

Biochemie

**Strukturelle Organisation  
des alveolaren Surfactant:  
Tensiometrische und  
oberflächenmassenspektrometrische  
Untersuchungen zur Lipidspezifität  
des Surfactant Protein B**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (rerum naturalium)  
im Fachbereich Chemie und Pharmazie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Daniel Breitenstein  
aus Ahaus

2004

Dekan:	Prof. Dr. J. Leker
Erster Gutachter:	Prof. Dr. H.-J. Galla
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. A. Liese
Tag der mündlichen Prüfung:	26.10.2004
Tag der Promotion:	26.10.2004

Der Anspruch auf absolute Gewissheit ist [...] das größte Hindernis für den wissenschaftlichen Fortschritt.

Elisabeth Ströker



# Zusammenfassung

Aufgabe der humanen Lunge ist der diffusionsgetriebene Austausch von Atemgasen zwischen Blut und Luft. Um diese Aufgabe optimal erfüllen zu können, besteht die Lunge aus bis zu 600 Millionen Alveolen, sackartigen Ausstülpungen des Lungenepithels, welche die wesentlichen gasaustauschenden Bereiche der Lunge darstellen. Vereinfachend kann man die Struktur der Lunge mit einer Ansammlung kleinster Hohlräume in einem wässrigen Medium beschreiben. Dies ist eine Struktur, die aufgrund der Oberflächenspannung des Wassers nicht stabil sein sollte. Dass die Alveolenstruktur in der gesunden humanen Lunge dennoch erhalten bleibt, liegt ganz wesentlich an der Minimierung der Oberflächenspannung durch den pulmonalen Surfactant, einem Lipid/Protein-Gemisch, welches an der Oberfläche der Alveolen vermutlich Multischichten ausbildet. Es gibt Hinweise, die durch die Ergebnisse dieser Arbeit gestützt werden, dass diese Multischichten mit dem Lipid Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) hoch angereichert sein müssen, da dieses Lipid vermutlich als einzige Hauptkomponente des Surfactant in der Lage ist, einen Oberflächenfilm auszubilden, der unter der bei Ausatmung erwarteten Kompressionsgeschwindigkeit der Alveolenoberfläche der physiologisch erforderlichen und experimentell ermittelten niedrigen Oberflächenspannung standhält.

Obschon kein exaktes molekulares Modell für einen solchen Anreicherungsprozess vorliegt, wird im Allgemeinen entweder von einer selektiven Absorption des DPPC oder einem selektiven Ausschluss der anderen Lipide aus dem Oberflächenfilm ausgegangen. Eine hohe Bedeutung innerhalb dieses Anreicherungsprozesses scheint das hydrophobe Surfactant Protein B (SP-B) zu haben: Als einziges Protein ist es in der Lage, *in vitro* in Absorptionsexperimenten die Ausbildung der zuvor erwähnten stabilen Oberflächenfilme zu katalysieren.

Wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation des mit dem SP-B wechselwirkenden Lipids. Hierzu wurden zwei Ansätze gewählt: Einerseits wurde mittels Flugzeit-Sekundärionenmassenspektrometrie (ToF-SIMS) die laterale Verteilung von Lipiden und Proteinen in hoch komprimierten Surfactant-Modellsystemen aufgezeigt. Neben den naturidentischen Lipiden wurde hierzu auch ein deuteriertes Lipid eingesetzt. In DPPC/(d62)DPPG/SP-B-Modellsystemen konnte eine laterale Gleichverteilung von DPPC und SP-B-spezifischen Sekundärionen detektiert werden. Demgegenüber waren die DPPG bzw. d62DPPG-Fragmentationen in jenen Bereichen bevorzugt nachweisbar, in denen keine SP-B-Sekundärionen nachweisbar waren.

Der zweite Ansatz war die Untersuchung der Absorptionskatalyse durch SP-B. Es konnte gezeigt werden, dass für die SP-B-induzierte Ausbildung stabiler und somit DPPC-angereicherter Oberflächenfilme kein PG erforderlich ist.

Beide Aspekte lassen sich durch eine spezifische SP-B/DPPC-Wechselwirkung erklären. Sie widersprechen jedoch beide der in der Literatur zumeist vorherrschenden Ansicht einer spezifischen SP-B/PG-Wechselwirkung, ohne dabei den Ergebnissen der meisten dieser Publikationen zu widersprechen. Das in der Diskussion der Arbeit aufgezeigte Modell der physiologischen Bedeutung einer solchen Wechselwirkung im System Lunge lässt sich somit nicht nur – bis auf eine Ausnahme – mit den Publikationen im Bereich der Surfactant-Forschung in Einklang bringen, es passt sich zudem exzellent in ein bereits bestehendes Modell für ein weiteres Surfactant Protein (SP-A) ein.



# Glossar

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
Arg	Arginin
BAM	Brewster Winkel Mikroskopie ( <i>Brewster Angle Microscopy</i> )
Bodypi	2-(4,4-Difluoro-5-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin
CBS	Captive Bubble Surfactometry
Cys	Cystein
DMPC	Dimyristoyl-phosphatidylcholin
DPPC	Dipalmitoyl-phosphatidylcholin
DPPG	Dipalmitoyl-phosphatidylglycerol
DSC	Differential Scanning Calorimetry
EDTA	Etylendiamintetraacetat
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie ( <i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i> )
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz Spektroskopie
FLM	Floureszenzlichtmikroskopie ( <i>Fluorescence Light Microscopy</i> )
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer Analyse
ges. PC	Phosphatidylcholin mit zwei gesättigten Acylresten
Glu	Glutamin
<i>g</i> -Phase	gasanaloge Phase ( <i>gaseous phase</i> )
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
IRDS	Infantile Respiratory Distress Syndrome
LB-Transfer	LANGMUIR-BLODGETT-Transfer
<i>l<sub>c</sub></i> -Phase	flüssig kondensierte Phase ( <i>liquid-condensed phase</i> )
<i>l<sub>e</sub></i> -Phase	flüssig expandierte Phase ( <i>liquid-expanded phase</i> )
LS-Transfer	LANGMUIR-SCHÄFER-Transfer
MALDI-MS	Matrix unterstützte Ionisation durch Laserdesorbtion Massenspektrometrie ( <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry</i> )
n.d.	nicht durchgeführt
NMR	Kern-Magnet-Resonanz-Spektroskopie ( <i>Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy</i> )
NRDS	Neonatal Respiratory Distress Syndrome
nSIMS	Oberflächenmassenspektrometrie negativ geladener Sekundärionen
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol

POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylglycerol
pSIMS	Oberflächenmassenspektrometrie positiv geladener Sekundärionen
PTFE	Polytetrafluorethylen
QAAS	Quantitative Aminosäure Analyse ( <i>Quantitative Amino Acid Analysis</i> )
SAPLIP	Proteinfamilie der Saposin ähnlichen Proteine ( <i>Saposin like Proteins</i> )
SDS	Natrium-Dodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamid Gel Electrophoresis</i> )
Ser	Serin
SFM	Rasterkraftmikroskopie ( <i>Scanning Force Microscopy</i> )
SOPC	1-Stearoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin
SP-A	Surfactant Protein A
SP-B	Surfactant Protein B
SP-C	Surfactant Protein C
SP-D	Surfactant Protein D
s-Phase	festanaloge Phase ( <i>solid phase</i> )
SUV	kleine unilamellare Vesikel ( <i>small unilamellar vesicles</i> )
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin
TLC	Totalkapazität der Lunge ( <i>total lung capacity</i> )
TM	Tubuläres Myelin
ToF-SIMS	Flugzeit-Sekundärionenmassenspektrometrie ( <i>Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry</i> )
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
unges. PC	Phosphatidylcholin mit mindestens einem ungesättigten Acylrest



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Hintergrund</b>	<b>1</b>
1.1	Anatomie der Lunge . . . . .	1
1.2	Physiologie der Lunge . . . . .	4
1.3	Oberflächenspannung und Lungenfunktion . . . . .	5
1.3.1	Oberflächenspannung . . . . .	5
1.3.2	Oberflächenaktive Substanzen . . . . .	7
1.3.3	Hohlräume und Oberflächenspannung . . . . .	7
1.3.4	Oberflächenspannung und Oberflächendruck . . . . .	8
1.3.5	Ausgewählte physikalische Eigenschaften von Lipidoberflächenfilmen . . . . .	10
1.4	Aufgaben des Surfactant . . . . .	10
1.5	Surfactant-Defiziterkrankungen . . . . .	11
1.6	Der Zyklus des Surfactant im gesunden Säugetier . . . . .	12
1.6.1	Aggregate des Surfactant . . . . .	13
1.7	Ansätze zur Erforschung des Surfactant . . . . .	16
1.7.1	<i>In vivo</i> Studien . . . . .	16
1.7.2	<i>In vitro</i> Studien . . . . .	16
1.8	Die Surfactant-Lipide . . . . .	17
1.9	Die Surfactant-Proteine . . . . .	19
1.9.1	Die hydrophilen Surfactant Proteine . . . . .	19
1.9.2	Das hydrophobe Surfactant Protein C . . . . .	20
1.10	Surfactant Protein B . . . . .	21
1.10.1	Struktur . . . . .	21
1.10.2	Expression von SP-B in unterschiedlichen Zelltypen . . . . .	23
1.10.3	Lokalisation des SP-B innerhalb des Surfactant . . . . .	24
1.10.4	Wechselwirkungen mit Surfactant-Lipiden . . . . .	25
1.10.5	Wechselwirkungen mit Surfactant-Proteinen . . . . .	27
1.11	Ziele dieser Arbeit . . . . .	28
<b>2</b>	<b>SP-B und SP-C: Aufreinigung und Bestimmung</b>	<b>29</b>
2.1	Aufreinigung . . . . .	30
2.1.1	Gewinnung der Lavage . . . . .	30
2.1.2	Extraktion der hydrophoben Bestandteile . . . . .	30
2.1.3	Gelfiltrationschromatographische Trennung . . . . .	31
2.1.4	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	32
2.2	Qualitative Bestimmung . . . . .	32
2.2.1	SDS-PAGE . . . . .	33

2.2.2	MALDI-MS und EDMAN-Sequenzierung . . . . .	33
2.2.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	34
2.3	Quantitative Bestimmung . . . . .	39
2.3.1	Fluorescamin-Test . . . . .	39
2.3.2	Phosphor-Bestimmung . . . . .	40
2.3.3	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	40
2.4	Isothermen reiner Proteinfilme . . . . .	41
2.4.1	Ergebnisse . . . . .	41
2.4.2	Diskussion . . . . .	41
2.5	Zusammenfassung . . . . .	44
<b>3</b>	<b>Stabilität von Surfactant-Modellsystemen</b>	<b>45</b>
3.1	Einleitung . . . . .	45
3.1.1	Phasenverhalten von Lipiden . . . . .	45
3.1.2	Stabilität von Lipidoberflächenfilmen . . . . .	47
3.1.3	Ziel der Untersuchungen . . . . .	47
3.2	Methoden . . . . .	48
3.2.1	Captive Bubble Surfactometrie (CBS) . . . . .	48
3.3	Einkomponenten-Lipidsysteme . . . . .	52
3.3.1	Kompression des binären Lipidsystems DPPC/DPPG . . . . .	54
3.3.2	Ternäre DPPC/DPPG- bzw. DPPC/POPG- Monoschichten mit SP-B . . . . .	54
<b>4</b>	<b>Mischungsverhalten von Modellsystemen</b>	<b>61</b>
4.1	Methoden . . . . .	62
4.1.1	Filmwaagemessungen . . . . .	62
4.1.2	Fluoreszenzmikroskopie an der Luft/Wasser-Grenzfläche . . . . .	64
4.1.3	Präparation oberflächenunterstützter Membranen . . . . .	64
4.1.4	Rasterkraftmikroskopie . . . . .	67
4.1.5	Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie . . . . .	68
4.2	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	76
4.2.1	Massenspektren der Einzelkomponenten . . . . .	76
4.2.2	Einkomponentenlipidsysteme . . . . .	78
4.2.3	Zweikomponentensysteme der Lipide: Isothermen und Phasen- separation . . . . .	82
4.2.4	Zweikomponentensysteme der Lipide: Analyse des Mischungsverhaltens mit Hilfe der ToF-SIMS . . . . .	83
4.2.5	Einfluss des H → D Austausches auf DPPG/SP-B- Monoschichten . . . . .	95
4.2.6	Einfluss des H → D Austausches auf DPPC/DPPG/SP-B- Monoschichten . . . . .	95
4.2.7	ToF-SIMS-Untersuchungen des undeuterten ternären Systems	100
4.2.8	ToF-SIMS-Untersuchungen des deuterierten ternären Systems . . . . .	104
4.2.9	Das deuterierte ternäre System unter variierten Rahmenbedingungen . . . . .	107
4.2.10	ToF-SIMS Untersuchungen des deuterierten ternären Systems bei erhöhter Subphasentemperatur . . . . .	109
4.3	Diskussion . . . . .	113
4.3.1	Matrixeffekte der ToF-SIMS? . . . . .	113

