoproteinen eine bedeutende Rolle innehaben, ist die geringe Bindungsaffinität ein unerwartetes Ergebnis. Betrachtet man den Hillkoeffizienten zeigt dieser ein kooperatives Verhalten für DHLA-Quantenpunkte.

Die geringe Bindungsaffinität zu den Lipidquantenpunkten ist biologisch sinnvoll, da bei umgehender Bindung der im menschlichen Blut auftretenden Proteinen an körpereigene Lipidoberflächen dies fortlaufend zu starken Immunreaktionen führen würde. DHLA-Quantenpunkte werden dagegen umgehend als Fremdkörper erkannt und das Immunsystem zur Beseitigung aktiviert. Die Lipidhülle schützt somit Nanopartikel vor Proteinbindung und folglich einer schnellen Aktivierung des Immunsystems. Dies ist besonders auffällig bei der Bindungsmessung mit dem C3 Protein und ApoE3. Beide weisen eine um Faktor 10000 \times geringere Bindungsaffinität an Lipid- als an DHLA-Quantenpunkten auf. Der Unterschied in der Bindungsaffinität von menschlichem Serum als Gemisch von HSA, ApoE3, C3 und weiteren Proteinen liegt genau im Zwischenbereich von HSA und den beiden Proteinen C3 und ApoE3, was zu erwarten war.

4.1.4 Vergleich planarer und stark gekrümmter Lipidoberflächen

Die geringe gemessene Bindungsaffinität an die stark gekrümmten Lipidoberflächen bestätigt die Messungen an den planaren Lipidoberflächen. Eine maximale Belegung der planaren Lipidoberfläche von 30% wurde erreicht. Schätzt man mit dieser Größe die Bindungsaffinität grob ab, liegt diese im unteren mikromolaren Bereich, d.h., zwischen 1–5 μM . Die Bindungsaffinität ist mit dieser Abschätzung höher als zu stark gekrümmten Oberflächen. Dies bestätigt ebenso vorausgehende Untersuchungen [38,39]. Geht man von einer nicht-proteolytischen Konformationsänderung des C3 Proteins an planaren Oberflächen aus, kann es bei gekrümmten Oberflächen zur selben Veränderung in die aktive Form des C3(H₂O) und dadurch zu einer Bindung der Proteine kommen. Damit wurde gezeigt, dass C3 an planare und stark gekrümmte Oberflächen eine geringe Bindungsaffinität aufweist, die auf einen Wertebereich im mikromolaren Bereich festgesetzt werden konnte. Des Weiteren wurde gezeigt, dass trotz gleicher Größe, Krümmung und Oberflächenladung von DHLA- und Lipidquantenpunkten, die Lipide vor Proteinbindung schützen und die Bindungsaffinität dadurch sehr klein wird.

4.2 Methoden zur Klärung der C3 Aktivierung

Nach der Diskussion der erzielten Ergebnisse sollen die verwendeten Untersuchungsmethoden einzeln betrachtet und gegenübergestellt werden.

4.2.1 Einzelbetrachtung

Immunoassay (ELISA)

Durch Immunoassays konnte die Komplementaktivierung anhand der Konzentrationsbestimmung von Reaktionsprodukten der Komplementkaskade in der flüssigen Phase untersucht werden.

In der Biochemie zählen Immunoassays (ELISA) zu den Standardverfahren. Aufgrund langjähriger Erfahrung der Kooperationspartner konnte auf etablierte Protokolle und spezifische Antikörper zurückgegriffen werden [172–174]. Für diese Arbeit waren die Reaktionsprodukte C3a und sC5b-9 von Bedeutung, die mit dieser Methode nur in der flüssigen Phase nachgewiesen werden konnten. Grund hierfür ist, dass gebundene Proteine für den Fangantikörper nicht zugänglich sind. C3a ist generell als Anaphylatoxin nicht an Oberflächen gebunden. Das Membran-gebundene C5b-9 konnte nicht nachgewiesen werden, sodass auf die lösliche Form sC5b-9 als Indikator zurückgegriffen wurde. Bei dieser antikörperbasierten Standardmethode muss betont werden, wie wichtig es ist, dass spezifische Antikörper vorhanden sind. Je spezifischer die Anforderungen, desto teurer sind diese allerdings. Weiter müssen unspezifische Bindungen an die Antikörper und die verwendeten Gefäßwände unterbunden werden.

Die Methode liefert ein qualitatives Ergebnis, allerdings sollten die erhaltenen Konzentrationsbestimmungen nicht als absolut betrachtet werden. Die schrittweise Detektion aus Fangantikörper, Probe, Detektionsantikörper, Enzymreaktion und kolorimetrischer Messung kann zu Messfehlern führen. Empfehlenswert ist deshalb immer, drei unabhängige Messungen gleichzeitig durchzuführen. Zudem wird nicht direkt, zeitaufgelöst oder auf Einzelmolekülebene beobachtet, sondern ein gemitteltes, großes Ensemble betrachtet.

Immunoblot

Die Methode des Immunoblot stellte eine Möglichkeit dar, spezifisch Bereiche des C3 Proteins, gebunden auf der Liposomenoberfläche, nachzuweisen und damit die Konformation des C3(H₂O) aufzulösen.

Immunoblotting ist ebenso eine antikörperbasierte Standardmethode der Biochemie mit vielen bereits erprobten Protokollen. Auf diese Weise konnte zuerst mit einem polyklonalen Antikörper das gebundene C3 Protein auf der Liposomenoberfläche detektiert werden und im Anschluss daran mit vier monoklonalen Antikörpern die α -Kette des gebundenen C3 regelrecht abgetastet werden. Generell gelten dieselben Herausforderungen, die bereits für das Immunoassayverfahren (ELISA) diskutiert wurden. Detektierte Proteinbanden können spezifisch aufgezeichnet und eindeutig Antwort geben, ob eine Bande detektiert werden kann oder nicht. Da eine quantitative Analyse nicht möglich ist, sollten zwei Proben nur qualitativ miteinander verglichen werden: Gelingt eine exakte Probenherstellung, können bereits beim Auftragen der Probe zur Analyse mit SDS-PAGE Konzentrationsschwankungen auftreten, die weiter durch die Übertragung auf eine Membran und Detektion mit Antikörpern (Immunoblotting) verstärkt werden.

Schwingquarzwaage

Durch die Methode der Schwingquarzwaage konnten zeitaufgelöst und quantitativ C3-Lipid-Interaktionen aufgezeichnet und die Konformation des gebundenen C3 nachgewiesen werden.

Das biophysikalische Messverfahren der Schwingquarzwaage (QCM-D) ist ein sensorbasiertes, sehr anwenderfreundliches Verfahren, das zur Messung von Bindungsreaktionen geeignet ist. Der Aufbau ist einfach zu bedienen, und außer dem Einbau des Sensors, Temperatureinstellung und Spülen muss nichts am Gerät verändert werden. Durch unterschiedliche Beschichtungen der Sensoren ergibt sich ein breites Anwendungsgebiet. Oftmals wird die Methode mit anderen Untersuchungsverfahren kombiniert, um mehr Einblicke in die Beschaffenheit des aufgelagerten Probenmaterials zu bekommen. Als Beispiel seien hier die Ellipsometrie [175, 176] und Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*; AFM) [177, 178] genannt. Gerade zur Untersuchung von Lipiddoppelschichten und der Proteinbindung daran, besitzt diese Methode zur Klärung biologischer und medizinischer Fragestellungen ein hohes Maß an Bedeutung [179, 180]. Eine Anlagerung von Proteinen auf die Lipidoberfläche kann durch die Frequenzverschiebung detektiert werden; eine Aussage über Flexibilität und Steifigkeit der Oberfläche kann durch die Messung der Dämpfung getroffen werden. Alle Messungen werden zeitaufgelöst in Echtzeit aufgenommen. Der Abstand Lipiddoppelschicht-Sensor liegt bei 5 – 6 nm, sodass ein genügend großer Abstand zwischen Untergrund und

Lipid-Protein-Interaktionsfläche gegeben ist, um eine Beeinflussung auszuschließen. Die dargebotene Lipidoberfläche liegt bei ca. 3 cm^2 . Dadurch ist eine große Fläche zur Interaktion geboten, allerdings wird damit ebenso über einen großen Bereich gemittelt. Nachteil der Methode ist, dass Defekte in der Lipidschicht oder allgemein der Sensorbeschichtung nicht ausgeschlossen werden können. Kleinere Defekte können aufgrund der starken Mittelung unbemerkt bleiben. Gerade bei der Messung von Protein-Lipid Interaktionen ist dies ein wichtiger Sachverhalt, der beachtet werden muss. Kleinere Proteine können in diesem Fall durch die Lipiddoppelschicht hindurchwandern und eine Verschiebung der Frequenz und Dämpfung hervorrufen, ohne dass es sich um eine Interaktion Lipid-Protein handelt. Von daher ist es sinnvoll, durch weitere unabhängige Messungen das erzielte Ergebnis zu bekräftigen. Vergleicht man die Proteinkonzentration, die in die Messkammer eingegeben wird, mit dieser, die tatsächlich in die Messzelle gelangt, kann nicht davon ausgegangen werden, dass beiden Konzentrationen gleich sind. Genaue Analysen, ausgehend von der Annahme die zugegebene Proteinkonzentration zu kennen, sind schwer möglich, ebensowenig wie aus dem berechneten Massenzuwachs Bindungsaffinitäten zu erhalten. Mit wachsender Schichtdicke sinkt zudem die Sensitivität. Ein Probenvolumen von mindestens 1 ml ist oft herausfordernd.

Lipidquantenpunkte und 2fFCS

Durch die Kombination aus Lipidquantenpunkten und 2fFCS konnte die Bindung von C3 an stark gekrümmte Lipidoberflächen untersucht werden. Zuerst sollen im Folgenden Lipidquantenpunkte, sowie deren Charakterisierungsmethoden, und im Anschluss die Messungen mit 2fFCS diskutiert werden.

- **Lipidquantenpunkte**

Quantenpunkte sind kommerziell erhältlich, und viele Protokolle ermöglichen deren Herstellung. Ihre Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche Fragestellungen besticht durch ein breites Absorptionsspektrum, das zu einer großen Auswahl an Anregungswellenlängen führt, einen scharfen Emissionspeak mit geringer Halbwertsbreite als Parameter für Homogenität, und einer starken Helligkeit, die eine geringe Probenkonzentration erlaubt. Durch Variation der Größe können unterschiedliche Emissionswellenlängen generiert werden.