4.3.2	Lipid-Bindungstasche des Proteins? . . . . .	114
4.3.3	Art der Protein-DPPC-Wechselwirkung . . . . .	115
<b>5</b>	<b>Vesikelabsorption</b>	<b>117</b>
5.1	Methoden . . . . .	117
5.1.1	Vesikelpräparation . . . . .	117
5.1.2	CBS-Messungen . . . . .	118
5.2	Ergebnisse . . . . .	118
5.3	Diskussion . . . . .	118
<b>6</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion</b>	<b>121</b>
6.1	Überblick über die gezeigten Ergebnisse . . . . .	121
6.2	Überprüfung von Wechselwirkungshypothesen . . . . .	122
6.2.1	Hypothesen . . . . .	123
6.2.2	Beobachtungen zur Spezifität der Wechselwirkung . . . . .	123
6.2.3	Bevorzugter Aufenthalt des Proteins in fluiden Bereichen einer Lipidmonoschicht . . . . .	123
6.2.4	Absorptionskatalyse durch Phosphatidylglycerol und Calcium . . . . .	125
6.2.5	Beobachtungen in der Elektronen-Spin-Resonanz- Spektroskopie . . . . .	126
6.2.6	Mangelnder Phosphatidylglycerol-Gehalt im Surfactant von Rep- tilien, Vögeln und dem Surfactant der Eustachischen Röhre . . . . .	126
6.2.7	Mangelnde Ausbildung stabiler Oberflächenfilme im Surfactant von Reptilien und Vögeln . . . . .	126
6.2.8	Wechselwirkungen im Tubulären Myelin . . . . .	126
6.2.9	Ergebnisse dieser Arbeit . . . . .	127
6.2.10	Zusammenfassung . . . . .	128
6.3	Physiologische Relevanz der Ergebnisse . . . . .	128
6.4	Modell einer SP-B/DPPC-Wechselwirkung . . . . .	129
6.5	Zusammenfassung . . . . .	130
<b>7</b>	<b>Ausblick</b>	<b>131</b>
7.1	Nachweis einer SP-B induzierten DPPC- Anreicherung des Oberflächenfilms im Captive Bubble Surfactometer . . . . .	131
7.2	Evaluierung der ToF-SIMS-Ergebnisse . . . . .	132
7.3	Evaluierung der ESR-Methode mittels ToF-SIMS . . . . .	132
7.4	ToF-SIMS mit anderen Proteinen . . . . .	133
7.5	Analyse der SP-B-Lipid-Wechselwirkungen mit anderen Techniken . . . . .	133
7.6	Zusammenfassung . . . . .	133
<b>A</b>	<b>Materialien</b>	<b>134</b>
A.1	Chemikalien der CBS-Experimente in Abweichung von Tabelle A.4 . . . . .	134
A.2	Materialien der Aufreinigung und der CBS- Experimente in Abweichung von Tabelle A.3 . . . . .	134
A.3	Materialien der Aufreinigung und der ToF-SIMS-Experimente . . . . .	135

A.4 Chemikalien der Aufreinigung und der ToF-SIMS-Experimente . . . . .	136
<b>B ToF-SIMS Massenspektren</b>	<b>137</b>
<b>C Kontraste unterschiedlicher Sekundärionen</b>	<b>148</b>
<b>D Abbildungsverzeichnis</b>	<b>161</b>
<b>E Tabellenverzeichnis</b>	<b>164</b>

# Vorwort

„Ärzte geben Medikamente, über die sie wenig wissen, in Menschenleiber, über die sie noch weniger wissen, zur Behandlung von Krankheiten, über die sie überhaupt nichts wissen.“ [80]. Mit diesem dem französischen Philosophen VOLTAIRE nachgesagten Ausspruch kann man überspitzt die Situation der Behandlung von Surfactant-Defizit-Erkrankungen wie dem Neonatal Respiratory Distress Syndrome (NRDS) und dem Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS) beschreiben: Zwar konnten seit der Einführung der Surfactant-Replacement-Therapie im Jahr 1980 durch FUJIWARA et al. überwältigende Erfolge im Bereich des NRDS erzielt werden [61], dieser Ansatz versagt aber zumeist bei der Behandlung von ARDS.

Für die Therapie dieser beiden Fehlfunktionen der Lunge steht unter anderem der Einsatz von Surfactant-Ersatz-Therapeutika tierischen Ursprungs zur Verfügung. Neben den hohen Kosten dieser natürlich gewonnenen Präparate bleibt das Risiko einer Immunreaktion oder einer Kontamination der Präparate mit Krankheitserregern. Synthetische Präparate, die diese Nachteile nicht aufweisen, sind demgegenüber bislang weniger effizient.

Ein wesentliches Problem in der Entwicklung synthetischer Präparate ist das exakte Verständnis der molekularen Abläufe an der Luft-Wasser-Grenzfläche der Lunge. Zwar sind die Komponenten der Grenzschicht – Proteine und Lipide, der sogenannte Surfactant – bekannt und ihr jeweiliger Anteil am Gesamt-Surfactant-Gemisch ermittelt, aber über die Art und Weise ihrer Wechselwirkungen sowie die Zusammensetzung des sich an der Grenzfläche ausbildenden Oberflächenfilms des Surfactant kann derzeit nur spekuliert werden.

Diese Arbeit liefert einen weiteren Baustein in der Erforschung dieses Wissens. Ein Fokus wird dabei auf die Wechselwirkungen des Surfactant Protein B mit den Lipiden Dipalmitoylphosphatidylcholin und -phosphatidylglycerol gelegt. Zentrale Fragen dieser Arbeit sind: Liegt eine spezifische Wechselwirkung des Proteins mit einem dieser Lipide vor, und welchen Zweck könnte diese im System Lunge erfüllen?



# Kapitel 1

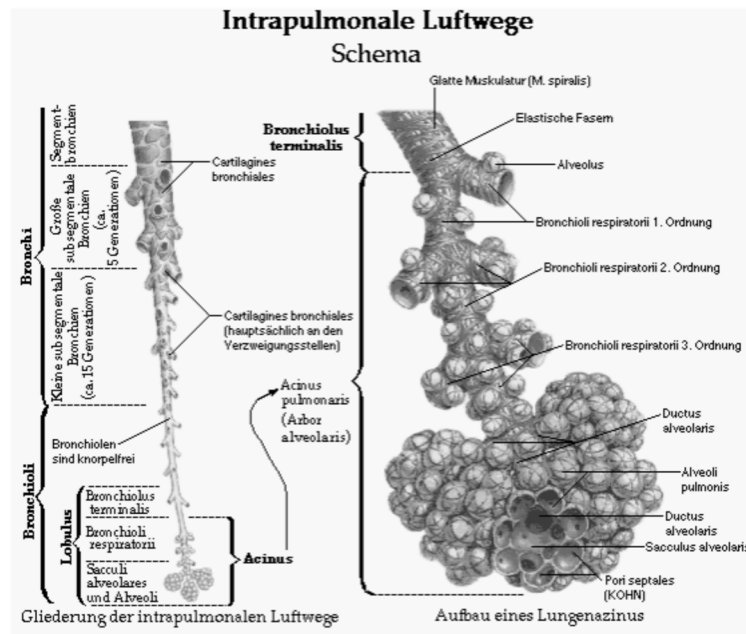
## Hintergrund

### 1.1 Ausgewählte Aspekte der humanen Lungenanatomie

Die Lunge dient dem Austausch von Atemgasen zwischen Luft und Blut. Da dieser Gasaustausch ein diffusionsgetriebener Prozess ist, hängt seine Effizienz ganz wesentlich von der für den Gasaustausch zur Verfügung stehenden Oberfläche und von der Länge der von den Gasen zurückzulegenden Diffusionsstrecke zwischen Luftphase und Blut ab. Beide Faktoren sind in der menschlichen Lunge hochgradig optimiert: Auf einer Oberfläche von 100–120 m<sup>2</sup> hat die zu überwindende Gas-Blut-Barriere eine Schichtdicke von etwa 1  $\mu\text{m}$ . Gewährleistet werden diese optimierten Verhältnisse durch die Anatomie der Lunge: Der Gasaustausch erfolgt in den etwa 500–600 Millionen Alveolen, sackartigen, etwa 300–500  $\mu\text{m}$  durchmessenden Hohlräumen im Lungengewebe [161].

Die Alveolen bilden das Ende des Bronchialbaums, eines weit verzweigten Röhrensystems, das der Luftleitung in die gasaustauschenden Bereiche der Lunge dient (vgl. Abb. 1.1). Der Bronchialbaum gliedert den Aufbau der Lunge: Aus der Luftröhre (Trachea) gehen die beiden Hauptbronchien hervor, die je einen der beiden Lungenflügel mit Luft versorgen. Die Hauptbronchien teilen sich in drei bzw. zwei Lappenbronchien, diese wiederum in Segmentbronchien auf. Sie ermöglichen die anatomische Aufteilung der Lunge in Lungenlappen und -segmente. Nach weiterer Aufspaltung des Luftleitungssystems in mittlere Bronchien, kleine Bronchien, Bronchioli und Bronchioli terminales gabeln sich letztere in Bronchioli respiratorii, die ersten gasaustauschenden Elemente des Bronchialbaumes. An ihnen liegen bereits einzelne Alveolen an. Am Ende des Bronchialbaumes schließen sich die bereits vollständig aus unmittelbar aneinanderliegenden Alveolen bestehenden Ducti alveolares an, die sich in der Regel in zwei Sacculi alveolares der gleichen Struktur aufspalten [8].

Der Durchmesser der Bronchialbaumbestandteile nimmt im Verlauf des Systems von 12,5 mm zu 0,4 mm ab. Sind die größeren Abschnitte bis zu den kleinen Bronchien durch Knorpelstrukturen gestützt, die eine passive Öffnung der Luftwege gewährleisten, so fehlt diese Stützung im weiteren Verlauf des Bronchialbaumes: Hier sorgt die elastische Spannung des Lungengewebes für eine Aufrechterhaltung der Struktur. Im Fall der Bronchioli und Bronchioli terminales kann der Durchmesser dieser Luftleitungen durch die diese Abschnitte umgebende Muskulatur aktiv gemindert, nicht aber erhöht werden. Bis hinab zu den Bronchioli terminales ist das bronchiale Röhrensys-



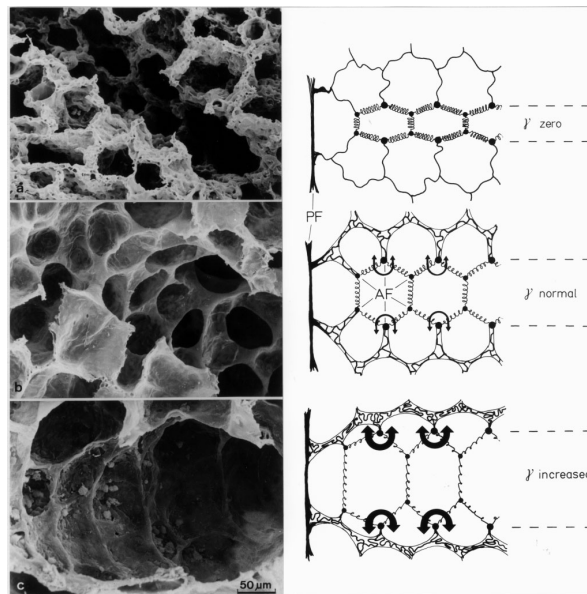
**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung des Bronchialbaums der menschlichen Lunge [110]. Das sich zwischen Trachea und Alveole durchschnittlich 23-mal aufzweigende Röhrensystem dient der Luftleitung zwischen diesen beiden anatomischen Einheiten.

tem mit der Bronchialschleimhaut ausgekleidet, die dem Einfang von Staubpartikeln und deren Abtransport zur Trachea dient. Für letzteres steht als Bestandteil der Bronchialschleimhaut das Flimmerhaarepithel zur Verfügung [161].

Die Öffnungen der Alveolen bilden in den Strukturen der Ducti alveolares und der Sacculi alveolares ein polygonales, zumeist hexagonales Netzwerk (vgl. Abb. 1.2), das am Anfang der Ducti alveolares aus Muskelzellen und im weiteren Verlauf aus kollagenen, elastischen Fasern besteht. Einzelne dünne Bündel aus Kollagenfibrillen durchspannen von diesem Netzwerk aus bienenkorbartig das Bindegewebsseptum der einzelnen Alveolen und verbinden die Bindegewebssepten unterschiedlicher Alveolen miteinander. An diesen Bindegewebssepten sind sowohl die Kapillarnetze als auch die Epithelbedeckungen der Alveolen aufgehängt. Dabei bildet das Bindegewebsseptum keine geschlossene, die Alveole umspannende Einheit, sondern ist von zahlreichen Löchern gekennzeichnet, durch die die einzelnen Kapillaren hin und her gewoben sind [8].

Das Alveolarepithel besteht aus zwei Zelltypen, den Typ II Pneumocyten, die rund 7% der Fläche des Alveolarepithels einnehmen, und den sich aus diesen differenzierenden Typ I Pneumocyten (vgl. Abb. 1.3). Mit einer Epithelbedeckung von 93% haben die Typ I Pneumocyten in erster Linie die Aufgabe einer Deckschicht: Der Zellkern dieser Zellen liegt in einer Masche des Kapillarnetzes und ihr Zytoplasma ist arm an Organellen. Die nur  $0,1 - 0,2 \mu\text{m}$  dicken Zellfortsätze der Typ I Pneumocyten breiten sich bis zu  $50 \mu\text{m}$  um den Zellkern aus und machen mit ihrer zum großen Teil mit





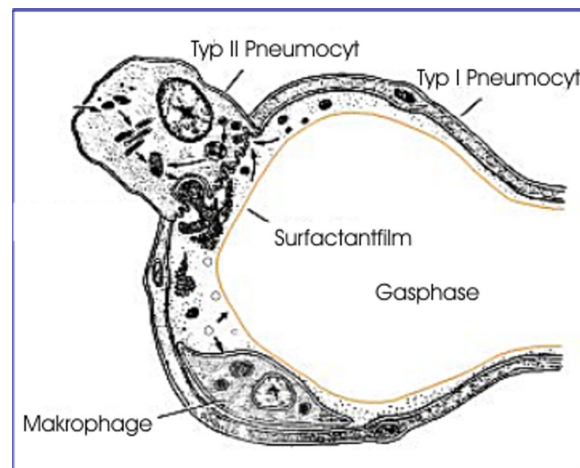
**Abbildung 1.2:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Alveolenstruktur nach unterschiedlicher Fixierung: mit Salzlösung gefüllt ( $\gamma \approx 0$  mN/m, oben); mit Luft gefüllt ( $\gamma \approx 10$  mN/m, Mitte); mit Detergenz gespült ( $\gamma \approx 20$  mN/m, unten) [5]. Die Struktur der Alveolen bei unterschiedlicher Fixierung entspricht den Zuständen der Alveole während des Prozesses der maximalen Einatmung.

der Basallamina der Kapillarzellen verschmolzenen Basallamina den optimal dünnen Bereich der Diffusionsbarriere aus [8].

Die Aufgabe der Typ II Pneumocyten liegt, neben der Differenzierung in Typ I Pneumocyten, vor allem in der Sekretion des pulmonalen Surfactants, eines Protein-Lipid-Gemisches, das in den Alveolarraum abgegeben wird. Zu diesem Zweck weisen diese Zellen einen relativ großen und kompakten Zytoplasmakörper auf, der eine hohe Anzahl an Zellorganellen aufweist. Die Funktion der Typ II Pneumocyten bedingt eine hohe Stoffwechselrate [156].

Im Alveolarraum befinden sich Alveolarmakrophagen, die dem Abbau von Fremdpartikeln und eines Teils des Surfactants im Alveolarraum dienen. Sie wandern aus dem Blut in die Alveolen, sind auch auf der Innenseite der Alveole beweglich und verlassen beladen den Alveolarraum, um im Bindegewebe der Lunge abgelagert bzw. über die Lymphgefäße abtransportiert zu werden [8].

Das Augenmerk dieser Arbeit richtet sich auf den Surfactantfilm der Alveolen. Der Surfactant wird von den Typ II Pneumocyten in eine dünne, wässrige Schicht sekretiert, die als Hypophase bezeichnet wird und den gesamten Alveolarraum benetzt (vgl. Abb. 1.3). Ein Teil der Phospholipide des Surfactants ordnet sich in Mono- oder Multischichten an der Luft-Wasser-Grenzfläche der Hypophase an [56]. Um die Funktion des Surfactants und die Abläufe, die zur Ausbildung und zum Erhalt der Grenzschicht beitragen, eingrenzen zu können, ist eine physiologische Betrachtung der Abläufe in der Lunge und speziell der Alveole während der Atmung sinnvoll.



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung des alveolaren Epithels. Während die Typ I Pneumocyten die optimal dünne Diffusionsbarriere bilden, dienen die Typ II Pneumocyten u.a. der Sekretion des Pulmonales Surfactant. Dessen Zyklus von Sekretion, Ausbildung eines Oberflächenfilms und Endocytose ist durch Pfeile dargestellt.

## 1.2 Ausgewählte Aspekte der humanen Lungenphysiologie

Makroskopisch ist die Physiologie der Atmung gut verstanden: Für die Erfüllung ihrer Funktion wird die Lunge in Atemruhelage durch eine aktive Kontraktion der Inspirationsmuskulatur mit Atemgasen gefüllt und über passive Mechanismen wieder entleert. Beide Prozesse können durch Muskelarbeit aktiv unterstützt werden, so dass sich die für die Atmung zur Verfügung stehende Vitalkapazität der Lunge (4,8 L) aus dem in Atemruhelage beanspruchten Atemzugvolumen (0,5 L) sowie dem inspiratorischen (3,3 L) und dem expiratorischen (1 L) Reservevolumen zusammensetzt. Vitalkapazität und Residualkapazität (1,2 L), also das funktional nicht ausatembare Gasvolumen der Lunge, addieren sich zur Totalkapazität der Lunge (total lung capacity (TLC); 7 L) [40].

Der Atmungsprozess beruht auf der Einstellung des Gleichgewichtes zwischen den elastischen Rückstellkräften der Lunge und den Kräften der Inspirationsmuskulatur. Letztere vergrößern bei ihrer Tätigkeit die beiden Pleurahöhlen, jene Körperhöhlen, die vollständig von je einem Lungenflügel ausgefüllt sind. Die Lungenflügel passen sich dem entstehenden Unterdruck durch Ausdehnung an [143]. Bei diesem Prozess werden die Kollagenfasern des Lungengewebes auf bis zu 170 % ihrer ursprünglichen Länge gedehnt, und die Oberflächenspannung in den Alveolen wird zugleich erhöht [8]. Beide Aspekte führen zum Aufbau einer Spannung, die bei Entspannung der Atemmuskulatur zu einem Zusammenziehen des Systems führt, das die Ausatmung zur Folge hat. Das Wirken dieser elastischen Rückstellkräfte wird durch den starren Brustkorb (Thorax) begrenzt, der einen vollständigen Zusammenfall der Lunge verhindert [40].

Die mechanischen Eigenschaften des Atemvorgangs können durch die Aufnahme einer Druck-Volumen-Funktion der Lunge ermittelt werden. Mit Hilfe eines sogenannten Spirometers können die Druckunterschiede zwischen Atmosphäre und Lungen-

raum während der Atmung verfolgt werden. In Atemruhelage zeigt diese Kurve einen nahezu linearen Verlauf. Die Steigung ( $\Delta V/\Delta P$ ) in diesem Bereich der Funktion wird als Compliance bezeichnet und stellt ein Maß für die Volumendehnbarkeit der Lunge dar. Die Compliance ist bei Erkrankungen, die zu physiologischen Fehlfunktionen der Lunge führen, wie etwa den Surfactantdefiziterkrankungen (vgl. Abschn. 1.5), erniedrigt [143].

Alle Erkenntnisse zur Physiologie der Atmung auf mikroskopischer Ebene beinhalten die Gefahr von Artefakten, wie sie sowohl bei der Präparation und Fixierung von Mikroskopiepräparaten als auch bei der Messung der Oberflächenspannung *in vivo* auftreten können. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen liefern allerdings ein durchaus schlüssiges Bild: Der überwiegende Teil der Dehnung der Kollagenfasern wird auf mikroskopischer Ebene bei der Einatmung von den Kollagenfasern der Alveolenöffnungen geleistet. Demgegenüber fangen die den Alveolarraum durchspannenden Fasern zunächst lediglich einen geringen Teil der Dehnungsenergie auf (vgl. Abb 1.2 Mitte). Erst bei einem Lungenvolumen von mehr als 80 % der Totalkapazität werden auch diese Fasern gedehnt (vgl. Abb 1.2 unten). Die Aufrechterhaltung der Alveolenstruktur ist in diesem Zustand weitgehend unabhängig von der Oberflächenspannung [5], ein Effekt, den man in der Therapie surfactantdefizienter Menschen ausnutzt (vgl. Abschnitt 1.5) [52].

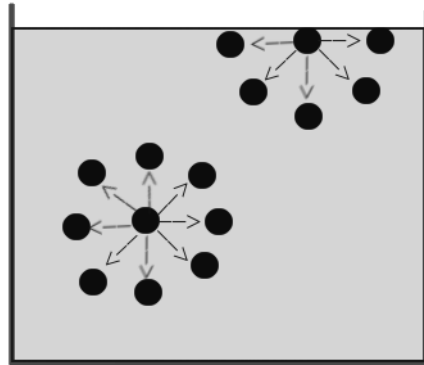
Bei der Ausatmung wird infolge der verminderten Spannung die Alveolenöffnung kleiner, innerhalb der Alveolen kommt es zu einer Ausstülpung und Auffaltung von Kapillaren und Epithel (vgl. Abb 1.2 oben). Obwohl sich die alveolare Oberfläche bei maximaler Atmung um etwa 54 % verkleinert [5], bleibt der Gasaustausch weiterhin optimal gewährleistet. Dies wird dadurch erreicht, dass der ideal dünne Teil der Gasbarriere zwischen Typ I Pneumocyt und Kapillarendothel bevorzugt an der Oberfläche verbleibt [8]. Begleitet wird die Ausatmung von einer Regulierung der Oberflächenspannung (vgl. Abschnitt 1.3) zwischen  $\gamma = 30 \text{ mN/m}$  (maximale Einatmung, 100 % TLC) und  $\gamma < 1 \text{ mN/m}$  (maximale Ausatmung,  $\leq 40$  % TLC) [148]. Die Änderung der Oberflächenspannung ist bei normalen Atemvorgängen allerdings durchaus geringer: Bei einer Veränderung des Lungenvolumens von 80 % auf 40 % TLC, was der Volumenänderung eines tiefen Atemzuges entspricht, ändert sich die Oberflächenspannung lediglich um  $15 \text{ mN/m}$  [5], bei Atemruhelage wird von einer Änderung von lediglich  $5 \text{ mN/m}$  zwischen  $\gamma \leq 1$  und  $\gamma = 5 \text{ mN/m}$  ausgegangen [148].

Diese *in vivo* vom Surfactant gewährleistete Regulation der Oberflächenspannung ist, wie im Folgenden gezeigt wird, ganz wesentlich für die Aufrechterhaltung der Struktur und Funktion der Lunge verantwortlich.

## 1.3 Oberflächenspannung und Lungenfunktion

### 1.3.1 Oberflächenspannung

Moleküle einer Flüssigkeit wirken mit attraktiven Kräften aufeinander ein. Innerhalb der Flüssigkeit erfährt ein Molekül diese Kräfte von allen Seiten, so dass keine gerichtete Kraft resultiert. Bei Molekülen an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche fehlen – aufgrund der zu vernachlässigenden Kräfte aus der Luftphase – diese Kräfte an dieser Seite, so dass die resultierende Kraft zur Flüssigkeit gerichtet ist (vgl. Abb. 1.4). Daraus folgt, dass Moleküle an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche eine höhere potentielle Energie besitzen.



**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung der Oberflächenspannung. Moleküle an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche besitzen eine höhere potentielle Energie, so dass für eine Grenzflächenvergrößerung Arbeit aufgewendet werden muss.

Dies hat mehrere Konsequenzen: Zum einen ist der Zustand maximaler Entropie, der von einem System nach dem zweiten Hauptsatz der Thermodynamik angestrebt wird, dann erreicht, wenn die Flüssigkeit bei konstanter Temperatur und dem Fehlen sonstiger Kräfte eine minimale Oberfläche besitzt. Zum anderen ist eine Vergrößerung der Oberfläche einer Flüssigkeit nur durch Energieaufwand zu gewährleisten. Die Arbeit, die hierzu pro Fläche erforderlich ist, ist abhängig von der potentiellen Energie der Oberflächenmoleküle und somit abhängig von den intermolekularen Anziehungskräften innerhalb der Flüssigkeit.

Thermodynamisch kann die für eine infinitesimale Oberflächenvergrößerung ( $dA$ ) erforderliche Arbeit ( $dw$ ) mit Gl. 1.1 beschrieben werden.

$$dw = \gamma dA \quad (1.1)$$

Der Faktor  $\gamma$  ist hierbei ein flüssigkeitsspezifischer Wert mit der Einheit einer Kraft pro Länge (N/m). Er wird als spezifische Oberflächenenergie oder auch als Oberflächenspannung bezeichnet und ist proportional zu den intermolekularen Wechselwirkungen innerhalb der Flüssigkeit.

Die Funktion der Lunge bedingt eine Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche, wobei der Körper als wässriges Medium aufgefasst werden kann. Wassermoleküle zeigen starke intermolekulare Wechselwirkungen, die in einem vergleichsweise hohen Wert der Oberflächenspannung von  $\gamma = 69,5 \text{ mN/m}$  ( $37^\circ\text{C}$ ) zum Ausdruck kommen.

### Konsequenzen für die Lungenfunktion

Aus dem zuvor Beschriebenen wird ersichtlich, dass für die Oberflächenvergrößerung, die in der Lunge bei Einatmung stattfindet, Energie benötigt wird. Diese muss von der Inspirationsmuskulatur zur Verfügung gestellt werden.

Eine deutliche Minimierung der Atemarbeit tritt ein, wenn der Wert für  $\gamma$  sinkt, wenn die Oberflächenspannung also erniedrigt wird. Dies ist eine Aufgabe, die in der Lunge dem Surfactant zugeschrieben wird. Stoffe, die die Oberflächenspannung herabsetzen, wie dies die Lipide des Surfactant gewährleisten, werden oberflächenaktive Substanzen (engl.: **surface active agent**, *surfactant*) genannt.