Da die Oberfläche der Quantenpunkte variabel gestaltbar ist, können durch unterschiedliche Liganden verschiedene Oberflächenbeschaffenheit generiert werden. Dadurch ist es möglich, Lipide durch hydrophobe Wechselwirkung

anzubringen. Lipidquantenpunkte sind in der Literatur bereits bekannt [99, 181] und dienen in dieser Arbeit als Lipidoberfläche/Membranmodell mit starker Krümmung und Messsignal für die Untersuchung der Lipid-C3 Interaktion. Die starke Krümmung der Oberfläche stellt sicherlich eine Herausforderung für Bindungsereignisse dar. In der Natur haben wenige Lipidpartikel eine solch starke Krümmung. Dennoch gibt es Beispiele, wie Lipoproteine niedriger Dichte (*low-density lipoprotein*; LDL), mit einem Durchmesser von 18 – 25 nm oder Lipoproteine hoher Dichte (*high-density lipoprotein*; HDL) mit einem Durchmesser von 4 – 7 nm. Dafür stellen Lipidquantenpunkte ein sehr gutes Modell dar [182]. Medizinisch betrachtet leistet LDL einen Beitrag für, HDL einen Beitrag gegen die Entstehung von Arteriosklerose und sind aus diesem Grund ebenso in diesem Forschungsbereichen von Bedeutung. Als Anwendungsbeispiel können mit dem Modell der Lipidquantenpunkte Untersuchungen zum besseren Verständnis der initialen Prozesse der Krankheit durchgeführt werden [183, 184].

Zur Verwendung der Lipidquantenpunkte für die Untersuchung der Lipid-C3 Interaktion, wurde diese Interaktion durch keine weiteren Einflüsse gestört. Der Abstand der Lipide zum aufliegenden Quantenpunkt lag bei 1,5 – 2 nm und eine fluoreszente Markierung musste weder am Protein, noch direkt an der Interaktionsfläche angebracht werden. Ein Einfluss der Fluoreszenzmarkierung auf das C3 Protein und auf die Interaktionsfläche konnte ausgeschlossen werden. Defekte bzw. Fehlstellen in der Lipidhülle sind eher unwahrscheinlich, da Lysophospholipide verwendet wurden, die eine dichte Packungsdichte der Lipidoberfläche aufgrund der einzelnen Fettsäurekette pro Lipid gewährleisten. Fehlstellen durch fehlende Lipide auf der Oberfläche sind unwahrscheinlich, da die Kopfgruppen die hydrophoben Schwanzgruppen gegenüber der wässrigen Phase abgrenzen. Allerdings stellt das Auftreten dunkler Quantenpunkte bei der Analyse der Bindungsaffinitäten eine Herausforderung dar. Unbeobachtet leisten diese bei der Berechnung der Bindungsaffinität dennoch einen Beitrag.

- **Charakterisierungsverfahren**

Absorptions- und Emissionsmessungen: Quantenpunkte besitzen ein breites Absorptionsspektrum und einen schmalen Emissionspeak. Durch die Form des Absorptionsspektrum wird eine variable Anregung der Quantenpunkte zur Fluoreszenz ermöglicht, in einem Wellenlängenbereich, der von der Emissionswellenlänge weit entfernt liegt. Die Fluoreszenzemission mit einer Halbwertsbreite von 26 nm zeigt, dass die Quantenpunkte eine homo-

gene Größe und einen homogenen Aufbau aus Kern und Schale besaßen. Da die Emissionswellenlänge stark vom Material und damit von der Bandstruktur abhängt, schlagen sich Unterschiede in Größe und Struktur direkt in der Emission nieder.

Größenvergleich: Durch verschiedene Messmethoden ergaben sich unterschiedliche Radien der (Lipid)Quantenpunkte, die in Tabelle 4.1 zusammengefasst sind. Die Unterschiede können hauptsächlich durch Probenpräparation bzw. Genauigkeit des Messverfahrens begründet werden: DLS und 2fFCS liefern ähnliche Ergebnisse, da beide Verfahren den hydrodynamischen Radius in Lösung aufzeichnen. TEM Ergebnisse führen zu einem kleineren gemessenen Radius, da nicht der hydrodynamische Radius vermessen wird.

Tabelle 4.1: Gegenüberstellung der Größenmessungen und der daraus resultierenden Dicke der Lipidhülle der Lipidquantenpunkte.

	DLS	2fFCS	TEM
Quantenpunkte (nm)	$3,9 \pm 0,2$	$4,3 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,4$
Lipidquantenpunkte (nm)	$6,8 \pm 0,9$	$6,8 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,5$
Lipidhülle (nm)	$2,9 \pm 0,9$	$1,7 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,6$

Lichtstreuung: Mit der Methode der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) konnte der hydrodynamische Radius der (Lipid)Quantenpunkte und die Homogenität in Lösung aufgezeichnet werden. Das Verfahren ist etabliert und ohne größeren Zeitaufwand als Standardmethode im Labor anwendbar. Allerdings wird kein spezifisches Messsignal eines bestimmten Partikels wie bei der Fluoreszenzmessung detektiert, sondern die Streuung an allen Objekten in der Lösung aufgezeichnet. Die Angaben des Herstellers liegen für die Messgenauigkeit eines Latexstandards bei $\pm 2\%$, können aber nicht für alle Messproben so übernommen werden. Der Fehler liegt unter anderem an der Strahlenform des Lasers, an der Detektionsmöglichkeit im Winkel von 173° , der Mittelung über ein großes Ensemble und der unkontrollierten Streuung an den Partikeloberflächen. Weiter gilt, dass es schwierig ist, fluoreszierende Partikel mit DLS zu untersuchen, da Fluoreszenz einen Störfaktor in der Messung darstellt. Dies gilt hauptsächlich für fluoreszente Messproben, die mit einer Wellenlänge des Zetasizers angeregt werden können. Durch Elektrophoretischen Lichtstreuung konnte das ζ -Potential bestimmt

werden, das leicht negativ für die Lipidquantenpunkte in PBS ist. Erhaltene Ergebnisse unterschiedlicher Proben können nur dann gegenübergestellt werden, wenn dasselbe Puffersystem verwendet wurde, da unterschiedliche Ionenkonzentrationen das ζ -Potential beeinflussen. Beispielsweise verändert sich der Wert des ζ -Potentials der Lipidquantenpunkte in PBS mit Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen von $\zeta = -9,3 \pm 0,5$ mV zu $\zeta = -13,5 \pm 1,1$ mV für PBS ohne Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen, da weniger Ionen zur Abschirmung des Potentials vorhanden sind. Bei den ζ -Potential-Küvetten für den Einmalgebrauch muss darauf geachtet werden, ob die Elektroden durch die Messung oxidierten. Aus diesem Grund sind mehrfach verwendbare Küvetten von Vorteil, bei denen die Elektroden nicht direkt in Kontakt mit der Lösung kommen. Zudem ist es wichtig, dass mehrere Messungen (> 3) durchgeführt werden, um das Ergebnis zu überprüfen.

Die Bestimmung des ζ -Potentials war von Bedeutung, um die Orientierung der Proteine auf der Oberfläche zu verstehen.

TEM: Mit TEM konnte die Struktur der Quantenpunkte, der Radius der (Lipid)Quantenpunkte und damit die Dicke der Lipidhülle bestimmt werden. Die Betrachtung eines größeren Probenausschnittes zeigte, dass die Lipidquantenpunkte nicht agglomerierten.

Im Vergleich zu dem Quantenpunktkern weisen Lipide eine geringere Ordnungszahl auf und mussten zuvor mit Osmium eingefärbt werden. Es kann nur eine ungefähre Abschätzung dieser Lipidhülle gegeben werden, da keine scharfe Kante als Abschluss aufgezeichnet werden kann. Da die Proben im Vakuum untersucht wurden, ist die Form der Lipidschicht anders im Vergleich zu den Proben in wässriger Lösung und sowohl Radius als auch Lipidhülle erscheinen kleiner.

• Bindungsmessungen mit 2fFCS

Die Lipid-Protein Wechselwirkung konnte durch die Messung des hydrodynamischen Radius mittels Zwei-Fokus-Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (2fFCS) untersucht werden. Die Kombination 'Protein', 'Lipid' und 'Quantenpunkt' wurde bisher in der Literatur noch nicht in Erwägung gezogen. Die Größenbestimmung von Partikeln und die Untersuchung von Bindungsereignissen mittels 2fFCS ist fest in der Wissenschaft etabliert. Beispiel sind die Untersuchungen von Nanopartikeln aus Eisen-Platin [79–81]. In der Literatur wurden FCS Analysen von Quantenpunkten durchgeführt, allerdings meist zur Betrachtung photophysikalischer Eigenschaften [185–187]

oder zur Bestimmung der Größe, abhängig von der Beschichtung [188]. Bindungsmessungen von Proteinen an Quantenpunkten wurden in der Literatur aufgezeigt [79], allerdings keine Bindungsstudien an Lipidquantenpunkten bisher vorgestellt. Der Vorteil von FCS ist, dass nur wenige Partikel im Fokus aufgezeichnet werden und spezifisch eine bestimmte Art Partikel im konfokalen Volumen betrachtet wird, d.h., ein Partikel, der mit einer Wellenlänge angeregt wird und Emissionslicht bei einer anderen Wellenlänge aussendet. Bedeutender Vorteil der 2fFCS Methode ist, dass eine externe Referenz in Bezug auf die untersuchte Probe, d.h., eine interne Probe in Bezug auf die Messapparatur, verwendet wird. Gerade bei Quantenpunkten, die sich wesentlich in ihren fluoreszenten Eigenschaften wie Helligkeit oder Fluoreszenzlebensdauer von herkömmlichen Fluorophoren, die als Referenzprobe verwendeten werden, unterscheiden, ist dies ein wichtiger Vorteil. Dadurch kann eine exakte Größenbestimmung der Messprobe erzielt werden.

Ein kritischer Schritt bei der Auswertung der Daten ist, eine passende Autokorrelationsfunktion zu finden, die erklärbar und möglichst einfach gestaltet ist. Dies wurde mit der Einführung eines Dehnungsparameters b zur freien Diffusion durchgeführt. Dieser gleicht die geringere Steigung der Korrelationsfunktionen aufgrund des Quantenpunkt-Blinkens aus, das aufgrund von Interkombination (siehe Unterkapitel 2.4) zustande kommt. Es muss beachtet werden, dass die Einführung des Dehnungsparameters ein Modell zur Anpassung darstellt. In Röcker et al. [79] wurde dies durch Einführung eines Kinetik-Terms erlangt. Weder ist der genannte Kinetik-Term, noch der Dehnungsparameter b von Interesse und dient lediglich der besseren Anpassung an die erhaltenen Messkurven. Physikalisch sinnvoll ist die freie Diffusion, die ebenso zur Kurvenanpassung verwendet werden kann. Allerdings stimmen Messdaten und Anpassungsfunktion nicht absolut überein. Im Vergleich liefern die Modellannahmen freie Diffusion mit oder ohne Dehnungsparameter die gleichen Ergebnisse in Bezug auf die Bindungsaffinitäten, da jeweils der Wendepunkt als Diffusionszeit bzw. Diffusionskoeffizient für die weiteren Berechnungen ausschlaggebend ist.