### 1.3.2 Oberflächenaktive Substanzen

Die Oberflächenspannung von Wasser variiert mit der Temperatur, kann aber auch durch die Zugabe von oberflächenaktiven Substanzen gemindert werden.

Oberflächenaktive Substanzen sind Stoffe, die sich an der Luft-Wasser-Grenzfläche anreichern. Bedingt wird dieser Vorgang durch den amphipathischen Charakter dieser Stoffe: Die repulsiven Kräfte, die die hydrophoben Bereiche der Amphipathen durch die Wassermoleküle erfahren, führen zu einer Anordnung an der Luft-Wasser-Grenzfläche, bei der die hydrophoben Molekülbereiche bevorzugt in wasserabgewandter Richtung positioniert sind.

Der Anreicherungsprozess der Amphipathen an der Oberfläche geht mit einer Verminderung der potentiellen Energie der Oberflächenmoleküle und somit der Oberflächenspannung einher, und erfolgt bis zur Einstellung eines thermodynamischen Gleichgewichts zwischen Subphase und Grenzschicht.

Im System Lunge wird die Oberflächenspannung mit Hilfe von amphipathischen Lipiden reguliert. Das thermodynamische Gleichgewicht der Absorption von Lipiden aus der Subphase an die Luft-Wasser-Grenzfläche liegt, wenn die Lipide in der Subphase im Überschuss vorliegen, bei einer Oberflächenspannung von etwa  $\gamma = 22 - 25 \text{ mN/m}$  [130]. In der Lunge werden bei maximaler Ausatmung allerdings deutlich geringere Werte gemessen. Die Notwendigkeit, die Oberflächenspannung oberhalb des Gleichgewichtswertes einzustellen, ist eine Konsequenz der Hohlraumstruktur der Alveolen.

### 1.3.3 Hohlräume und Oberflächenspannung

Dass das Erreichen einer minimalen Oberflächenspannung in der Lunge nicht nur in Bezug auf den energetischen Aufwand der Atemarbeit sinnvoll ist, sondern für die Aufrechterhaltung der Lungenstruktur notwendig ist, kann mit der Laplace-Gleichung beschrieben werden.

#### Laplace-Gleichung

Alveolen lassen sich als kugelförmige Hohlräume in einer wässrigen Lösung auffassen. Solche Hohlräume sind dann stabil, wenn ein Gleichgewicht zwischen denjenigen Kräften vorliegt, die eine Verkleinerung, und denjenigen Kräften, die eine Vergrößerung der Kugeloberfläche bewirken. Soll ein solcher Hohlraum reversibel vergrößert werden, muss Druck-Volumen-Arbeit verrichtet werden:

$$dw = \Delta p \, dV \quad (1.2)$$

Hierbei entspricht  $\Delta p$  der Druckdifferenz zwischen Hohlraum und umgebendem Medium. Vereinfachend ist die zu leistende Arbeit diejenige, die für die Oberflächenvergrößerung nach Gl. 1.1 benötigt wird. Es ergibt sich also:

$$\gamma \, dA = \Delta p \, dV \quad (1.3)$$

Oberfläche ( $A$ ) und Volumen ( $V$ ) einer Kugel mit bekanntem Radius ( $r$ ) sind gegeben durch

$$A = 4\pi r^2 \quad (1.4)$$

und

$$V = \frac{4}{3}\pi r^3 \quad (1.5)$$

Es ergibt sich also aus Gleichung 1.3:

$$\gamma 8\pi r \, dr = \Delta p 4\pi r^2 \, dr \quad (1.6)$$

bzw.:

$$\Delta p = \frac{2\gamma}{r} \quad (1.7)$$

Gl. 1.7 ist als Laplace-Gleichung bekannt. Sie besagt u.a., dass im Inneren eines Hohlraumes ein höherer Druck vorherrschen muss als auf der Außenseite lastet<sup>1</sup>. Aus der Laplace-Gleichung lassen sich mehrere Konsequenzen für die Alveolenfunktion ableiten.

### Stabilität der Alveolen

Geht man davon aus, dass der Körper zu einem beliebigen Zeitpunkt der Atmung einen konstanten Außendruck auf jede Alveole aufbaut<sup>2</sup>, so müsste in kleineren Alveolen ein größerer atmosphärischer Druck vorherrschen. Diese Annahme ist durch die miteinander in Kontakt stehenden Gasräume der Alveolen unphysiologisch. Alternativ könnten Stützstrukturen des Lungengewebes in den großen (kleinen) Alveolen den für die Erfüllung der Laplace-Gleichung fehlenden Außendruck (Innendruck) kompensieren. Dies ist insbesondere bei maximaler Ausatmung eine unphysiologische Annahme: In diesem Zustand sind die Kollagenfasern entspannt, das Epithel und die Kapillaren sind gefaltet (vgl. Abschnitt 1.2). Eine Strukturstützung ist somit nicht möglich. Die Konsequenz wäre das Kollabieren kleiner Alveolen zugunsten großer Alveolen – ein Vorgang der Atelektase genannt wird und zum Krankheitsbild der Surfactantdefiziterkrankungen gehört (vgl. Abschnitt 1.5).

Dass in gesunden Lungen keine Atelektasen zu beobachten sind, ist die Konsequenz einer Minderung der Oberflächenspannung  $\gamma$  auf minimale Werte. Dies ist eine weitere Aufgabe, die in der Lunge dem Surfactant zugewiesen wird. Der Surfactant dient somit als Anti-Atelektase-Faktor.

### Ödembildung

Selbst wenn die Struktur der Alveole einen ausreichenden Widerstand gegen einen Zusammenfall kleiner Alveolen aufbringen könnte, wäre eine Funktion der Lunge nicht gewährleistet: Die zur Erfüllung der Laplace-Gleichung nicht ausreichende Druckdifferenz zwischen Blut und Atmosphäre hätte ein Eindringen von Flüssigkeit aus dem Blut in den Alvolarraum (Ödembildung) zur Folge. Der Surfactant dient demnach auch als Anti-Ödem-Faktor.

### 1.3.4 Oberflächenspannung und Oberflächendruck

Voraussetzung der beiden letztgenannten Aufgaben des Surfactant ist, dass der Lipidfilm über den Wert der Oberflächenspannung des Absorptionsgleichgewichtes (vgl.

<sup>1</sup>unter der Voraussetzung, dass  $\gamma > 0$  und  $r < \infty$ .

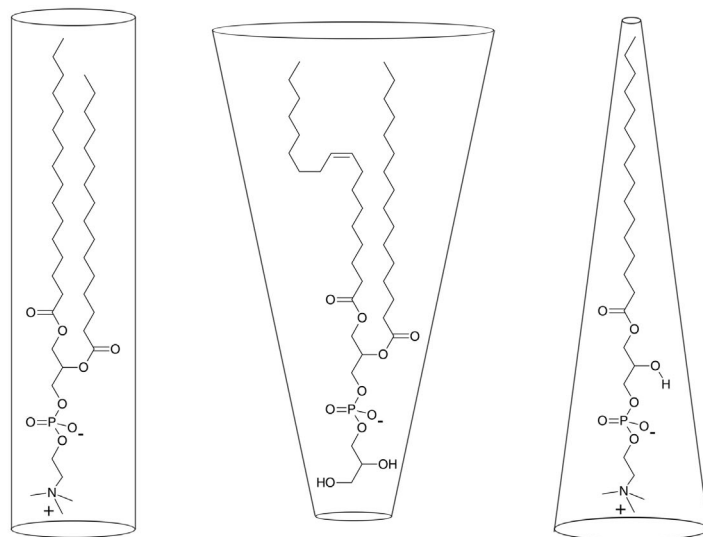
<sup>2</sup>Im Realfall lastet auf den Alveolen an der je nach Körperlage unteren Lungenseite ein höherer hydrostatischer Druck, der zu einer verminderten Größe der Alveolen in diesem Bereich führt [8]. Für benachbarte Alveolen mag diese Annahme aber stimmen.

Abschn. 1.3.2) komprimiert werden kann. Für die Beschreibung solcher Systeme eignet sich die physikalische Größe des Oberflächendrucks  $\Pi$ , die eng mit der Oberflächenspannung verknüpft ist, und die definiert ist als:

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \quad (1.8)$$

mit  $\gamma_0$  als Oberflächenspannung der reinen Subphase und der Oberflächenspannung  $\gamma$ .

Anschaulich ist  $\Pi$  der zweidimensionale Druck, der von den oberflächenaktiven Substanzen an der Grenzfläche auf eine Strecke ausgeübt wird. Die Einheit Kraft pro Strecke (N/m) wird im Fall des Oberflächendrucks anschaulicher als bei der Oberflächenspannung. Aus Gleichung 1.8 wird ersichtlich, dass der Oberflächendruck maximal den Zahlenwert der Oberflächenspannung der reinen Subphase erreichen kann, im Fall der Subphase Wasser also 69,5 mN/m (37 °C) bzw. 72,4 mN/m (20 °C). Diese Werte werden vom Säugersurfactant nahezu erreicht. Allerdings sind nicht alle Lipide in gleichem Maße über den Oberflächendruck des Absorbtionsgleichgewichtes – den sogenannten Gleichgewichtsspreitdruck – hinaus kompressibel.



**Abbildung 1.5:** Struktur und Geometrie unterschiedlicher Lipide. Lipide können – in guter Näherung – eine zylindrische, konische oder invers konische Geometrie aufweisen. Beispielhaft gezeigt sind die Lipide Dipalmitoyl-phosphatidylcholin (DPPC; Links; zylindrische Geometrie), 1-Palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholin (POPG; Mitte; konische Geometrie) und 1-Palmitoyl-2-hydroxy-phosphatidylcholin (16:0 Lyo-PC; Rechts; invers konische Geometrie).

### 1.3.5 Ausgewählte physikalische Eigenschaften von Lipidoberflächenfilmen

#### Metastabilität von Lipidfilmen

Inwieweit Lipidfilme über das thermodynamische Gleichgewicht hinaus komprimiert werden können, hängt ganz wesentlich von ihrer räumlichen Struktur ab. So können Lipide in guter Näherung konische, invers konische und zylindrische Geometrie aufweisen (vgl. Abb. 1.5). Der Einbau von konischen (z.B. ungesättigte Phospholipide) oder invers konischen Lipiden (z.B. Lyso-Lipide) in eine Lipidmonoschicht führt zu deren Instabilität. Einkomponenten-Monoschichten aus solchen Nicht-Bilayer-Lipiden sind allenfalls geringfügig über den Gleichgewichtsspreitdruck komprimierbar.

Zylindrische Lipide (Bilayer-Lipide), wie etwa Phosphatidylcholine mit zwei gesättigten Acylgruppen unterhalb ihrer Umwandlungstemperatur, sind hingegen in der Lage, äußerst stabile Monoschichten zu bilden, die bis zum maximal erreichbaren Oberflächendruck komprimierbar sind. Oberhalb der Umwandlungstemperatur der Phosphatidylcholine kollabieren solche Oberflächenfilme, da sich die Geometrie der Lipide ändert [130]. Die Stabilität des Lipidfilms an der Luft-Wasser-Grenzfläche ist Voraussetzung für ein Funktionieren des Systems Lunge.

Die Abhängigkeit der Stabilität vom Phasen- und Mischungsverhalten der Lipide in der Monoschicht sind ein wesentlicher Gegenstand dieser Arbeit. Zur weiteren Erläuterung dieser Aspekte sei auf den experimentellen Teil der Arbeit verwiesen (vgl. Abschn. 3, 4 und 6).

#### Absorption von Lipiden an die Luft-Wasser-Grenzfläche

Die Absorption von Lipiden an die Luft-Wasser-Grenzfläche ist zwar ein thermodynamisch begünstigter Prozess, kinetisch ist er allerdings extrem langsam: DPPC/DPPG-Vesikel benötigen für das Erreichen eines Oberflächenfilms im Gleichgewichtsspreitdruck mehr als eine Stunde [115]<sup>3</sup>. Im funktionierenden System Lunge ist eine derart langsame Kinetik nicht denkbar. Der Absorptionsprozess der Lipide an die Luft-Wasser-Grenzfläche muss in diesem System von den Surfactantproteinen katalysiert werden.

## 1.4 Aufgaben des Surfactant

Zusammenfassend kommen dem Surfactant demnach während der Atmung folgende Funktionen zu (vgl. Abschn. 1.3) [37]:

- **Reduzierung der Atemarbeit**
- **Anti-Atelektase-Faktor**
- **Anti-Ödem-Faktor**

Zu beachten ist, dass dem Surfactant darüber hinaus noch weitere Aufgaben zukommen bzw. zukommen könnten:

---

<sup>3</sup>Kleine unilamellare Vesikel (DPPC/DPPG, 7:3 mol%) in calciumhaltigem HEPES-Puffer (400 nmol Lipid/mL) unter vorgesprenktem Oberflächenfilm der gleichen Zusammensetzung ( $\gamma = 20 \text{ mN/m}$ ).