Die Diffusionskoeffizienten, die durch die Auswertung der Autokorrelationsfunktionen erhalten wurden, werden mittels Stokes-Einstein-Gleichung in einen hydrodynamischen Radius umgerechnet. Trägt man den hydrodynamischen Radius über der logarithmischen Proteinkonzentration auf, beobachtet man einen schrittweisen Anstieg des hydrodynamischen Radius abhängig von der Proteinkonzentration. Der Anstieg, dessen Mittelpunkt abhängig ist von den verwendeten Proteinen bzw. Nanopartikeloberflächen, kann quantitativ

ausgewertet werden. Er gibt die Konzentration an, bei welcher 50% der Nanopartikel mit Protein bedeckt sind, d.h., man erhält eine quantitative Aussage über die Bindungsaffinität zwischen Protein und Nanopartikel. Die Protein-beladenen Lipidquantenpunkte können dabei als Kugeln (Volumenmodell), der Radiuszuwachs als kontinuierlicher Prozess, der mit der Hill-Gleichung analysiert werden kann, betrachtet werden. Führt man bei sehr großen Proteinen bzw. wenigen zur Verfügung stehenden Bindungsplätzen (< 5) eine Anpassung mit dem Volumenmodell durch, werden sowohl die maximale Anzahl an gebundenem Protein, als auch die Hillkoeffizient überschätzt, da nicht das vollständige berechnete aufgelagerte Volumen mit Protein ausgefüllt wird. Ein weiterer, wichtiger Gesichtspunkt bei der Auswertung von Bindungsaffinitäten ist, dass immer die freie Proteinkonzentration betrachtet werden muss. Diese ist näherungsweise gleich der eingesetzten Proteinkonzentration, wenn die Bindungsaffinität klein, d.h., die Dissoziationskonstante groß, ist. Bei großen Bindungsaffinitäten, d.h., kleinen Dissoziationskonstanten, muss die freie Proteinkonzentration abgeschätzt werden, damit eine Auftragung des hydrodynamischen Radius über der logarithmischen Proteinkonzentration zur Auswertung von Dissoziationskonstanten richtig ist. Wichtige Korrektur ist zudem die intrinsische Viskosität. Diese stellt oft einen unbekannt Parameter bei der Untersuchung hoher Proteinkonzentrationen dar und muss dann abgeschätzt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Methodenkombination aus Lipidquantenpunkten, untersucht mit 2fFCS eine sehr gute Möglichkeit darstellt, stark gekrümmte Lipidoberflächen hinsichtlich ihrer Interaktion mit Proteinen zu untersuchen.

4.2.2 Gegenüberstellung

Abschließend stellt Tabelle 4.2 die Methoden gegenüber. Es kommt deutlich zum Ausdruck, dass die jeweilige Untersuchungsmethode spezifisch für die jeweilige Anwendung ausgewählt werden muss. Mit Hilfe von Immunoassays (ELISA) kann eine Komplementaktivierung untersucht, durch Immunoblotting, Schwingquarzwaage und 2fFCS eine Bindung sowie Konformationsänderung von C3 in unterschiedlicher Detailgenauigkeit detektiert werden. Für die Aufklärung der Interaktion des C3 mit Lipidoberflächen war die Methodenkombination aus biophysikalischen Analyseverfahren mit Unterstützung aus der biochemischen Analysetechnik bedeutend. Durch langsames Herantasten von Immunoassays (ELISA) über Immunoblotverfahren zur Messmethode der Schwingquarzwaage und der Kombination aus Lipidquantenpunkten und 2fFCS war eine detaillierte Untersuchung der C3-Lipid Interaktion möglich.

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der verwendeten Untersuchungsmethoden.

Immunoassay	Immunoblotting	Schwingquarzwage	Lipidquantenpunkte 2FFCS
<ul style="list-style-type: none"> • Komplementaktivierung (flüssige Phase) • Antikörperbasiert • Enzymreaktion • Qualitativ/quantitativ • Großes Ensemble • Planare Lipiddoppelschicht 	<ul style="list-style-type: none"> • Bindung Oberfläche • Konformation • Antikörperbasiert • Enzymreaktion • Qualitativ • Großes Ensemble • Planare Lipiddoppelschicht 	<ul style="list-style-type: none"> • Bindung Oberfläche • Konformation • Sensorbasiert • Frequenz- und Dämpfungsänderung • Qualitativ/quantitativ • Großes Ensemble • Planare Lipiddoppelschicht 	<ul style="list-style-type: none"> • Bindung Oberfläche • Bindungsaffinität • Optisch/Fluoreszenz • Fluoreszenzfluktuation • Quantitativ • Spezifisch • Stark gekrümmte Lipidmonoschicht
Modell aus der Natur (Zelloberfläche, LDL/HDL) & und für Medizin (Verkapselung Arznei)			
<ul style="list-style-type: none"> • Unspez. Bindungen • Bedarf an spezifischen Antikörpern • Viele Schritte • Teuer • Schneller Überblick 	<ul style="list-style-type: none"> • Unspez. Bindungen • Bedarf an spezifischen Antikörpern • Viele Schritte • Teuer • Schneller Überblick 	<ul style="list-style-type: none"> • Defekte Lipidschicht • Schichtdicke vs. Sensitivität • Probenvolumen 1 ml • Hersteller begrenzt • Zeitaufgelöst • Verschiedene Sensoren 	<ul style="list-style-type: none"> • Dunkle QDs • Blinken • Zeitaufwändig • Viel Vorwissen • Zeitaufgelöst • Variabel • Probenvolumen 10 μl • Probenkonzentration < 1 nM

Kapitel 5

Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte die Komplementaktivierung durch neutrale Lipidoberflächen aufgezeigt und dadurch ein unbekannter, nicht-proteolytischer Aktivierungsmechanismus aufgeklärt werden.

Es wurde gezeigt, dass neutrale Liposomen in Lepirudin-Plasma das Komplementsystem als Teil der angeborenen Immunität aktivieren. Dabei wurden Lipide mit Phosphocholin-Kopfgruppe verwendet, die als zwitterionische Kopfgruppe eine neutrale Gesamtladung besitzen, allerdings ein leicht negatives ζ -Potential aufweisen. Die Aktivierung des Komplementsystems konnte mit Immunoassayverfahren (ELISA) in der flüssigen Phase nachgewiesen werden. Das Protein C1q ist dabei mitverantwortlich für diesen Prozess. Unterschiedliche Methoden wurden für die weiteren Untersuchungen angewandt, um Aufschluss über die Rolle des C3 Proteins, das den Dreh- und Angelpunkt in der Reaktionskaskade des Komplementsystems darstellt, aufzuklären. Durch Immunoblotverfahren wurde C3 auf neutralen Liposomenoberflächen detektiert und spezifisch Epitope des gebundenen C3 und damit die Konformation als aktivierte Form C3(H₂O) detektiert. Bestätigt und quantifiziert wurden diese bisher qualitativen Messungen durch das zeitaufgelöste Verfahren der Schwingquarzwage (QCM-D). Nach der Herstellung einer planaren Lipiddoppelschicht konnte sukzessive die Bindung von C3 an die Oberfläche gemessen werden. Berechnungen der Oberflächenbesetzung mit dem C3 Protein ergaben eine Belegung von bis zu 30% der Lipidfläche. Eine Konformationsänderung von C3 in die aktive Form des C3(H₂O) konnte mit diesem Verfahren ebenso nachgewiesen werden. Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von C3 an stark gekrümmte Lipid-

oberflächen wurde eine Methodenkombination aus Lipidquantenpunkten und Zwei-Fokus-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (2fFCS) entwickelt. Auf diese Weise konnte ohne Fluoreszenzmarkierung des Proteins und der C3-Lipid-Interaktionsfläche die Bindungsaffinität von C3 zu stark gekrümmten Lipidoberflächen untersucht werden. Nach eingehender Charakterisierung der Lipidquantenpunkte hinsichtlich Größe, Homogenität, Struktur, Fluoreszenzeigenschaften und Dicke der Lipidhülle konnten Bindungsstudien durchgeführt werden. Eine Sättigung der C3 Bindung an die Lipidquantenpunkte wurde dabei nicht erreicht. Durch den Vergleich der Bindung des C3 Proteins an DHLA-Lipidquantenpunkte konnte die Orientierung des C3 Proteins und der maximale Radiuszuwachs durch die Proteinbindung, d.h., die Dicke der aufgelagerten Proteinschicht, abgeschätzt und die Bindungsaffinität von C3 an die Lipidquantenpunkte berechnet werden. Diese wurde zu einem Wert im mikromolaren Bereich von $K'_D = 270 \pm 90 \mu\text{M}$ bestimmt, mit einer Bindungsaffinität an DHLA-Quantenpunkte von $K_D = 15 \pm 4 \text{ nM}$. Beide Partikel (DHLA- und Lipidquantenpunkte) konnten miteinander verglichen werden, da sie eine ähnliche Größe, Krümmung und ζ -Potential aufweisen.

Messungen der Bindung von weiteren Serumproteinen - menschliches Serumalbumin (HSA), menschliches Serum, bestehend aus einer Vielzahl an Proteinen, Apolipoprotein E3 (ApoE3) - an beide Nanopartikel zeigten, dass dieselbe Proteinorientierung auf beiden Partikeln angenommen und diese mit dem elektrostatischen Potential in Verbindung gebracht werden kann. Ebenso wurde gezeigt, dass eine große Differenz bei allen Messungen in der Bindungsaffinität vorliegt. An lipidumhüllte Quantenpunkte war diese wesentlich geringer als an DHLA-Quantenpunkte.

Betrachtet man die verschiedenen Methoden, die während dieser Arbeit zum Einsatz kamen, konnte durch die Kombination von Untersuchungsverfahren aus den verschiedenen Forschungsbereichen ein Gesamtbild der C3-Lipid Interaktion erstellt werden. Durch Immunoassayverfahren (ELISA) konnte die Komplementaktivierung in der flüssigen Phase detektiert, allerdings keine Aussage über gebundene Proteine an der Lipidoberfläche getroffen werden. Durch Immunoblotverfahren wurde die Bindung von C3 und die Konformation als C3(H₂O) nachgewiesen, allerdings konnte dadurch keine quantitative Aussage getroffen werden. Durch Anwendung der Technik der Schwingquarzwaage (QCM-D) konnte quantitativ und zeitaufgelöst das Bindungsverhalten von C3 an Lipidoberflächen betrachtet werden,

allerdings war Immunoblotting zur Bestätigung der Messung wichtig. An stark gekrümmten Oberflächen konnte erst durch die Kombination von Lipidquantenpunkten und 2fFCS die Bindungsreaktion untersucht und Bindungsaffinitäten abgeschätzt werden. Die Lipidquantenpunkte wurden dazu mit geeigneten Methoden nach der Herstellung ausführlich hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften, Struktur und Größe charakterisiert. Mit der neuartigen Methodenkombination wurde eine allgemeine Möglichkeit gefunden, stark gekrümmte Lipidoberflächen in Bezug auf Bindungsreaktionen mit Proteinen untersuchen zu können.