- **Primäres Immunsystem:** Die immense Oberfläche der Lunge bietet einen guten Angriffspunkt für Viren und Bakterien, die die Atemwege passieren konnten. Die Oberfläche der Alveolen stellt somit eine erste Verteidigungslinie des Immunsystems dar. Hydrophile surfactantspezifische Proteine initiieren *in vitro* die Phagozytose solcher Fremdstoffe durch die alveolaren Makrophagen [61].
- **Unterstützung des mucoziliären Abtransports:** Nicht vollständig geklärt ist, ob der Abtransport von Fremdstoffen aus der Alveole ausschließlich über die Macrophagen erfolgt, oder ob der Surfactant solche Kontaminationen teilweise der Bronchialschleimhaut zum Abtransport zuführt [50].
- **Anti-Adhäsions-Faktor:** Insbesondere in den Schwimmblasen von Fischen und in den Lungen einiger tauchender Reptilien verhindert der Surfactant das Verkleben dieser Hohlräume, wie er bei vollständiger Entleerung durch Adhäsion der Oberflächen vorstellbar ist [37]. In den Parabronchien, dem Atmungssystem der Vögel, verhindert der Surfactant vermutlich ein Verkleben der hier für den Luftaustausch verantwortlichen Kapillaren [10]. Diese Anti-Adhäsions-Funktion ist auch in den kapillaren terminalen Atemwegen und in den Faltstrukturen der Säugerlveole unter Ausatmung vorstellbar [10, 37].
- **Anti-Oxidanz:** Der Sauerstoff-Kontakt des Surfactant macht seine Funktion als Anti-Oxidanz notwendig [50]. Zu diesem Zweck enthält es geringe Mengen des lipophilen Vitamin E [170].

## 1.5 Surfactant-Defiziterkrankungen

Die hohe Bedeutung, die der Surfactant für die Lungenfunktion hat, wird in den Folgen der Surfactant-Defiziterkrankungen NRDS und ARDS deutlich. In beiden Fällen leitet eine Fehlfunktion des Surfactant einen Teufelskreis ein: Das Fehlen oder die Inaktivierung des Surfactant führt zu einem Kollaps der Lungenstruktur. Dadurch dringen Blutbestandteile in den Alveolarraum ein, die die Inaktivierung des Surfactant voranschreiten lassen [158]. Ohne Behandlung führt dieser sich selbst verstärkende Effekt bei beiden Erkrankungen zumeist zum Tod des Patienten.

### Neonatal Respiratory Distress Syndrome

Das Neonatal oder auch Infantile Respiratory Distress Syndrom (NRDS, IRDS) kann bei Neugeborenen, insbesondere bei Frühgeborenen, auftreten. Die fehlende Lungenreife dieser Patienten führt zu einem Mangel oder der Abwesenheit von Surfactant. Die Lethalität bei Frühgeborenen liegt trotz Behandlung bei 14–30% [50]. NRDS kann prophylaktisch durch die Gabe von Steroidhormonen an werdende Mütter, die sich in einer Risikoschwangerschaft befinden, begegnet werden. Zeigt ein Säugling NRDS-Symptome, so kann, neben der Beatmung des Patienten, ebenfalls die Gabe dieser, den Lungenreifungsprozess beschleunigenden Hormone angezeigt sein. Große Erfolge zeigt darüber hinaus die ein oder mehrmalige intratracheale Gabe von Surfactant-Ersatz-Präparaten [55]. Mit dieser Therapieform kann die Sterblichkeit von 500–1500g schweren Frühgeborenen mit NRDS um etwa 30% reduziert werden [149]. Die Einführung dieser Therapieform als Standardverfahren in den USA im Jahr 1990 ging mit einer Verringerung der Sterblichkeit von 9,7‰ (1989) auf 8,3‰ (1992) einher [177, 178]. Etwa 50–80% des Rückganges von 1989 bis 1990 – die Sterblichkeit

lag hier bei 9,1‰ – wird auf die Einführung der Surfactant-Replacement-Therapie zurückgeführt [149].

Bei den verwendeten Präparaten handelt es sich entweder um aus bovinen (z.B. Survanta<sup>®</sup>, Alveofact<sup>®</sup>, Infasurf<sup>®</sup>) oder porcinen (Curosurf<sup>®</sup>) Lungen gewonnene hydrophobe Surfactant Extrakte oder um proteinfreie Lipidgemische (z.B. Exosurf<sup>®</sup>). Allerdings sind die synthetischen, proteinfreien Präparate weniger effektiv in der Behandlung von NRDS [50]. Dem Erfolg der Surfactant-Replacement-Therapie stehen neben den hohen Kosten – 8 mL des Präparates Survanta<sup>®</sup> kostet für die einmalige Gabe derzeit etwa 1.300 €<sup>4</sup> – vor allem die Anwendung von tierischen Proteinen entgegen. Zwar ist dies aufgrund der hohen Homologie der Surfactant Proteine innerhalb der Klasse der Säugetiere und aufgrund des noch nicht vollständig entwickelten Immunsystems der Säuglinge aus immunologischer Sicht zumeist unproblematisch, allerdings besteht die (geringe) Gefahr der Kontamination der Präparationen mit Krankheitserregern [50].

### Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)

Diese auch als Schocklunge bezeichnete Erkrankung betrifft in hochentwickelten Staaten wie den USA etwa 13 – 18 Patienten pro 100.000 Personen jährlich [164]. Die der Erkrankung zugrunde liegende Surfactant-Disfunktion kann unterschiedliche Ursachen haben, wie etwa die Einatmung von Fremdstoffen (Mageninhalt, Wasser beim Beinahe-Ertrinken) bzw. das Vorliegen einer schweren Lungenentzündung oder einer Embolie [164]. Wesentlicher Aspekt der intensivmedizinischen Behandlung des ARDS ist eine ausgefeilte Beatmungsstrategie, deren Ziel sowohl die Vermeidung einer Überdehnung des Lungengewebes bei Einatmung als auch die Vermeidung eines Zusammenfalls der Alveolen bei Ausatmung ist (vgl. Abschn. 1.2) [52]. Mit dieser, eine weitergehende Verletzung des Lungengewebes vermeidenden Behandlung konnte die Sterblichkeit der Betroffenen von 53 – 68 % (1979) inzwischen auf 32 – 45 % reduziert werden [164].

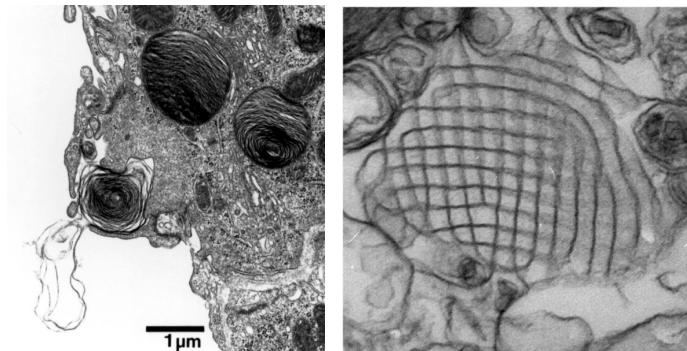
Die zusätzliche Gabe von Surfactant-Ersatz-Präparaten erweist sich beim ARDS (bisher) als erfolglos. Die Begründung hierfür wird in der Inaktivierung des Surfactant durch die in Folge der Lungenverletzungen in den Alveolarraum eindringenden Blutbestandteile gesucht [158].

Um gegebenenfalls die Therapie beider Krankheiten verbessern zu können, ist ein Verständnis der Abläufe, die die Funktion des Surfactant ermöglichen, notwendig. Wie im Folgenden gezeigt wird, ist bisher ein exaktes Verständnis der molekularen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Surfactant-Komponenten innerhalb der von ihnen gebildeten Surfactant-Aggregate nicht gegeben.

## 1.6 Der Zyklus des Surfactant im gesunden Säugetier

Über wesentliche Punkte des Surfactant-Zyklus herrscht eine einheitliche Betrachtung vor: Der Surfactant kommt in unterschiedlichen Aggregaten vor, die verschiedene Stationen des Surfactant-Zyklus bilden: Aus den Lamellar Bodies, die aus den Typ II Pneumocyten sekretiert werden, formt sich Tubuläres Myelin, aus dem der Oberflächenfilm spreitet [56]. Teile des Oberflächenfilms werden während der Atmung

<sup>4</sup>8 mL Präparat sind ausreichend für 2 kg Körpergewicht.



**Abbildung 1.6:** Lamellar Body und Tubuläres Myelin. Links: Lamellar Body bei der Exocytose aus einem Typ II Pneumocyten [137]. Rechts: Tubuläres Myelin in Assoziation mit sekretierten Lamellar Bodies [102].

kontinuierlich in kleine Lipidaggregate abgebaut, die von den Typ II Pneumocyten endocytiert und zum größten Teil recycled oder von den Alveolarmakrophagen phagocytiert und abgebaut werden. Etwa 85 % des Surfactant werden endocytiert, 10 % werden phagocytiert. Die verbleibenden 5 % werden unter Umständen der Bronchialschleimhaut zugeführt. Die Halbwertszeit der unterschiedlichen Surfactantkomponenten beträgt zwischen fünf und zwölf Stunden für Phospholipide und zwischen 6,5 und 28 Stunden für Surfactant Proteine [72].

### 1.6.1 Aggregate des Surfactant

#### Lamellar Bodies

Lamellar Bodies (LB) sind Granuli von 1–2  $\mu\text{m}$  Durchmesser, die in den Typ II Pneumocyten der Lagerung sowie der Sekretion von Surfactantlipiden und -proteinen dienen. Die Phospholipide liegen dabei in dicht gepackten, konzentrisch angeordneten Doppelschichten vor (vgl. Abb. 1.6) und weisen eine ähnliche Zusammensetzung wie die restlichen Surfactant-Aggregate auf: Dem hohen Anteil an Phosphatidylcholin stehen acide Phospholipide wie Phosphatidylglycerol entgegen [137]. Um ladungsbedingte repulsive Kräfte zu unterbinden, enthalten Lamellar Bodies einen hohen Calciumanteil. Ähnlich wie Lysosomen haben sie zudem einen aciden Innenraum (pH 5,5) [176].

Neben den Lipden und einigen lysosomalen Proteinen [176] beinhalten die Lamellar Bodies die surfactantspezifischen Proteine SP-A, B und C [117]. Für SP-B und SP-C scheinen die Lamellar Bodies der einzige Sekretionsweg zu sein [137]. Beide Proteine zeigen in den Lamellar Bodies eine erhöhte Konzentration gegenüber dem alveolaren Surfactant [117]. Insbesondere SP-B ist darüber hinaus entscheidend an der korrekten Packung der Lipid-Doppelschichten beteiligt: In Abwesenheit von SP-B werden keine Lamellar Bodies sondern große Membran-Einschlüsse ausgebildet. Diese werden als kleine, proteinhaltige Vesikel in den Alveolarraum sekretiert [23].

Die Exocytose der Lamellar Bodies wird, neben einigen anderen Regelungsmechanismen, ganz wesentlich über einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration angeregt [137]. Dieser Anstieg der Calciumkonzentration ist wiederum eine Antwort auf eine Dehnung der Typ II Pneumocyten, wie sie vermutlich bei der Einatmung

geschieht [46]. Es überrascht daher nicht, dass die zwei bekannten Stimuli für die Surfactant-Sekretion künstliche Beatmung und sportliche Aktivität sind [137].

### **Tubuläres Myelin**

Nach der Sekretion aus den Typ II Pneumocyten formt sich aus den geöffneten Lamellen meist mehrerer Lamellar Bodies das Tubuläre Myelin (TM) [56]. Das Tubuläre Myelin ist eine geometrisch hoch geordnete Struktur: Röhren aus Phospholipiden lagern sich zu einem repetitiven quadratischen Grundmuster an (vgl. Abb. 1.6). Die Kantenlänge von etwa 40 nm wird vermutlich durch vier SP-A Moleküle aufgespannt, die die Diagonale der Quadrate bilden [122, 106].

Im TM lassen sich neben Surfactantlipiden und SP-A auch SP-C und SP-B nachweisen [123]. Die Funktion des Tubulären Myelin ist nicht exakt geklärt. Es wird allerdings vermutet, dass es der Katalyse der Insertion von Lipiden in den Oberflächenfilm dient: Über Gradientenzentrifugation gewonnene Fraktionen, die TM enthalten, zeigen eine raschere Oberflächenabsorption als andere Fraktionen des Surfactant [125], und mikroskopische Aufnahmen zeigen TM in einem Kontinuum mit dem Oberflächenfilm [169].

### **Oberflächenfilm**

Die Regulation der Oberflächenspannung in der Alveole erfolgt durch den Oberflächenfilm. Inzwischen konnte ein solcher Oberflächenfilm von zahlreichen Arbeitsgruppen fixiert und somit nachgewiesen werden. Es konnte geklärt werden, dass dieser Film kontinuierlich die Hypophase überspannt [5] und möglicherweise durchgängig als Multischicht vorliegt [146]. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der Oberflächenfilm die Ausstülpungen der Alveolenwand unter Ausatmung schlaff überdeckt, während er unter Einatmung zu einer Glättung der Alveolenwandstruktur beiträgt. Abbildung 1.7 zeigt den bei niedriger und hoher Oberflächenspannung fixierten Oberflächenfilm: Der abgebildete Alveolarmakrophage flacht sich unter Einfluss der gestiegenen Oberflächenspannung deutlich ab und scheint von dieser komprimiert zu werden [5].