Insgesamt konnte durch die Detektion des C3 in der gebundenen Form des C3(H₂O) auf planaren Lipidoberflächen ein neuer, bisher unbekannter Aktivierungsmechanismus aufgezeigt werden, der durch Kontakt mit der Oberfläche zu einer nicht-proteolytischen Aktivierung von C3 führt. Dieser Prozess ist höchstwahrscheinlich mitverantwortlich für die Abnahme der Liposomenkonzentration bei Verabreichung *in vivo*. Betrachtet man den Prozess genauer, führt die Komplementaktivierung in der flüssigen Phase zur Aktivierung von Phagozyten aufgrund der Bildung von Anaphylatoxinen (unter anderem C3a). C3(H₂O) dient zudem als Ligand für C3 Rezeptoren und beeinflusst dadurch die Verstärkung der Komplementkaskade. Ferner wurde gezeigt, dass C3 Proteine an stark gekrümmte Lipidoberflächen binden können, allerdings eine geringe Affinität zu diesen aufweisen.

Durch die Aufklärung des initialen Mechanismus der Komplementaktivierung durch neutrale Lipidoberflächen konnte ein Beitrag geleistet werden, grundlegende **biologische Mechanismen** der Lipid-Protein Interaktion zu verstehen. Bereits in der Einleitung wurde mit dem Verweis auf die unterschiedlichsten Interaktionsmöglichkeiten gezeigt, wie vielfältig solche Interaktionen sein können. Durch die neuartige Methodenkombination aus Lipidquantenpunkten kombiniert mit 2fFCS wurde ein weiteres biologisches Modell aufgezeigt, um zusätzliche biologische Mechanismen aufzuklären. Diese stark gekrümmten Lipidoberflächen können als Modelloberflächen für Lipoproteine niederer (LDL) und hoher Dichte (HDL) dienen, da diese eine ähnliche Größe und dadurch einen ähnlichen Krümmungsradius aufweisen. Durch die vorgestellte Methodenkombination können Proteininteraktionen leicht untersucht und eine genauere Charakterisierung der Interaktion mit den Lipoproteine erstellt werden.

Ebenfalls in der Einleitung angesprochen wurde die Bedeutung der Lipid-Protein-Interaktion für die **medizinische Anwendung**. Liposomale Arzneimittel dienen dazu, gezielt Medikamente zu verkapseln und zu erkrankten Zellen zu bringen, ohne zuvor den Wirkstoff freizusetzen. Oft aktivieren die Lipidhüllen allerdings dennoch das Immunsystem. Um die Aufnahme und damit den Abtransport von Liposomen zu unterbinden, können, wie in dieser Arbeit aufgezeigt wurde, Komplementinhibitoren, die speziell gegen proteolytische Komplementaktivierung vorgehen, diese nicht unterbinden. Da die Bildung von C3(H₂O) einen nicht-proteolytischen Prozess darstellt, müssen Rezeptoren blockiert werden, um eine Komplementaktivierung effektiv zu verhindern. Durch die Aufklärung dieses grundlegenden Mechanismus kann die Behandlung ungewollter Komplementsystem-induzierter Nebenwirkungen, d.h. Immunantworten, bei der Anwendung liposomaler Arzneimittel und lipidumhüllter Kontrastmittel verbessert und angepasst werden.

Ferner können mit der neuartigen Methodenkombination gezielt für die Medikamentenentwicklung und Verbesserung der lipidumhüllten Kontrastmittelverabreichung Lipidoberflächen untersucht und verbessert werden, um möglichst eine Immunantwort zu vermeiden. Durch die vorgestellte Methode kann der medizinische Einsatz von Quantenpunkten als Kontrastmittel mit unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen unter Beachtung der Interaktion mit Proteinen zudem detailliert untersucht werden. Zudem kann mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die hergestellten Lipidquantenpunkte gut geeignet sind, Proteinbindung zu unterbinden und aus diesem Grund ein geeignetes System darstellen für medizinische Anwendungen.

Abschließend soll für diese Arbeit die Bedeutung von **Interaktion** betont werden: Durch Interaktion werden biologische Prozesse initiiert, aber ebenso wird nur durch Interaktion von Methoden und vor allem durch Interaktion unterschiedlicher Forschungsbereiche - Biologie, Medizin, Chemie, Physik - die Erstellung eines Gesamtbildes von Prozessen erst ermöglicht.

Abkürzungsverzeichnis

Allgemein

APD	Avalanche Photodioden
BLM	<i>Black lipid membrane</i>
BVD	Butterworth-Van Dyke Ersatzschaltbild
CCD	<i>Charge-coupled-device</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FCS	<i>Fluorescence correlation spectroscopy</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GUV	<i>Giant unilamellar vesicles</i>
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
ISC	<i>Intersystem-crossing</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LUV	<i>Large unilamellar vesicles</i>
MLV	<i>Multilamellare vesicles</i>
PSF	Punktspreizfunktion
QCM-D	<i>Quartz crystal microbalance with dissipation</i>
QD	<i>Quantum dot</i>

SDS-PAGE *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis*

SLB *Supported lipid bilayer*

SUV *Small unilamellar vesicles*

TEM *Transmission electron microscopy*

Chemikalien

ApoE3 Apolipoprotein E3

BSA Bovines Serumalbumin

CdSe Cadmiumselenid

COOH Carboxylgruppe

CRP C-reaktives Protein

DHLA Dihydroliponsäure

HSA Menschliches Serumalbumin

C₂H₄O₂ Essigsäure

C₂H₆O Ethanol

DAB 3,3'-Diaminobenzidin

EDTA Ethylendiamintetraacetat

EGTA Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure

CH₄O Methanol

CHCl₃ Chloroform

HRP Meerrettichperoxidase

H₂O Wasser

H₂O₂ Wasserstoffperoxid

H₂SO₄	Schwefelsäure
KOH	Kaliumhydroxid
MAC	Membranangriffskomplex
MHPC	Myristoyl-hydroxyl-phosphatidylcholin
N₂	Stickstoff
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat Puffer
NH₂	Aminogruppe
OsO₄	Osmium
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Phosphocholin
PE	Phosphoethanolamin
PEG	Polyethylenglycol
PS	Phosphoserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SiO₂	Quarz
SA	Stearinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
ZnS	Zinksulfid

Literaturverzeichnis

- [1] W. Dowhan und M. Bogdanov. Lipid-protein interactions as determinants of membrane protein structure and function. *Biochem. Soc. Trans.*, **39**:767–774, 2011.
- [2] T.A. Rapoport. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, **450**:663–669, 2007.
- [3] A.J.M. Driessen und N. Nouwen. Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu. Rev. Biochem.*, **77**:643–667, 2008.
- [4] T. Junne, L. Kocik, and M. Spiess. The hydrophobic core of the Sec61 translocon defines the hydrophobicity threshold for membrane integration. *Mol. Biol. Cell*, **21**:1662–1670, 2010.
- [5] M. Monné, T. Hessa, L. Thissen, and G. von Heijne. Competition between neighboring topogenic signals during membrane protein insertion into the ER. *FEBS J.*, **272**:28–36, 2004.
- [6] G. von Heijne und Y. Gavel. Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur. J. Biochem.*, **174**:671–678, 1988.
- [7] M. Bogdanov, P. Heacock, Z. Guan, and W. Dowhan. Plasticity of lipid-protein interactions in the function and topogenesis of the membrane protein lactose permease from *Escherichia coli*. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**:15057–15062, 2010.
- [8] S.H. White und G. von Heijne. Do protein-lipid interactions determine the recognition of transmembrane helices at the ER translocon? *Biochem. Soc. T.*, **33**:1012–1015, 2005.

-
- [9] W. A. Catterall. Structur and function of voltage-sensitive ion channels. *Science*, **242**:50–61, 1988.
- [10] D. Kelkar und A. Chattopadhyay. The gramicidin ion channel: a model membrane protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**:2011–2025, 2007.
- [11] M.A. Lizarbe, J.I. Barrasa, N. Olmo, F. Gavilanes, and J. Turnay. Annexin-phospholipid interactions. Functional implications. *Int. J. Mol. Sci.*, **14**:2652–2683, 2013.
- [12] J.W. Choi, D.R. Herr, K. Noguchi, Y.C. Yung, C.-W. Lee, T. Mutoh, M.-E. Lin, S.T. Teo, K.E. Park, A.N. Mosley, and J. Chun. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Ann. Rev. Pharmacol.*, **50**:157–186, 2010.
- [13] L.C. Cantley. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, **296**:1655–1657, 2002.
- [14] N. Bergstrand. Liposomes for drug delivery. Dissertation, Universiteit Uppsala, 2003.
- [15] X. Dong, C. Mattingly, M.T. Tseng, M.J. Cho, Y. Liu, V.R. Adams, and R.J. Mumper. Doxorubicin and paclitaxel-loaded lipid-based nanoparticles overcome multidrug resistance by inhibiting P-glycoprotein and depleting ATP. *Cancer Res.*, **69**:3918–3926, 2009.
- [16] A. Sharma, E. Mayhew, L. Bolcsak, C. Cavanaugh, P. Harmon, A. Janoff, and R.J. Bernacki. Activity of paclitaxel liposome formulations against human ovarian tumor xenografts. *Int. J. Cancer*, **71**:103–107, 1997.
- [17] T. Ishida, H. Harashima, and H. Kiwada. Liposome clearance. *Bioscience Rep.*, **22**:197–224, 2002.
- [18] S.M. Moghimi und I. Hamad. Liposome-mediated triggering of complement cascade. *J. Lipos. Res.*, **18**:195–209, 2008.
- [19] J. Andersson, R. Larsson, R. Richter, K.N. Ekdahl, and B. Nilsson. Binding of a model regulator of complement activation (RCA) to a biomaterial surface: surface-bound factor H inhibits complement activation. *Biomaterials*, **22**:2435–2443, 2001.

- [20] Y.-Q. Wu, H. Qu, G. Sfyroera, A. Tzekou, B.K. Kay, B. Nilsson, K.N. Ekdahl, D. Ricklin, and J.D. Lambris. Protection of nonself surfaces from complement attack by factor H-binding peptides: implications for therapeutic medicine. *J. Immunol.*, **186**:4269–4277, 2011.
- [21] H. Zhao und P. Lappalainen. A simple guide to biochemical approaches for analyzing protein–lipid interactions. *Mol. Biol. Cell*, **23**:2823–2830, 2012.
- [22] W.-K. Chang, Y.-J. Tai, C.-H. Chiang, C.-S. Hu, P.-D. Hong, and M.-K. Yeh. The comparison of protein-entrapped liposomes and lipoparticles: preparation, characterization, and efficacy of cellular uptake. *Int. J. Nanomed.*, **6**:2403–2417, 2011.
- [23] L. Aguilar, G. Ortega-Pierres, B. Campos, R. Fonseca, M. Ibanez, C. Wong, N. Farfan, J.M. Naciff, M.A. Kaetzel, J.R. Dedman, and I. Baeza. Phospholipid membranes form specific nonbilayer molecular arrangements that are antigenic. *J. Biol. Chem.*, **274**:25193–25196, 1999.
- [24] K. Glasmästar, C. Larsson, F. Höök, and B. Kasemo. Protein adsorption on supported phospholipid bilayers. *J. Colloid Interf. Sci.*, **246**:40–47, 2002.
- [25] S.T. Henriques, Y.H. Huang, M.A.R.B. Castanho, L.A. Bagatolli, S. Sonza, G. Tachedjian, N.L. Daly, and D.J. Craik. Phosphatidylethanolamine binding is a conserved feature of cyclotide-membrane interactions. *J. Biol. Chem.*, **287**:33629–33643, 2012.
- [26] T. Shahal, K.A. Melzak, C.R. Lowe, and E. Gizeli. Poly(dimethylsiloxane)-coated sensor devices for the formation of supported lipid bilayers and the subsequent study of membrane interactions. *Langmuir*, **24**:11268–11275, 2008.
- [27] L. Zhang, H. Tong, M. Garewal, and G. Ren. Optimized negative-staining electron microscopy for lipoprotein studies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**:2150–2159, 2013.
- [28] M. Knoll und E. Ruska. Das Elektronenmikroskop. *Zeitschrift für Physik*, **78**:318–339, 1932.

-
- [29] Y. Takakuwa, C.G. Pack, X.L. An, S. Manno, E. Ito, and M. Kinjo. Fluorescence correlation spectroscopy analysis of the hydrophobic interactions of protein 4.1 with phosphatidyl serine liposomes. *Biophys. Chem.*, **82**:149–155, 1999.
- [30] L. Rusu, A. Gambhir, S. McLaughlin, and J. Rädler. Fluorescence correlation spectroscopy studies of peptide and protein binding to phospholipid vesicles. *Biophys. J.*, **87**:1044–1053, 2004.
- [31] S.A. Sánchez und E. Gratton. Lipid-protein interactions revealed by two-photon microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Accounts Chem. Res.*, **38**:469–477, 2005.
- [32] A.A. Spector und M.A. Yorek. Membrane lipid composition and cellular function. *J. Lipid Res.*, **26**:1015–1035, 1985.
- [33] A. Chonn, P.R. Cullis, and D.V. Devine. The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. *J. Immunol.*, **146**:4234–4241, 1991.
- [34] S.M. Moghimi und I. Hamad. Liposome-mediated triggering of complement cascade. *J. Liposome Res.*, **18**:195–209, 2008.
- [35] T. Ishida, H. Kojima, H. Harashima, and H. Kiwada. Biodistribution of liposomes and C3 fragments associated with liposomes: evaluation of their relationship. *Int. J. Pharm.*, **205**:183–193, 2000.
- [36] D.V. Devine, K. Wong, K. Serrano, A. Chonn, and P.R. Cullis. Liposome-complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1191**:43–51, 1994.
- [37] C.R. Alving, R.L. Richards, and A.A. Guirguis. Cholesterol-dependent human complement activation resulting in damage to liposomal model membranes. *J. Immunol.*, **118**:342–347, 1977.
- [38] D. Liu, Q. Hu, and Y.K. Song. Liposome clearance from blood: different animal species have different mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta*, **1240**:277–284, 1995.
- [39] H. Harashima, K. Sakata, K. Funato, and H. Kiwada. Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. *Pharm. Res.*, **11**:402–406, 1994.

-
- [40] A.D. McNaught und A. Wilkinson. Compendium of chemical terminology, <http://goldbook.iupac.org> 1997.
- [41] G. van Meer, D.R. Voelker, and G.W. Feigenson. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, **9**:112–124, 2008.
- [42] P. Leventis und S. Grinstein. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Ann. Rev. Biophys.*, **39**:407–427, 2010.
- [43] M. Freissmuth, S. Böhm, and S. Offermanns. Lysophospholipide. Springer-Verlag, 2012.
- [44] I. Ishii, N. Fukushima, X. Ye, and J. Chun. Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu. Rev. Biochem.*, **73**:321–354, 2004.
- [45] B.J. Frisken. Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data. *Appl. Optics*, **40**:4087–4091, 2001.
- [46] D.C. Henry. The cataphoresis of suspended particles. Part I. The equation of cataphoresis. *P. R. Soc. A*, **133**:106–129, 1931.
- [47] H. Ohshima. Henry’s function for electrophoresis of a cylindrical colloidal particle. *J. Colloid Interf. Sci*, **180**:299–301, 1996.
- [48] P. Mueller, D.O. Rudin, T.H. Tien, and W.C. Wescott. Reconstitution of cell membrane structure *in vitro* and its transformation into an excitable system. *Nature*, **194**:979–980, 1962.
- [49] H.T. Tien. Black lipid membranes: Thickness determination and molecular organization by optical methods. *J. Theoret. Biol.*, **16**:97–110, 1967.
- [50] M. Winterhalter. Black lipid membranes. *Curr. Opin. Colloid In.*, **5**:250–255, 2000.
- [51] P. van Gelder, F. Dumas, and M. Winterhalter. Understanding the function of bacterial outer membrane channels by reconstitution into black lipid membranes. *Biophys. Chem.*, **85**:153–167, 2000.

-
- [52] Y. Klapper, K. Nienhaus, C. Röcker, and G.U. Nienhaus. Lipid membranes and single ion channel recording for the advanced physics laboratory. *Am. J. Phys.*, **82**:502–509, 2014.
- [53] I. Langmuir. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *J. Am. Chem. Soc.*, **39**:1848–1906, 1917.
- [54] K.B. Blodgett. Monomolecular films of fatty acids on glass. *J. Am. Chem. Soc.*, **56**:495, 1934.
- [55] R.P. Richter, R. Bérat, and A.R. Brisson. Formation of solid-supported lipid bilayers: an integrated view. *Langmuir*, **22**:3497–3505, 2006.
- [56] S. Kaufmann, G. Papastavrou, K. Kumar, M. Textor, and E. Reimhult. A detailed investigation of the formation kinetics and layer structure of poly(ethylene glycol) tether supported lipid bilayers. *Soft Matter*, **5**:2804–2814, 2009.
- [57] Y. Deng, Y. Wang, B. Holtz, J. Li, N. Traaseth, G. Veglia, B.J. Stottrup, R. Elde, D. Pei, A. Guo, and X.-Y. Zhu. Fluidic and air-stable supported lipid bilayer and cell-mimicking microarrays. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**:6267–6271, 2008.
- [58] V. Kiessling, M.K. Domanska, D. Murray, C. Wan, and L.K. Tamm. Supported lipid bilayers: Development and applications in chemical biology. Wiley Encyclopedia of Chemical Biology, 2008.
- [59] M.L. Wagner und L.K. Tamm. Tethered polymer-supported planar lipid bilayers for reconstitution of integral membrane proteins: silane-polyethyleneglycol-lipid as a cushion and covalent linker. *Biophys. J.*, **79**:1400–1414, 2000.
- [60] T.H. Bayburt und S.G. Sligar. Membrane protein assembly into nanodiscs. *FEBS Lett.*, **584**:1721–1727, 2010.
- [61] J. Borch und T. Hamann. The nanodisc: a novel tool for membrane protein studies. *Biol. Chem.*, **390**:805–814, 2009.
- [62] A. Nath, W.M. Atkins, and S.G. Sligar. Applications of phospholipid bilayer nanodiscs in the study of membranes and membrane proteins. *Biochemistry*, **46**:2059–2069, 2007.

-
- [63] K.U. Linderstrøm-Lang. Lane Medical Lectures: Proteins and enzymes. Stanford University Press, 1952.
- [64] K. Murphy, P. Travers, and M. Walport. Janeway's immunobiology. Garland Science, 7 edition, 2008.
- [65] P. Gros, F.J. Milder, and B.J.C. Janssen. Complement driven by conformational changes. *Nat. Rev. Immunol.*, **8**:48–58, 2008.
- [66] A. Sahu und J.D. Lambris. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol. Rev.*, **180**:35–48, 2001.
- [67] J.O. Sunyer und J.D. Lambris. Complement. *Encyclopedia of life sciences*, pages 1–10, 2001.
- [68] O. Hamad. Crosstalk between activated platelets and the complement system. Dissertation, Universiteit Uppsala, 2010.
- [69] B.J.C. Janssen, E.G. Huizinga, H.C.A. Raaijmakers, A. Roos, M.R. Daha, K.N. Ekdahl, B. Nilsson, and P. Gros. Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature*, **437**:505–511, 2005.
- [70] M. Gadjeva, A.W. Dodds, A. Taniguchi-Sidle, C. Willis, D.E. Isenman, and S.K.A. Law. The covalent binding reaction of complement component C3. *J. Immunol.*, **161**:985–990, 1998.
- [71] N. Nishida, T. Walz, and T.A. Springer. Structural transitions of complement component C3 and its activation products. *P. Nat. Acad. Sci. USA*, **103**:19737–19742, 2006.
- [72] F. Bexborn, P.O. Andersson, H. Chen, B. Nilsson, and K.N. Ekdahl. The tick-over theory revisited formation and regulation of the soluble alternative complement C3 convertase C3(H₂O). *Mol. Immunol.*, **45**:2370–2379, 2009.
- [73] B. Nilsson und K.N. Ekdahl. The tick-over theory revisited: Is C3 a contact-activated protein? *Immunobiology*, **217**:1106–1110, 2012.