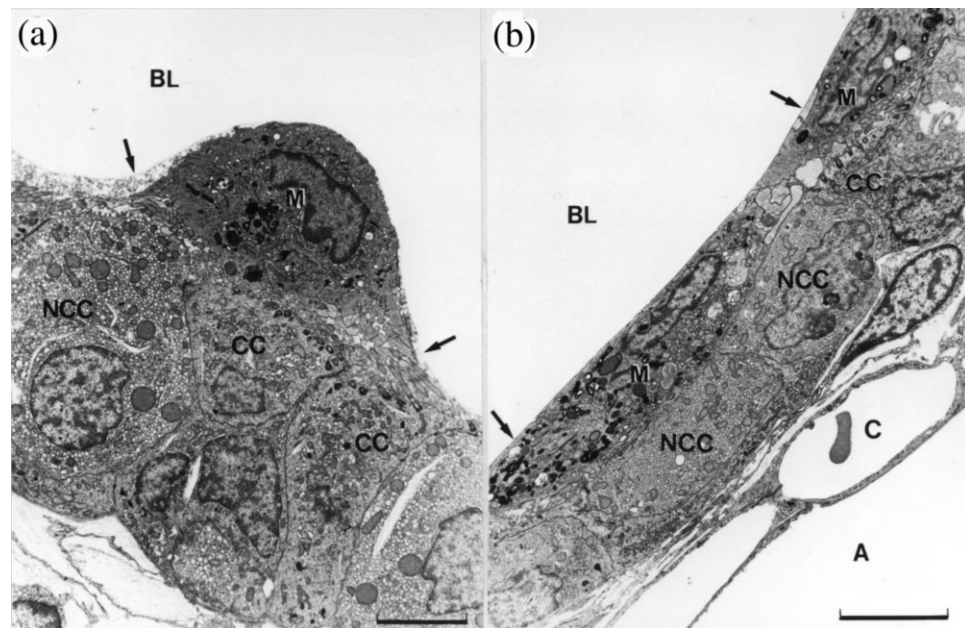
Die exakte Zusammensetzung des Oberflächenfilms ist umstritten. Wegen seiner Oberflächenaktivität wird gegenüber den restlichen Surfactant-Aggregaten eine Anreicherung an Phosphatidylcholinen mit zwei gesättigten Acylgruppen erwartet [24]. Ebenso ist unklar, wie der Absorptions- und Desorptionsprozess an die Oberfläche vonstatten geht, und wie es zu einer solchen Anreicherung kommen kann. Eine hohe Bedeutung bei diesen Prozessen wird den hydrophoben Surfactant-Proteinen SP-C und SP-B zugesprochen [123], ohne dass exakte molekulare Mechanismen eines solchen Prozesses bekannt sind. Grundsätzlich existieren vier Denkrichtungen [125]:

- **Selektive Absorption:**

Eine selektive Absorption von Bilayer-Lipiden in den Oberflächenfilm setzt eine selektive Katalyse des Einbaus dieser Lipide voraus. In der Regel wird dem Tubulären Myelin die Aufgabe zugewiesen, entscheidend an dieser Selektion beteiligt zu sein.

- **Squeeze-out:**

Die selektive Desorption von nicht Bilayer-Lipiden aus dem Oberflächenfilm hat als „Squeeze-out-Hypothese“ Eingang in die Literatur gefunden. Diese Hypothese geht davon aus, dass Nicht-Bilayer-Lipide selbsttätig oder von Surfactant-Proteinen katalysiert aus dem Oberflächenfilm desorbieren.



**Abbildung 1.7:** Oberflächenfilm (Pfeil) und Makrophage („M“). Links:  $\gamma \approx 2 \text{ mN/m}$ ; Rechts:  $\gamma \approx 20 \text{ mN/m}$  [5]. Der Makrophage wird vermutlich unter dem Einfluss der steigenden Oberflächenspannung komprimiert.

- **Kombination aus selektiver Absorption und Squeeze-out:**

Zahlreiche Autoren gehen davon aus, dass es in der Lunge zu einer Kombination der beiden zuvor genannten Mechanismen kommt.

- **Keine Anreicherung:**

Aktuelle Ergebnisse der Arbeitsgruppe um HALL deuten darauf hin, dass ein Anreicherungsprozess unter bestimmten Bedingungen nicht notwendig ist. So brachte die äußerst schnelle Kompression der gesamten hydrophoben Fraktion des Surfactant stabile Monoschichten bei hohem Oberflächendruck hervor, die nach einmal erfolgter schneller Kompression auch bei langsamer Kompression wiederholbar war [27]. Die physiologische Relevanz dieser Beobachtung ist unstritten.

Für jedes dieser Modelle lassen sich zahlreiche Argumente und Gegenargumente finden. Da die Modellierung der Vorgänge, die im Oberflächenfilm unter Kompression und Expansion stattfinden, Bestandteil dieser Arbeit ist, werden diese Argumente in den Ergebnisdiskussionen detailliert beschrieben (vgl. Abschn. 3, 4 und 6).

### **Kleine Aggregate**

Neben den großen Lipid-Protein-Aggregaten des Tubulären Myelins und der Lamellar Bodies lassen sich in der Gradientenzentrifugation von Surfactant-Extrakten auch kleine Aggregate nachweisen. Dabei handelt es sich überwiegend um unilamellare Vesikel [56], die gegenüber den übrigen Surfactant-Aggregaten abgereichert in Bezug

auf ihren Proteingehalt sind [175]. Es wird vermutet, dass es sich bei diesen Strukturen um Lipidfraktionen handelt, die aus den übrigen Surfactant-Aggregaten dem Recycling- oder Entsorgungsprozess der Typ II Pneumocyten und der Alveolarmakrophagen zugefügt werden [56].

## 1.7 Ansätze zur Erforschung des Surfactant

Es gibt eine Reihe von Ansätzen, mit deren Hilfe auf die Bedeutung der Surfactant-Komponenten und ihrer Interaktionen geschlossen werden kann. Eine Vorstellung dieser Methoden dient dem Verständnis der im Weiteren angeführten Ergebnisse für die einzelnen Komponenten. Die Methoden lassen sich in *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen unterteilen.

### 1.7.1 *In vivo* Studien

#### Gendefekte, Krankheitsbilder und Knock-Out Modelle

Neben den zuvor beschriebenen (NRDS und ARDS; vgl. Abschn. 1.5) und weiteren Krankheitsbildern führen die Folgen von natürlichen und von in sogenannten Knock-Out Modellen künstlich erzeugten Gendefekten zu Erkenntnissen über die Funktion der Surfactant-Komponenten, insbesondere der Proteine.

#### Phylogenetische Entwicklung des Surfactant

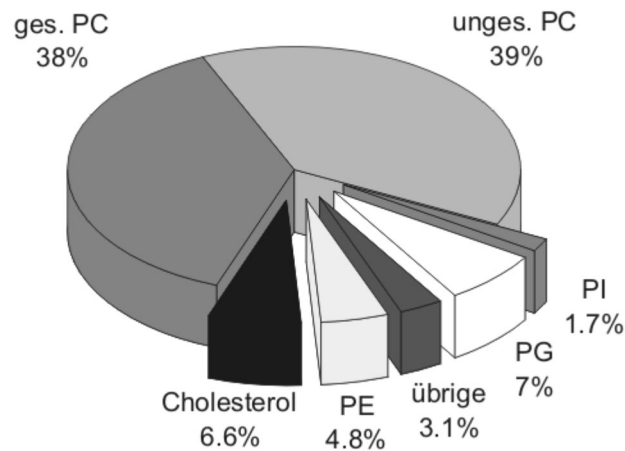
Eine Möglichkeit, den Surfactant zu untersuchen, stellt dessen phylogenetische Betrachtung dar: Das Auftauchen der Surfactant-Proteine in Bezug auf das evolutionäre Alter der Spezies und ein Abgleich mit deren Lungenanatomie gibt interessante Einblicke in mögliche Funktionen dieser Proteine. Ein Vergleich von Lungenanatomie, Körpertemperatur und Lipidzusammensetzung hat Hypothesen insbesondere in Bezug auf die Funktion der Lipide gestärkt.

### 1.7.2 *In vitro* Studien

Bei *in vitro* Studien handelt es sich zumeist um die Modellierung von Kompressions-, Expansions- und Absorptionsvorgängen an die Luft-Wasser-Grenzfläche. Gegenstand dieser Untersuchungen ist häufig die Abhängigkeit des Oberflächendrucks von der Kompression des Lipidfilms sowie die Absorption von Lipidvesikeln in einen Oberflächenfilm. Die Beobachtungen richten sich hierbei insbesondere auf das Phasen- und Mischungsverhalten der Lipide und Proteine sowie die Ausbildung von dreidimensionalen Strukturen, die aus dem Lipidfilm ausgeschlossen werden. Ein Überblick über die verwendeten Methoden ist bei PEREZ-GIL [123] zu finden.

#### Der hydrophobe Extrakt als Modellsystem

Bei den Untersuchungen des hydrophoben Extrakts werden sämtliche hydrophoben Komponenten des Surfactants verwendet und gegebenenfalls auch die hydrophilen Surfactant-Proteine dem Extrakt zugesetzt. Vorteil dieses Modellsystems ist seine vermutliche Nähe zu den realen Abläufen in der Lunge. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt vor allem darin, dass in der komplexen Mischung die Funktion einzelner Komponenten kaum zu identifizieren ist.



**Abbildung 1.8:** Lipidzusammensetzung des Surfactant der Ratte. Die Zusammensetzung des Surfactant ist innerhalb der Gattung der Säugertiere in guter Näherung identisch.

### Lipid-Protein-Modellsysteme

Diesen Nachteil umgeht die Verwendung von Lipid-Protein-Modellsystemen: Wenige ausgewählte Komponenten, denen wesentliche Funktionen zugeschrieben werden, können so selektiv auf ihre Funktionen und Eigenschaften untersucht werden. Nachteil dieses, auch in dieser Arbeit verwendeten, Verfahrens ist die Möglichkeit, funktionell wesentliche Bestandteile des Surfactants möglicherweise nicht zu beachten und somit Fehlinterpretationen der Ergebnisse in Bezug auf ihre physiologische Relevanz zu unterliegen.

## 1.8 Die Surfactant-Lipide

Zur Erfüllung seiner Aufgaben besteht der Surfactant aus etwa 90 % Lipiden und 10 % Proteinen [123]. Zu beachten ist, dass sämtliche quantitativen Ergebnisse zur Surfactant-Zusammensetzung aus lavagierten, also mit isotonischer Salzlösung gespülten Lungen stammen. Kontaminationen durch Zellbestandteile oder aus dem Bronchialbaum können trotz Gradientenzentrifugation nicht ausgeschlossen werden. Gelegentlich werden auch Schwächen einiger Bestimmungsverfahren diskutiert [20].

Abbildung 1.8 gibt einen Überblick über die Zusammensetzung des Lipidanteils des Surfactant. Auffallend in allen Surfactant-Präparationen von unterschiedlichen Säugetieren ist der bis zu 70–80 % hohe Anteil an Phosphatidylcholinen (PC), insbesondere jener PC-Spezies, die zwei gesättigte Fettsäuren aufweisen. Die Hauptkomponente dieser etwa 40–60 % des Gesamt-PC-Gehaltes des Surfactant ausmachenden Lipidspezies ist DPPC. Insgesamt sind somit etwa 32–40 % der Gesamtphospholipide des Säugersurfactant DPPC [170].

DPPC ist eines der wenigen Surfactant-Lipide, die in der Lage sind, einen Oberflächenfilm zu bilden, der bei 37 °C einem maximalen Oberflächendruck standhält (vgl. Abschn. 1.3.5). Seine Aufgabe in der Lunge wird in dieser Funktion gesehen. Generell

ist die DPPC-Konzentration im Surfactant von Spezies mit niedriger Körpertemperatur geringer [38], und auch der strukturelle Aufbau der Lunge scheint Einfluss auf die DPPC-Konzentration zu haben: In den Faveolen der Reptilien, den 100–1000-mal größeren und wegen zusätzlicher Elastin-Verstärkung strukturell stabileren Lungenbläschen der Reptilien, ist die DPPC-Konzentration durchschnittlich etwas niedriger als im Säugersurfactant [37].

Allerdings erfolgt die Absorption von DPPC an die Luft-Wasser-Grenzfläche äußerst langsam, so dass dieser Vorgang in der Lunge katalysiert werden muss (vgl. Abschn. 1.3.5.). Diese Aufgabe kommt insbesondere den hydrophoben Surfactant-Proteinen zu. Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, dass diese Funktion über andere Surfactant-Lipide optimiert wird. Eine Bedeutung der ungesättigten Phosphatidylcholine für diese Aufgabe wird vermutet [146].

In sämtlicher untersuchter Säugerlavage findet sich zudem ein hoher Anteil an negativ geladenen Lipiden wie Phosphatidylglycerolen (PG) und Phosphatidylinositolen (8–15 %) [170]. Diesen negativ geladenen Lipiden wird eine hohe Bedeutung bei der Absorption von Lipiden in den Oberflächenfilm zugerechnet. Mischungen von PG und DPPC ermöglichen höhere Absorptionsraten an die Luft-Wasser-Grenzfläche als reine Phosphatidylcholin-Präparationen [103]. Zudem wird oft von einer spezifischen Interaktion von SP-B und PG ausgegangen, die den Spreitvorgang katalysiert (vgl. Abschn. 1.10).