- [74] J. Andersson, K.N. Ekdahl, R. Larsson, U.R. Nilsson, and B. Nilsson. C3 adsorbed to a polymer surface can form an initiating alternative pathway convertase. *J. Immunol.*, **168**:5786–5791, 2002.
- [75] B. Montdargent, J. Toufik, M.P. Carreno, D. Labarre, and M. Jozefowicz. Complement activation and adsorption of protein fragments by functionalized polymer surfaces in human serum. *Biomaterials*, **13**:571–576, 1992.
- [76] Y. Terao, Y. Mori, M. Yamaguchi, Y. Shimizu, K. Ooe, S. Hamada, und S. Kawabata. Group A streptococcal cysteine protease degrades C3 (C3b) and contributes to evasion of innate immunity. *J. Biol. Chem.*, **283**:6253–6260, 2008.
- [77] G. Saggiu, C. Cortes, H.N. Emch, G. Ramirez, R.G. Worth, and V.P. Ferreira. Identification of a novel mode of complement activation on stimulated platelets mediated by properdin and C3(H₂O). *J. Immunol.*, **190**:6457–6467, 2013.
- [78] I. Hamad, K.O. Al-Hanbali, A.C. Hunter, K.J. Rutt, T.L. Andresen, and S.M. Moghimi. Switching of complement activation pathways at the nanosphere serum interface: Implications for stealth nanoparticle engineering. *ACS Nano*, **4**:6629–6638, 2010.
- [79] C. Röcker, M. Pötzl, F. Zhang, W.J. Parak, and G.U. Nienhaus. A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.*, **4**:577–580, 2009.
- [80] X. Jiang, S. Weise, M. Hafner, C. Röcker, F. Zhang, W.J. Parak, and G.U. Nienhaus. Quantitative analysis of the protein corona on FePt nanoparticles formed by transferrin binding. *J. R. Soc. Interface*, **7**:S5–S13, 2010.
- [81] P. Maffre, K. Nienhaus, F. Amin, W.J. Parak, and G.U. Nienhaus. Characterization of protein adsorption onto FePt nanoparticles using dual-focus fluorescence correlation spectroscopy. *Beilstein J. Nanotechnol.*, **2**:374–383, 2011.
- [82] G.S. Adair, V. Bock, and H. Field. The hemoglobin system: VI. The oxygen dissociation curve of hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, **63**:529–545, 1925.

-
- [83] A.V. Hill. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *Proceedings of the Physiological Society*, 1910.
- [84] J.R. Lakowicz. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer-Verlag, 2010.
- [85] K.E. van Holde, C. Johnson, and P.S. Ho. Principles of physical biochemistry. Prentice Hall, 2010.
- [86] M. Kasha. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discuss. Faraday Soc.*, **9**:14–19, 1950.
- [87] T. Müller, P.H. Vaccaro, F. Perez-Bernal, and F. Iachello. The vibronically-resolved emission spectrum of disulfur monoxide (S₂O): An algebraic calculation and quantitative interpretation of Franck Condon transition intensities. *J. Chem.*, **111**:643–667, 1999.
- [88] E. Condon. A theory of intensity distribution in band systems. *Phys. Rev.*, **28**:1182, 1926.
- [89] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, and T. Nann. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat. Methods*, **5**:763–775, 2008.
- [90] D. Magde, R. Wong, and P.G. Seybold. Fluorescence quantum yields and their relation to lifetimes of Rhodamine 6G and fluorescein in nine solvents: improved absolute standards for quantum yields. *Photochem. Photobiol.*, **75**:327–334, 2002.
- [91] O. Shimomura. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J. Microsc.*, **217**:1–15, 2005.
- [92] N.C. Shaner, P.A. Steinbach, and R.Y. Tsien. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods*, **2**:905–909, 2005.
- [93] C.D. Angelo und G.U. Nienhaus. Fluorescent proteins: Nature’s colorful gifts for live cell imaging. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2011.

-
- [94] O. Shimomura, F.H. Johnson, and Y. Saiga. Extraction, purification and properties of *Aequorin*, a bioluminescent protein from the luminous. *J. Cell Compar. Physl.*, **59**:223–239, 1962.
- [95] A.I. Ekimov, A.L. Efros, and A.A. Onushchenko. Quantum size effect in semiconductor microcrystals. *Solid State Commun.*, **56**:921–924, 1985.
- [96] L.E. Brus. Electron–electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state. *J. Chem. Phys.*, **80**:4403–4409, 1984.
- [97] R. Rossetti, S. Nakahara, and L.E. Brus. Quantum size effects in the redox potentials, resonance Raman spectra, and electronic spectra of CdS crystallites in aqueous solution. *J. Chem. Phys.*, **79**:1086–1088, 1983.
- [98] S. Rodt. Exzitonische Komplexe in einzelnen III-V Quantenpunkten. Dissertation, Technische Universität Berlin, 2006.
- [99] O. Carion, B. Mahler, T. Pons, and B. Dubertret. Synthesis, encapsulation, purification and coupling of single quantum dots in phospholipid micelles for their use in cellular and in vivo imaging. *Nat. Protoc.*, **2**:2383–2390, 2007.
- [100] F.A. Esteve-Turrillas und A. Abad-Fuentes. Applications of quantum dots as probes in immunosensing of small-sized analytes. *Biosens. Bioelectron.*, **41**:12–29, 2012.
- [101] P. Michler. Ideale Photonen auf Bestellung. *Physik Journal*, **6**:35, 2013.
- [102] G.P. Drummen. Quantum dots-from synthesis to applications in biomedicine and life sciences. *Int. J. Mol. Sci.*, **11**:154–163, 2010.
- [103] J.K. Jaiswal, E.R. Goldman, H. Mattoussi, and S.M. Simon. Use of quantum dots for live cell imaging. *Nat. Methods*, **1**:73–78, 2004.
- [104] V. Türck. Elektronische Eigenschaften einzelner Halbleiterquantenpunkte. Dissertation, Technische Universität Berlin, 2001.
- [105] C. Klingshirn. Semiconductor Optics. Springer-Verlag, 1997.

-
- [106] P. Harrison. Quantum wells, wires and dots - Theoretical and computational physics of semiconductor nanostructures. Wiley, 2009.
- [107] M. Pelton, G. Smith, N.F. Scherer, and R. Marcus. Evidence for a diffusion-controlled mechanism for fluorescence blinking of colloidal quantum dots. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**:14249–14254, 2007.
- [108] P. Bharadwaj und L. Novotny. Robustness of quantum dot power-law blinking. *Nano Lett.*, **11**:2137–2141, 2011.
- [109] S.F. Lee und M.A. Osborne. Brightening, blinking, bluing and bleaching in the life of a quantum dot: friend or foe? *Chem. Phys. Chem.*, **10**:2174–2191, 2009.
- [110] M. Müller. Introduction to confocal microscopy. SPIE, 2006.
- [111] P.N. Hedde. Light microscopy beyond the diffraction barrier for live cell studies. Dissertation, Karlsruhe Institut für Technologie, 2013.
- [112] D. Magde, E. Elson, and W.W. Webb. Thermodynamic fluctuations in a reacting system - measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.*, **29**:705–708, 1972.
- [113] E.L. Elson und D. Magde. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers*, **13**:1–27, 1974.
- [114] D. Madge, E.L. Elson, and W.W. Webb. Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *Biopolymers*, **13**:29–61, 1974.
- [115] I.V. Perevoshchikova, E. Kotova, and Y.N. Antonenko. Fluorescence correlation spectroscopy in biology, chemistry, and medicine. *Biochemistry-Moscow*, **76**:497–516, 2011.
- [116] E. Haustein und P. Schwille. Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy. *Methods*, **29**:153–166, 2003.
- [117] R. Rigler, Ü. Mets, J. Widengren, and P. Kask. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *Eur. Biophys. J.*, **22**:169–175, 1993.

-
- [118] P. Schwille und E. Haustein. Fluorescence correlation spectroscopy. An introduction to its concepts and applications. 2001.
- [119] T. Dertinger, V. Pacheco, I. von der Hocht, R. Hartmann, I. Gregor, und J. Enderlein. Two-focus fluorescence correlation spectroscopy: a new tool for accurate and absolute diffusion measurements. *Chem. Phys. Chem.*, **8**:433–443, 2007.
- [120] C. Pieper, K. Weiß, I. Gregor, and J. Enderlein. Dual-focus fluorescence correlation spectroscopy. *Method. Enzymol.*, **518**:175–204, 2013.
- [121] G.U. Nienhaus, P. Maffre, and K. Nienhaus. Studying the protein corona on nanoparticles by FCS. *Method. Enzymol.*, **519**:115–137, 2013.
- [122] M. Weiss, M. Elsner, F. Kartberg, and T. Nilsson. Anomalous subdiffusion is a measure for cytoplasmic crowding in living cells. *Biophys. J.*, **87**:3518–3524, 2004.
- [123] P. Schwille, J. Korlach, and W.W. Webb. Fluorescence correlation spectroscopy with single-molecule sensitivity on cell and model membranes. *Cytometry*, **36**:176–182, 1999.
- [124] J. Kling. Strukturuntersuchungen an bleifreien Ferroelektrika mittels TEM. Dissertation, Technische Universität Darmstadt, 2011.
- [125] S. Flegler, J.W. Heckman, and K.L. Klomparens. Elektronenmikroskopie: Grundlagen, Methoden, Anwendungen. Spektrum Akademischer Verlag, 1995.
- [126] H. Alexander. Physikalische Grundlagen der Elektronenmikroskopie. Teubner-Verlag, 1997.
- [127] A.W. Czanderna und C. Lu. Applications of piezoelectric quartz crystal microbalance. Elsevier, 1984.
- [128] M. Rodahl, A. Krozer, and B. Kasemoa. Quartz crystal microbalance setup for frequency and G-factor measurements in gaseous and liquid environments. *Rev. Sci. Instrum.*, **66**:3924–3930, 1995.
- [129] R. Richter. Formation de Membranes Lipidiques sur Support Solide et Assemblage Bidimensionnel de Protéines. Dissertation, Université Bordeaux I, 2004.

-
- [130] H. Vogel. Gerthsen Physik. Springer-Verlag, 1999.
- [131] Standford Research System. QCM100- Quartz crystal microbalance theory and calibration. www.thinkSRS.com.
- [132] G. Sauerbrey. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik*, **155**:206–222, 1959.
- [133] C.A. Keller und B. Kasemo. Surface specific kinetics of lipid vesicle adsorption measured with a quartz crystal microbalance. *Biophys. J.*, **75**:1397–1402, 1998.
- [134] N.-J. Cho, C.W. Frank, B. Kasemo, and F. Höök. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring of supported lipid bilayers on various substrates. *Nat. Protoc.*, **5**:1096–1106, 2010.
- [135] E. Reimhult, M. Zäch, F. Höök, and B. Kasemo. A multitechnique study of liposome adsorption on Au and lipid bilayer formation on SiO₂. *Langmuir*, **22**:3313–3319, 2006.
- [136] C.A. Keller, K. Glasmästar, V.P. Zhdanov, and B. Kasemo. Formation of supported membranes from vesicles. *Phys. Rev. Lett.*, **84**:5443–5446, 2000.
- [137] S. Kaufmann, K. Kumar, M. Textor, and E. Reimhult. Characterisation of the structure of PEG-supported lipid bilayers. *Eur. Cells Mater.*, **14**:53, 2007.
- [138] Y. Zhang, Y. Chen, and G. Jin. PEGylated phospholipid membrane on polymer cushion and its interaction with cholesterol. *Langmuir*, **26**:11140–11144, 2010.
- [139] S. Ahmed, R.R. Madathingal, S.L. Wunder, Y. Chen, and G. Bothun. Hydration repulsion effects on the formation of supported lipid bilayers. *Soft Matter*, **7**:1936–1947, 2011.
- [140] E.F. Irwin, J.E. Ho, S.R. Kane, and K.E. Healy. Analysis of interpenetrating polymer networks via quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. *Langmuir*, **21**:5529–5536, 2005.