Andere Phospholipide wie auch Sphingolipide finden sich nur in geringen Mengen („Minor Components“) in der Lavage. Ihr Anteil bleibt, bis auf wenige Ausnahmen wie etwa Phosphatidylethanolamin beim Menschen<sup>5</sup>, in allen Säugerspezies jeweils unter 3 % [170]. Die Bedeutung dieser „Minor Components“ für die Funktion des Surfactant wird in der Regel als gering erachtet. Gelegentlich wird davon ausgegangen, dass es sich lediglich um der Exocytose geschuldete „Kontaminationen“ handelt. Möglicherweise fungieren sie auch als Signalgeber für die Surfactant-Homöostase [170]. Die funktionelle Bedeutung im Oberflächenfilm ist nicht geklärt. Neuere Ergebnisse zeigen, dass die Addition von „Minor Components“ zu Surfactant-Modellsystemen zur Ausbildung von in der Form veränderten dreidimensionalen Lipidaggregaten führt [99]. Inwieweit dies Auswirkungen auf die Ausbildung und den Erhalt des Oberflächenfilms hat, ist unklar. Eine spezifische Funktion dieser Lipidspezies im Oberflächenfilm scheint unwahrscheinlich [170].

Einen weiteren Hauptbestandteil der Surfactant-Lipide bildet das neutrale Cholesterol mit einem Anteil von bis zu 10 % [170]. Cholesterol scheint im Zusammenspiel mit der Regulierung des Anteils an gesättigtem und dem ungesättigtem PC im Surfactant die Fluidität und damit das Absorptionsverhalten des Surfactant zu regulieren: Seine Konzentration wird unter körperlicher Belastung erniedrigt [118], beim Winterschlaf einiger Tierarten erhöht [25, 96, 95]. Zudem scheint das DPPC/Cholesterol-Verhältnis auf die Körpertemperatur unterschiedlicher Spezies angepasst zu sein [38]. Nicht unproblematisch ist ein hoher Anteil von Cholesterol in Lipidmonoschichten: Der maximal erreichbare Oberflächendruck sinkt, was physiologisch einer Qualitätseinbuße des Surfactant gleichkommen müsste. Unter Umständen verhindert die Wechselwirkung von Cholesterol und SP-A den unkontrollierten Einbau von Cholesterol in den Oberflächenfilm [170].

---

<sup>5</sup>In der zitierten Literaturstelle summieren sich die prozentualen Anteile der unterschiedlichen Lipide des menschlichen Surfactant allerdings auf 108,1 %. Diese Angaben müssen demnach zwingend fehlerhaft sein, weshalb in Abb. 1.8 auf die Darstellung der Lipidanteile im Rattensurfactant zurückgegriffen wurde. Möglicherweise beruht demnach die in verschiedenen Literaturstellen zu findende Angabe eines hohen PE-Anteils im humanen Surfactant auf einer fehlerhaften Angabe.



## 1.9 Die Surfactant-Proteine

Es existieren vier Surfactant-spezifische Proteine, die entsprechend des Zeitpunktes ihrer Entdeckung als SP-A, SP-B, SP-C und SP-D bezeichnet werden [129]. SP-A und SP-D sind große hydrophile, SP-B und SP-C kleine hydrophobe Proteine. Nach einer kurzen Erläuterung zu den Surfactant-Proteinen A, C und D wird sich diese Arbeit insbesondere mit dem hydrophoben Protein SP-B beschäftigen.

### 1.9.1 Die hydrophilen Surfactant Proteine

SP-A und SP-D sind hydrophile Proteine, die beide der Proteinfamilie der Collectine zugeordnet werden können. Proteine dieser Familie enthalten einen kollagenartigen N-Terminus und eine C-terminale Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne, mit der Substratbindungen möglich sind.

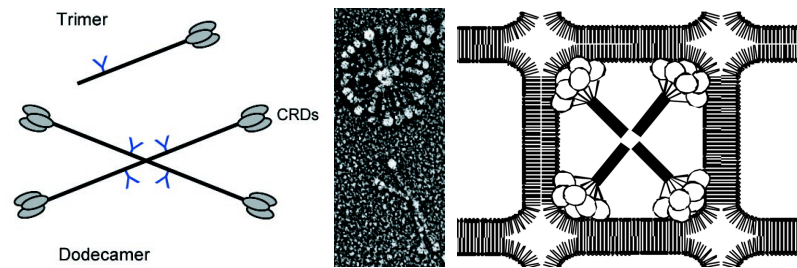
#### Surfactant Protein A

Das mit 26 kDa leichtere hydrophile Surfactant-Protein A wird – im Gegensatz zu SP-D – in der bronchioalveolaren Lavage überwiegend mit Lipiden assoziiert vorgefunden [61]. Es kann in vier Domänen unterteilt werden [121]:

Die komplexe Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne kann mit Lipiden interagieren und besitzt mindestens eine, eventuell aber auch zwei Bindungsstellen für Calcium-Ionen. Die  $\alpha$ -helicale, hydrophobe Halsregion dient dem Übergang zwischen Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne und kollagenartiger Domäne. Die kollagenartige Erkennungsdomäne dient als Abstandhalter zwischen C-terminaler Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne und N-terminalem Proteinsegment. Sie gibt dem Protein seine etwa 20 nm messende Länge. Die 73 Aminosäuren lange repetitive Gly-X-Y-Abfolge weist eine Fehlstelle auf, die zu einer Kinkenbildung innerhalb der linearen Struktur führt [84]. Das N-terminale Segment besteht aus 7–10 Aminosäuren, die drei SP-A Monomere über Disulfidbrücken vernetzt. Sechs solcher Trimere lagern sich zu einem Oktadekamer zusammen, welches aufgrund der Kinken in der Kollagenstruktur eine blumenstrauß-artige Struktur aufweisen (vgl. Abb. 1.9). Der Winkel der Kinken und somit die Öffnung der Blumenstrauß-Struktur ist unter anderem abhängig von der Calciumkonzentration. Ist diese hoch, so führt dies zu einer engeren Bündelung der Erkennungsdomänen als dies bei niedriger Calciumkonzentration der Fall ist. Bei der Sekretion der calciumhaltigen Lamellar Bodies in den Alveolarraum verhält sich SP-A demnach vermutlich analog zu einem welkenden Blumenstrauß [121].

SP-A ist innerhalb des Tierreiches stark konserviert und zeigt Wechselwirkungen mit Viren, Bakterien, Pilzen und inhalierbaren Pollen- und Milben-Allergenen [61]. Diese immunologische Funktion scheint es auch in anderen Geweben wahrzunehmen, wo es ebenfalls nachweisbar ist. Im Alveolarraum konnten Wechselwirkungen des Proteins mit Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden [61]. SP-A-Knock-Out-Mäuse sind lebensfähig [85], zeigen aber eine höhere Anfälligkeit für Krankheitserreger [91, 86]. Dies alles führt zu der Vermutung, dass SP-A der Immunabwehr in den Lungen dienen könnte [61].

Gegen diese Hypothese spricht sein Vorkommen im Tubulären Myelin [122], seine spezifischen Wechselwirkungen mit DPPC und die Katalyse der Lipid-Absorption im Zusammenspiel mit SP-B *in vitro* [125]. Diese Eigenschaften führen zu der Annahme, dass SP-A auch im Kreislauf des Surfactant eine Rolle spielen könnte [125].



**Abbildung 1.9:** Schematische Darstellung des SP-D (links) [30] und des SP-A (rechts) [102] sowie mikroskopische Aufnahme des SP-D (Mitte) [30]. Das SP-A wird in seiner Anordnung innerhalb des Tubulären Myelins dargestellt.

Unabhängig von diesen Funktionen scheint die Anreicherung pulmonalen, embryonalen SP-As im Fruchtwasser der Schwangeren ein wesentlicher Auslöser des Geburtsvorgangs zu sein. Auch bei diesem Vorgang ist die Wechselwirkung von Makrophagen – in diesem Fall jenen der maternalen Plazenta – und SP-A wesentlicher Faktor der Botenstofffunktion [26].

### Surfactant Protein D

SP-D wird im Surfactant unabhängig von den Lipiden vorgefunden [169] und auch unabhängig von ihnen sekretiert [137]. Die Primärstruktur des unter reduzierenden Bedingungen 39 kDa schweren Proteins ist derjenigen des SP-A ähnlich. Allerdings fehlt die Kinke in der insgesamt deutlich längeren Kollagenstruktur, und die SP-D Erkennungsdomäne hat eine andere Spezifität (Glycolipide, Phosphatidylethanolamine) als die des SP-A (DPPC). Vier Trimere des SP-D lagern sich N-terminal zu einem etwa 90 nm langen Dodecamer zusammen, das eine kreuzförmige Struktur aufweist (vgl. Abb. 1.9) [30].

Zahlreiche Studien belegen seine Wechselwirkungen mit alveolaren Fremdstoffen wie Viren, Bakterien und Pilzen, die möglicherweise über die kreuzförmige Proteinstruktur agglomeriert werden. Insofern werden dem SP-D immunologische Funktionen, nicht aber Auswirkungen auf die Ausbildung des Oberflächenfilms oder sonstiger Lipidaggregate zugeschrieben [61]. Da SP-D-Knock-out-Mäuse zwar überlebensfähig sind, aber eine gestörte Surfactant-Homöostase aufweisen, wird zudem eine Rolle innerhalb der Surfactant-Homöostase diskutiert [13].

### 1.9.2 Das hydrophobe Surfactant Protein C

SP-C ist ein ausgesprochen hydrophobes, 35 Aminosäure langes [75], vermutlich  $\alpha$ -helicales Transmembranpeptid [35]. Seine Hydrophobizität wird durch zwei über Thioesterbindungen verknüpfte Palmitinsäurereste verstärkt [77]. SP-C ist ausgesprochen konserviert und nur in Säugerlavage nachweisbar [10]. Säugerlungen unterscheiden sich von den Parabronchien der Vögel oder den Lungen anderer Tierklassen durch die massive Veränderung der Oberfläche unter Einfluss der Atmung bei gleichzeitig erforderlicher Ausbildung einer minimalen Oberflächenspannung [18]. Ein Indiz dafür, dass SP-C eine Rolle bei extremen Atemmanövern spielen könnte, ist der Umstand,

dass SP-C-Knock-Out-Mäuse zwar lebensfähig sind [53], in Langzeitversuchen aber Lungenschädigungen zeigen [54].

*In vivo* konnte gezeigt werden, dass SP-C an den Oberflächenfilm assoziierte, dreidimensionale Lipidagglomerate ausbildet. Es wird vermutet, dass es sich hierbei um terrassenförmig aufgeworfene Lipiddoppelschichten handelt. SP-C verbrückt diese Doppelschichten vermutlich, indem es seine Transmembrandomäne in der einen, seine Palmitinsäureanker in der anderen Lipiddoppel- oder -monoschicht anordnet [171]. Möglicherweise handelt es sich bei den Lipidaggregaten um Vorräte, die bei extremen Atemmanövern in den Oberflächenfilm inseriert oder aus diesem ausgeschlossen werden [125]. Andere Aufgaben des Proteins *in vivo*, wie etwa die Ermöglichung der multiplen Doppelschichten in Lamellar Bodies, sind allerdings nicht auszuschließen und werden ebenfalls diskutiert [169].

SP-C scheint unabhängig von den anderen Surfactant-Proteinen zu arbeiten [174]. Es ordnet sich bevorzugt in flüssig-expandierten Bereichen des Lipidfilms an [172]. Sein N-Terminus zeigt eine Spezifität für PG [125].

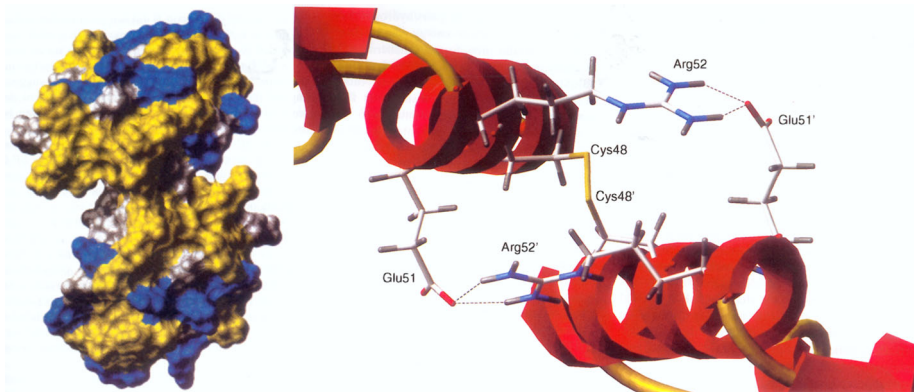
## 1.10 Surfactant Protein B

### 1.10.1 Struktur

SP-B ist ein 79 Aminosäuren langes, 8,2 kDa schweres Protein [34], das in der Regel als Homodimer aus der bronchioalveolaren Lavage gewonnen wird [76]. Das Protein ist extrem stabil gegenüber acider Hydrolyse und proteolytischer Zersetzung [34] und hat einen amphipathischen Charakter: Dem Anteil von 52 % an hydrophoben Aminosäuren [175] steht beim humanen Protein eine auf basischen Aminosäuren beruhende positive Nettoladung von +7 entgegen. Insgesamt weist humanes SP-B unter physiologischen Bedingungen neun positive und zwei negative Ladungen auf. Die Ladungsverteilung in anderen Säugerspezies ist ähnlich [68].