-
- [141] P. Vermette und L. Meagher. Interactions of phospholipid- and poly(ethylene glycol)-modified surfaces with biological systems: relation to physico-chemical properties and mechanisms. *Colloid. Surface. B*, **28**:153–198, 2003.
- [142] T.H. Anderson, Y. Min, K.L. Weirich, H. Zeng, D. Fyngenson, and J.N. Israelachvili. Formation of supported bilayers on silica substrates. *Langmuir*, **25**:6997–7005, 2009.
- [143] Y. Klapper, O. Hamad, Y. Teramura, G. Lenewit, G.U. Nienhaus, D. Ricklin, J.D. Lambris, K.N. Ekdahl, and B. Nilsson. Mediation of a non-proteolytic activation of complement component C3 by phospholipid vesicles. *Biomaterials*, **35**:3688–3696, 2014.
- [144] F. Bexborn, A.E. Engberg, K. Sandholm, T.E. Mollnes, J. Hong, and K.N. Ekdahl. Hirudin versus heparin for use in whole blood in vitro biocompatibility models. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **89**:951–959, 2009.
- [145] D.P. Fine. Comparison of ethyleneglycoltetraacetic acid and its magnesium salt as reagents for studying alternative complement pathway function. *Infect. Immun.*, **16**:124–128, 1977.
- [146] B.J.C. Janssen und P. Gros. Structural insights into the central complement component C3. *Mol. Immunol.*, **44**:3–10, 2007.
- [147] C.H. Hammer, G.H. Wirtz, L. Renfer, H.D. Gresham, and B.F. Tack. Large scale isolation of functionally active components of the human complement system. *J. Biol. Chem.*, **256**:3995–4006, 1981.
- [148] D.T. Fearon. Purification of C3b inactivator and demonstration of its two polypeptide chain structure. *J. Immunol.*, **119**:1248–1252, 1977.
- [149] M.J. Murcia, D.E. Minner, G.-M. Mustata, K. Ritchie, and C.A. Naumann. Design of quantum dot-conjugated lipids for long-term, high-speed tracking experiments on cell surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**:15054–15062, 2008.
- [150] S. Brandholt. Untersuchung der Wechselwirkung von Fluoreszenten Nanopartikeln mit Proteinen und Zellen. Dissertation, Karlsruhe Institut für Technologie, 2014.

- [151] L. Treuel, S. Brandholt, P. Maffre, S. Wiegele, L. Shang, and G.U. Nienhaus. Impact of protein modification on the protein corona on nanoparticles and nanoparticle - cell interactions. *ACS Nano.*, **8**:503–513, 2014.
- [152] P. Kapusta. Absolute diffusion coefficients: Compilation of reference data for FCS calibration. *PicoQuant GmbH*, **1**:1–2, 2010.
- [153] E.L. Hess und A. Coubure. The intrinsic viscosity of mixed protein systems including studies of plasma and serum. *J. Gen. Physiol.*, **33**:511–523, 1950.
- [154] J.K. Armstrong, R.B. Wenby, H.J. Meiselman, and T.C. Fisher. The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation. *Biophys. J.*, **87**:4259–4270, 2004.
- [155] J. Diao, Y. Ishitsuka, H. Lee, C. Joo, Z. Su, S. Syed, Y.-K. Shin, T.-Y. Yoon, und T. Ha. A single vesicle-vesicle fusion assay for in vitro studies of SNAREs and accessory proteins. *Nat. Protoc.*, **7**:921–934, 2012.
- [156] K. Griesbaum, A. Behr, H.-W. Biedenkapp, D. and Voges, D. Garebe, C. Paetz, G. Collin, D. Mayer, H. Höke, and R. Schmidt. Hydrocarbons. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, pages 1–61, 2013.
- [157] H. Saito, P. Dhanasekaran, F. Baldwin, K.H. Weisgraber, S. Lund-Katz, and M.C. Phillips. Lipid binding-induced conformational change in human apolipoprotein E. Evidence for two lipid-bound states on spherical particles. *J. Biol. Chem.*, **276**:40949–40954, 2001.
- [158] R.W. Mahley, K.H. Weisgraber, and Y. Huang. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J. Lipid. Res.*, **50**:S183–S188, 2009.
- [159] D.V. Devine und J.M. Marjan. The role of immunoproteins in the survival of liposomes in the circulation. *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.*, **14**:105–131, 1997.
- [160] H. Jiang, F.A. Robey, and H. Gewurz. Localization of sites through which C-reactive protein binds and activates complement residues 14-26 and 76-92 of the human C1q A chain. *J. Exp. Med.*, **175**:1373–1379, 1992.

-
- [161] X. Yan, G.L. Scherphof, and J.A.A.M. Kamps. Liposome opsonization. *J. Lipos. Res.*, **15**:109–139, 2005.
- [162] J. Szebeni, L. Baranyi, S. Savay, J. Milosevits, M. Bodo, R. Bunger, and C.R. Alving. The interaction of liposomes with the complement system: *in vitro* and *in vivo* assays. *Method. Enzymol.*, **373**:136–154, 2003.
- [163] A. Johnstone, D. Masin, L. Mayer, and M. Bally. Surface-associated serum proteins inhibit the uptake of phosphatidylserine and poly(ethylene glycol) liposomes by mouse macrophages. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1513**:25–37, 2001.
- [164] M. Price, R. Cornelius, and J. Brash. Protein adsorption to polyethylene glycol modified liposomes from fibrinogen solution and from plasma. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1512**:191–205, 2001.
- [165] J. Sabin, G. Prieto, J. Ruso, P. Messina, F. Salgado, M. Nogueira, M. Costas, and F. Sarmiento. Interactions between DMPC liposomes and the serum blood proteins HSA and IgG. *J. Phys. Chem. B*, **113**:1655–1661, 2009.
- [166] M. Malmsten. Studies of serum protein adsorption at phospholipid surfaces in relation to intravenous drug delivery. *Colloid. Surf. A*, **159**:77–87, 1999.
- [167] J. Andersson, K.N. Ekdahl, J.D. Lambris, and B. Nilsson. Binding of C3 fragments on top of adsorbed plasma proteins during complement activation on a model biomaterial surface. *Biomaterials*, **26**:1477–85, 2005.
- [168] O.A. Hamad, P.H. Nilsson, D. Wouters, J.D. Lambris, K.N. Ekdahl, and B. Nilsson. Complement component C3 binds to activated normal platelets without preceding proteolytic activation and promotes binding to complement receptor 1. *J. Immunol.*, **184**:2686–2692, 2010.
- [169] M. Pekna, L. Nilsson, K.N. Ekdahl, U.R. Nilsson, and B. Nilsson. Evidence for iC3 generation during cardiopulmonary bypass as the result of blood-gas interaction. *Clin. Exp. Immunol.*, **91**:404–409, 1993.

- [170] K.N. Ekdahl, B. Nilsson, M. Pekna, and U.R. Nilsson. Generation of iC3 at the interface between blood and gas. *Scand. J. Immunol.*, **35**:85–91, 1992.
- [171] U.R. Nilsson, K.E. Storm, H. Elwing, and B. Nilsson. Conformational epitopes of C3 reflecting its mode of binding to an artificial polymer surface. *Mol. Immunol.*, **30**:211–219, 1993.
- [172] B. Nilsson, K.N. Ekdahl, D. Avila, Nilsson U.R., and J.D. Lambris. Neoantigens in complement component C3 as detected by monoclonal antibodies. *Biochem. J.*, **268**:55–61, 1990.
- [173] B. Nilsson, K.E. Svensson, P. Borwell, and U.R. Nilsson. Production of mouse monoclonal antibodies that detect distinct neoantigenic epitopes on bound C3b and iC3b but not on the corresponding soluble fragments. *Mol. Immunol.*, **24**:487–494, 1987.
- [174] U.R. Nilsson, L. Funke, B. Nilsson, and K.N. Ekdahl. Two conformational forms of target-bound iC3b that distinctively bind complement receptors 1 and 2 and two specific monoclonal antibodies. *Uppsala journal of medical sciences*, **116**:26–33, 2011.
- [175] E. Bittrich, K.B. Rodenhausen, K.J. Eichhorn, T. Hofmann, M. Schubert, M. Stamm, and P. Uhlmann. Protein adsorption on and swelling of polyelectrolyte brushes: A simultaneous ellipsometry-quartz crystal microbalance study. *Biointerphases*, **5**:159–167, 2010.
- [176] T.J. Halthur und U.M. Elofsson. Multilayers of charged polypeptides as studied by in situ ellipsometry and quartz crystal microbalance with dissipation. *Langmuir*, **20**:1739–1745, 2004.
- [177] M. Westwood, A.R. Kirby, R. Parker, and V.J. Morris. Combined QCMD and AFM studies of lysozyme and poly-l-lysine–polygalacturonic acid multilayers. *Carbohydr. Polym.*, **89**:1222–1231, 2012.
- [178] R. Richter, A. Mukhopadhyay, and A. Brisson. Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: A combined QCM-D and AFM study. *Biophys. J.*, **85**:3035–3047, 2003.

- [179] K. Marx. Quartz crystal microbalance: A useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface. *Biomacromolecules*, **4**:1099–1120, 2003.
- [180] M.J. Santos-Martinez, I. Inkielwicz-Stepniak, C. Medina, K. Rahme, D.M. D’Arcy, D. Fox, J. D. Holmes, H. Zhang, and M.W. Radomski. The use of quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) for studying nanoparticle-induced platelet aggregation. *Int. J. Nanomed.*, **7**:243–255, 2012.
- [181] J.F. Galloway, A. Winter, K.H. Lee, J.H. Park, C.M. Dvoracek, P. Drevreotes, und P.C. Searson. Quantitative characterization of the lipid encapsulation of quantum dots for biomedical applications. *Nanomed. Nanotechnol.*, **8**:1190–1199, 2012.
- [182] T. Skajaa, Y. Zhao, D.J. van den Heuvel, H.C. Gerritsen, D.P. Cormode, R. Koole, M.M. van Schooneveld, J.A. Post, E.A. Fisher, Z.A. Fayad, C. de Mello Donega, A. Meijerink, and W.J.M. Mulder. Quantum dot and Cy5.5 labeled nanoparticles to investigate lipoprotein biointeractions via förster resonance energy transfer. *Nano Lett.*, **10**:5131–5138, 2010.
- [183] J. Schiller, O. Zschörnig, M. Petković, M. Müller, J. Arnhold, und K. Arnold. Lipid analysis of human HDL and LDL by MALDI-TOF mass spectrometry and ^{31}P -NMR. *J. Lip. Res.*, **42**:1501–1508, 2001.
- [184] M.-K. Chang, C.J. Binder, M. Torzewski, and J.L. Witztum. C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**:13043–13048, 2002.
- [185] S. Ito, N. Toitani, L. Pan, N. Tamai, and H. Miyasaka. Fluorescence correlation spectroscopic study on water-soluble cadmium telluride nanocrystals: fast blinking dynamics in the μs –ms region. *J. Phys. Condens. Mat.*, **19**:486208 (10pp), 2007.
- [186] S. Doose, J.M. Tsay, F. Pinaud, and S. Weiss. Comparison of photophysical and colloidal properties of biocompatible semiconductor nanocrystals using fluorescence correlation spectroscopy. *Anal. Chem.*, **77**:2235–2242, 2005.

-
- [187] J.A. Rochira, M.V. Gudheti, T.J. Gould, R.R. Laughlin, J.L. Nadeau, and S.T. Hess. Fluorescence intermittency limits brightness in CdSe/ZnS nanoparticles quantified by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Phys. Chem. C*, **111**:1695–1708, 2007.
- [188] M.J. Murcia, D.L. Shaw, E.C. Long, and C.A. Naumann. Fluorescence correlation spectroscopy of CdSe/ZnS quantum dot optical bioimaging probes with ultra-thin biocompatible coatings. *Opt. Commun.*, **281**:1771–1780, 2008.

Anhang A

Publikationen

Publikationen

1. Y. Klapper*, N. Sinha*, T. Wei Sheng Ng and D. Lubrich. A rotational DNA nanomotor driven by an externally controlled electric field. *Small*, **6**:44-47, 2010.
2. Y. Klapper, M. Vranceanu, Y. Ishitsuka, D. Evans, D. Scheider, G.U. Nienhaus and G. Leneweit. Surface energy densities of phospholipid bilayers and the correlation to their hydration. *J. Colloid. Interf. Sci.*, **390**:267-274, 2013.
3. Y. Klapper, O.A. Hamad, Y. Teramura, G. Leneweit, G.U. Nienhaus, D. Ricklin, J.D. Lambris, K.N. Ekdahl and B. Nilsson. Mediation of a non-proteolytic activation of complement component C3 by phospholipid vesicles. *Biomaterials*, **35**:3688-3696, 2014.
4. Y. Klapper, K. Nienhaus, C. Röcker, and G.U. Nienhaus. Lipid membranes and single ion channel recording for the advanced physics laboratory. *Am. J. Phys.*, **82**: 502-509, 2014.

* Diese Autoren haben den gleichen Beitrag geleistet.

Anhang B

Tagungsbeiträge

Tagungsvorträge

1. Y. Klapper, L. Shang, Y. Ishitsuka, G.U. Nienhaus. Lipid coated quantum dots as a model to study lipid-protein interactions via FCS. 9th European Biophysical Congress EBSA2013, Lissabon, Portugal, 2013

Tagungen und Tagungspublikationen

1. J. Setzler, Y. Klapper, A. Leifert, T. Strunk, A. Ulrich, U. Simon, R. Benz and W. Wenzel. Joint experimental and theoretical investigation of the interaction between antimicrobial peptides, gold nanoparticles and membranes. *Biophys. J.*, **100**:210a, 2011
2. Y. Klapper, M. Vrânceanu, D. Evans, D. Scheider, H. Nirschl, G. U. Nienhaus and G. Lenewit. Modification of surface energies of drug delivery systems to reduce complement reactions in cancer therapy. 4th European-Conference for clinical Nanomedicine (CLINAM 2011), Basel, Schweiz, 2011
3. Y. Klapper, D. Evans, G.U. Nienhaus, G. Lenewit. Correlation between surface energies and hydration: an Investigation of supported lipid bilayers with PEG. Dynamics, Function, and Design of Biological Macromolecules. Joint Meeting of the Swedish and German Biophysical Societies, Hünfeld, Deutschland, 2011
4. Y. Klapper, M. Vrânceanu, R. Popa and G. Lenewit. Interactions between proteins of mistletoe or human serum and lipid membranes. *Phytomedicine*, **18S**:S20, 2011

5. M. Vrânceanu, R. Koehler, Y. Klapper, K. Schleisiek, R. Popa, C. Heyder, E. Hildebrandt, G. Lenewit. Bildung von Membranen durch pharmazeutische Strömungsprozesse und ihre physiologischen Eigenschaften. 5. Mistelsymposium, Nonnweiler, Deutschland, 2011
6. Y. Klapper, M. Vrânceanu, D. Evans, G.U. Nienhaus, G. Lenewit. Characterization of surface energy densities in correlation to the hydration density: an investigation of supported lipid bilayers with PEG. XVII Lipidmeeting, Leipzig, Deutschland, 2011
7. Y. Klapper, P. Maffre, R. Dörlich, Y. Ishitsuka, G.U. Nienhaus. Interaction of complement component C3 with lipid surfaces. Annual Meeting of the German Biophysic Society, Göttingen, Deutschland, 2012
8. Y. Klapper, O. Hamad, Y. Teramura, G. Lenewit, G.U. Nienhaus, K.N. Ekdahl, B. Nilsson. Investigation of complement activation by neutral liposomes. *Immunobiology*, **217**: 1179-1180, 2012, International Complement Workshop, Chania, Griechenland, 2012
9. Y. Klapper, L. Shang, Y. Ishitsuka, G.U. Nienhaus. Lipid encapsulated quantum dots: a versatile platform to study lipid-protein interactions via fluorescent correlation spectroscopy. British-German Biophysics Meeting, Hünfeld, Deutschland, 2013
10. Y. Klapper, L. Shang, Y. Ishitsuka, G.U. Nienhaus. Lipid coated quantum dots as a model to study lipid-protein interactions via FCS. 9th European Biophysical Congress EBSA2013, Lissabon, Portugal, 2013

Besuchte Vorlesungen und Seminare

1. Seminar 'Rhetorik der wissenschaftlichen Präsentation', U. Fetzer, KIT, 4. – 5. Juli 2013 (16 UE 45 min)
2. Module der Karlsruhe School of Optics and Photonics (KSOP)
 - (a) KSOP Technical module 'Laser Material Processing', Prof. Dr. T. Graf, 11. – 15. Februar 2013 (5 Tage)
 - (b) KSOP Personal Key Competence module 'Scientific Writing and Presentation', Dr. C.J. Fitzsimons und E. Magyarosi, 27. Februar - 01.März und 8. – 11. März 2013 (40 UE 45 min)

- (c) KSOP Management module 'International Project Management', 09. – 26. April 2013
- (d) KSOP Key Competence module 'Time and Self-Management in Day-to-Day Academic Life', Dr. S. Schanne, 1. – 2. August 2013 (12 UE 45 min)

Anhang C

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz herzliches Dankeschön, lieber **Herr Prof. Dr. G.U. Nienhaus**, geht an Sie. Sie haben mir die Gelegenheit gegeben, die Fragestellung in Ihrer Arbeitsgruppe weiter zu untersuchen und dadurch eine Vielzahl an Einblicken in die Biophysik ermöglicht; zudem für die Unterstützung, sei es, dass Sie immer weitere Untersuchungsmöglichkeiten an wichtigen Schnittstellen zur Verbesserung der Dissertation vorgeschlagen haben, sei es, durch Ihr Vertrauen neue Ideen zu realisieren.

Für die Übernahme des Korreferats möchte ich **Herrn Prof. Dr. W. Wenzel** ein herzliches Dankeschön aussprechen. Lieber Wolfgang, durch deine offene Art konnte ich immer schon während der Diplomarbeit zu dir kommen und viele Einblicke in das Gebiet der Simulationsmethoden erhalten.

Prof. K. Nilsson Ekdahl and Prof. B. Nilsson: Tack så mycket! Thank you, dear Kristina and dear Bo, for giving me the opportunity to work in your lab, to introduce me to the exciting field of complement, for your kindness and friendliness. Your knowledge about the complement system and the C3 protein is absolutely infinite.

Ihnen, lieber **Herr Dr. G. Leneweit**, vielen Dank für die Unterstützung, die vielen Möglichkeiten, die ich ergreifen durfte während meiner Zeit in Ihrem Labor, und für die gute Zusammenarbeit.

Thanks to all **my colleagues** at the different institutes for their expertise, discussions, ideas - for being such good colleagues. On behalf of all, thanks a lot Marcel, Raluca (Muțumesc), Ellen, Huda (Hvala), Osama (شكرا), Lille-mor, Jaan, Maria, Susanne, Elisabeth (Tack så mycket) och Vivek (धन्यवाद). Sincere thanks are given to **Dr. Y. Teramura**. Dear Yuji, with your expertise, you answered all my questions where ever you have been and gave me so many advices. You have been a real friend (ありがとう).

Mein ganz herzlicher Dank geht an die gesamte **Arbeitsgruppe Nienhaus** für die immerwährende Hilfsbereitschaft. Ihr seid alle klasse!

Besonderen Dank dir, liebe **Pauline**, für die Erklärungen und gemeinsamen Messstunden (Merci beaucoup); Thank you very much **Li**, for all explanations about quantum dots (谢谢). Lieber **Christoph** und lieber **René**, an euch ein herzliches Dankeschön für die lustige Zeit, die Diskussionen, eure offene und herzliche Art. Ich habe viel gelernt durch euch und es war eine wirklich schöne Zeit. Danke für eure Unterstützung! Ebenso an **Karin** für das Korrekturlesen und die vielen Diskussionen, an **Florian** für die Matlab-Hilfen, **Michael** und **Sarah** für die netten Praktikumsstunden, **Andrei** (Вольшое спасибо) für die gemeinsame Arbeit zur Thermophorese, **Yuji** für die gemeinsamen Arbeiten und Diskussionen, sowie allen anderen für die ermutigenden Worte gerade am Ende der Arbeit. Den ganzen fleißigen Helfern der Werkstätten und Sekretariate. Stellvertretend möchte ich hier **Alexander Hepting** und **Michael Hippe** nennen.

Vielen Dank an die **KSOP**, die mich die vergangenen eineinhalb Jahre finanziell unterstützt und einen Blick über den Tellerrand ermöglicht hat.

Meinen Freunden möchte ich an dieser Stelle ebenfalls herzlich danken, für die vielen gemeinsamen Stunden, den Rückhalt und Zusammenhalt.

Danken möchte ich zudem für die wunderbare Unterstützung meiner Familie und das Vertrauen in mich. Dir **Mama**, herzlichen Dank, dass ich immer nach Hause zurückkommen konnte, du immer da warst, dein Verständnis und dass du mir immer Mut zugesprochen hast. Danke auch für das Korrekturlesen der Arbeit. Dir **Ben**, dass du genauso wenig aufgegeben hast mir zuzuhören, wie ich aufgegeben habe, dir von Quantenpunkten, Proteinen und 2fFCS zu erzählen. Danke für deine Ausdauer und für den anderen Blickwinkel, mit dem du meine Sichtweise immer bei allem ergänzt.