Phylogenetisch hat SP-B eine ausgesprochen konservierte Primärstruktur. Innerhalb der Primärstruktur von acht der bislang neun untersuchten (Säuge-)Tierarten gibt es eine Homologie von etwa 80 % [61]. Die konservierte Primärstruktur findet ihre Widerspiegelung in der Sekundärstruktur: Drei intramolekulare Disulfidbrücken (Cys<sup>8</sup>–Cys<sup>77</sup>; Cys<sup>11</sup>–Cys<sup>71</sup>; Cys<sup>35</sup>–Cys<sup>46</sup>) [76] ermöglichen die Einordnung des Proteins in die Familie der „Saposin like Proteins“ (SAPLIP) [165]. Wie sämtliche anderen Vertreter der SAPLIP weist SP-B mit einem Anteil von 45 % an der Gesamtstruktur einen hohen  $\alpha$ -helicalen Charakter auf [175]. Dieser Anteil ist thermisch sehr stabil und bleibt sogar bei einer Reduzierung der Disulfidbrücken nahezu unverändert [68]. Die Stabilität des Proteins läßt sich auf dessen familiären Ursprung zurückführen: Saposine sind lysosomale Proteine [165], die auch unter den extremen Bedingungen dieser Organelle funktionsfähig bleiben müssen. Die Verwandtschaft zu den Saposinen unterstützt die These, dass die Lamellar Bodies lysosomale Strukturen sind [175].

Bislang ist es nicht gelungen, die Sekundär- und Tertiärstruktur des SP-B kristallographisch zu ermitteln. Die Annahme, dass es in seiner Struktur dem ersten kristallographisch untersuchten Vertreter der SAPLIP-Familie NK-Lysin gleicht [68], wird nicht nur über die Ähnlichkeit des  $\alpha$ -helicalen Anteils, sondern auch von computergestützten Modellierungen des Surfactant-Proteins gestützt (vgl. Abb. 1.10) [184]. NK-Lysin besteht aus fünf  $\alpha$ -Helices [93], die im Falle der vorhergesagten strukturellen Ähnlichkeit beider Proteine beim SP-B amphipathisch sind [184]. Zu beachten ist, dass diese Modellierung nicht *ex initio* erfolgte, sondern eine Ähnlichkeit der



**Abbildung 1.10:** Die Struktur des SP-B. Links: Modellierte Struktur des SP-B Dimers: Hydrophobe Bereiche sind gelb, hydrophile Bereiche blau markiert. Rechts: Die Intermolekulare Disulfidbrücke mit den zwei postulierten Wasserstoffbrückenbindungen [184].

Struktur mit der des NK-Lysin als Grundannahme der Berechnung postuliert wurde. Diese Vorgehensweise ist zwar durchaus legitim und oft verwendet, liefert aber unter Umständen nur ein lokales Maximum und nicht das Optimum des der Modellierung zugrunde liegenden Optimierungsprozesses.

Dafür, dass alle SAPLIP-Vertreter eine vergleichbare Struktur aufweisen, sprechen die inzwischen ebenfalls kristallographisch untersuchten Proteine dieser Proteinfamilie, Saposin B [1] und Granulysin [3]. Diese zeigen eine hohe strukturelle Übereinstimmung mit NK Lysin. Für Saposin B wurde allerdings eine Lipid-Bindungstasche detektiert, die bei den anderen drei hier vorgestellten SAPLIP-Vertretern – also auch beim SP-B – als ausgeschlossen gilt.

Ist die Sekundärstruktur seines Monomers vermutlich durch die SAPLIP-Homologie vorgegeben, so unterscheidet sich SP-B von den anderen Mitgliedern der Proteinfamilie – neben seiner Funktion – durch seine Hydrophobizität, die positive Nettoladung<sup>6</sup> und sein Vorkommen als Homodimer [175]. Letzteres wird durch ein nicht zum SAPLIP-Motiv gehörendes Cystein (Cys<sup>48</sup>) zweier Monomere gebildet und vermutlich über zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen je einem der Glutamin- (Glu<sup>51</sup>) und Argininreste (Arg<sup>52</sup>) beider Untereinheiten stabilisiert [184]. Cys<sup>48</sup>, Arg<sup>52</sup> und Glu<sup>51</sup> sind innerhalb von acht der neun bislang untersuchten SP-B verschiedener Spezies konserviert [184]. Die Bedeutung der Wasserstoffbrückenbindungen scheint nicht nur aufgrund ihrer phylogenetischen Konservierung hoch: Mutiert man das an der Dimerisierung beteiligte Cys<sup>48</sup> in einem Mausmodell zu einem Serin, so sind diese Organismen lebensfähig [7]. Strukturelle Analysen belegen, dass Ser<sup>48</sup>-SP-B nur bei geringer Konzentration als Monomer vorliegt. Bei physiologisch relevanten Konzentrationen kommt es trotz fehlender Disulfidbrücke zu einer überwiegenden Dimerisierung des Moleküls. Diese vermutlich auf die zuvor erwähnten Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführende Anlagerung zeigt wesentlich Eigenschaften des nativen Proteins [183].

<sup>6</sup>Ausnahme: NK-Lysin.

Eine Ausnahme unter allen SP-B Vertretern bildet das bovine SP-B: In diesem Protein sind drei der sieben Cysteine (Cys<sup>46</sup>, Cys<sup>11</sup>, Cys<sup>48</sup>) durch andere Aminosäuren ersetzt [114]. Obwohl das die SP-B Monomere verbrückende Cys<sup>48</sup> durch Glutamin ersetzt ist, erscheint dieses Protein als Trimer in der SDS-PAGE und zeigt an der Luft-Wasser-Grenzfläche ein identisches Verhalten im Vergleich zu den anderen SP-B Vertretern [44]. Da der Austausch der Cysteine insbesondere in der aciden, calciumhaltigen Umgebung der Lamellar Bodies zu einer veränderten Sekundärstruktur führen müsste, werden die Ergebnisse der Sequenzanalyse des bovinen SP-B durchaus kritisch bewertet [61].

### 1.10.2 Expression von SP-B in unterschiedlichen Zelltypen

SP-B wird in der Lunge in Typ II Pneumocyten und Clara-Zellen exprimiert [61]. Clara-Zellen sind Bestandteil der Bronchialschleimhaut im Bereich des terminalen Bronchialbaums ab den Bronchioli (vgl. Abschn. 1.1) [8]. Ein selektives Unterdrücken der SP-B-Expression in den Clara-Zellen hat keine Auswirkungen auf die Lungenfunktion der betroffenen Tiere [94].

Die mRNA des SP-B, nicht aber das intakte Protein wurde zudem im Mittelohr gefunden [14]. Das exprimierte Protein wurde in der Eustachischen Röhre nachgewiesen [120]. Die Eustachische Röhre verbindet das Mittelohr mit dem Rachen (Pharynx), um Druckunterschiede zwischen Atmosphäre und Mittelohr und damit verbundene mögliche Schädigungen des Ohres zu verhindern [8]. In der Eustachischen Röhre findet eine Sekretion oberflächenaktiver Substanzen über Lamellar Body-artige, phospholipidhaltige Granuli aus kubischen – und somit Typ II Pneumocyt ähnlichen – Epithelzellen statt [120]. Es deutet einiges darauf hin, dass die Lipidsekretion in diesen Bereichen eine Adhäsion der Wände der Eustachischen Röhre, die nur bei Schluck- und Gähnvorgängen geöffnet wird, verhindert [120]. Interessant ist, dass das Phospholipid-Sekret der Epithelzellen der Eustachischen Röhre einen hohen Phosphatidylcholin-Anteil besitzt, in ihm aber kein Phosphatidylglycerol nachweisbar ist. Im Gegensatz zum Pulmonalen Surfactant bestehen nur etwa 11 % des Phosphatidylcholin-Anteils aus gesättigten Phosphatidylcholinen. Folgerichtig ist der Surfactant der Eustachischen Röhre nicht in der Lage, stabile Oberflächenfilme oberhalb des Gleichgewichtsspreitdrucks auszubilden. Weitere Komponenten des in der Eustachischen Röhre sekretierten Surfactant sind Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol [120].

Lediglich einmal wurde SP-B als Produkt von intestinalen Zellen nachgewiesen [47]. In den Zellen dieses Gewebes sind ebenfalls Lamellar Body-artige Granuli nachweisbar [41]. Auch in diesem Gewebe kommt es zu einer Sekretion von Lipiden. Zudem besteht dieses Sekret, mit einem Anteil von 58 %, ebenfalls hauptsächlich aus Phosphatidylcholin. Zusammen mit Lyso-PC machen diese beiden Lipide über 90 % des Lipidgehaltes aus. In diesem Surfactant der Mucosa liegt der Anteil der gesättigten Phosphatidylcholone am Gesamtphosphatidylcholingehalt bei etwa 75 % (42 % DPPC; 32 % DSPC) [47]. Die exakte Aufgabe dieses Sekrets ist nicht bekannt. Möglicherweise werden Verdauungsenzyme über diesen Weg in den Extrazellularraum abgegeben [47].

Nach bisherigem Kenntnisstand sind es demnach immer Epithelzellen, aus denen SP-B zusammen mit einem, einen hohen Phosphatidylcholingehalt enthaltenden, Lipidgemisch sekretiert wird. In sämtlichen dieser Gewebe ist auch SP-D und SP-A, nur in der Lunge hingegen ist Tubuläres Myelin nachweisbar [120, 14]. Der Phosphatidylglycerol-Anteil ist nur im Pulmonalen Surfactant hoch, in den übrigen Sekreten ist er vernachlässigbar.

### 1.10.3 Lokalisation des SP-B innerhalb des Surfactant

Das Surfactant Protein B kann in allen intra- und extrazellulären Surfactant-Aggregaten nachgewiesen werden.

#### Intrazelluläre Funktionen

Ohne Zweifel ist die Expression des Surfactant-Proteins B wichtig für die Zusammenstellung, den Transport und die Lagerung des Surfactant in den Typ II Pneumocyten: SP-B gendefiziente Menschen [113] und Knock-Out Mäuse [23] zeigen in ihren Typ II Pneumocyten Veränderungen in Bezug auf Golgi-Apparate, Lamellar Bodies und sekretiertes Material. Die Prozessierung des Proteins aus dem 42 kDa Proprotein und die Bedeutung dieses Vorganges für die Surfactant-Sekretion ist nicht Gegenstand dieser Arbeit und wird hier nicht weiter ausgeführt. Weitere Informationen zu dieser Thematik können den Review-Artikeln von WEAVER et al. und RONEY entnommen werden [176, 137].

#### Extrazelluläre Funktionen

Verschiedene Effekte sprechen dafür, dass die Aufgabe des vollständig entwickelten SP-B vor allem im extrazellulären Raum der Alveole zu suchen sind. Beispielsweise wird das Protein erst unmittelbar vor oder exakt mit der Bildung der Lamellar Bodies zu Ende prozessiert: In dieser Entwicklungsstufe des Surfactant werden die letzten Proprotein-Bestandteile abgespalten, und die Dimerisierung des SP-B erfolgt [175]. Es ist naheliegend, zu vermuten, dass das Proprotein für den intrazellulären Transport der Surfactant-Komponenten, das ausgereifte Protein aber für weitere Aufgaben benötigt wird. Für die Hypothese spricht auch die Halbwertszeit des SP-B, die in Mäusen mit 28 Stunden deutlich über denen der anderen Surfactantkomponenten liegt [72]. Für die Wichtigkeit des SP-B im extrazellulären Raum spricht auch ein Experiment, das von ROBERTSON et al. durchgeführt wurde [136]: Gibt man neugeborenen Kaninchen spezifisch gegen SP-B gerichtete Antikörper (MAb) über die Atemwege in die Lunge, so zeigen diese Lungen Ausfallerscheinungen, die typisch für RDS sind: Eine Minderung der Compliance, akute Entzündungserscheinungen und Verletzungen des Lungengewebes. Die Gabe von unspezifischem Kaninchen-Immunglobulin zeigt dagegen kaum negative Auswirkungen auf den Atmungsprozess.

Nach seiner Exocytose aus den Lamellar Bodies ist SP-B zusammen mit SP-A wesentlich an der Ausbildung von TM beteiligt (vgl. Abschn 1.6.1). Dass die vorrangige Aufgabe des SP-B die Bildung von Tubulärem Myelin ist, scheint ausgeschlossen: SP-A-Knock-Out-Mäuse, in deren Alveolen nur bei zwei von 70 Individuen Tubuläres Myelin nachweisbar ist, sind überlebensfähig. Sie zeigen zudem kaum Abweichungen in Bezug auf Lungen Compliance sowie die Phospholipid- und Surfactant Protein B, C und D Menge [85].

Auch die vorrangige Bedeutung des SP-B für das Recycling oder den Katabolismus des Surfactant zu suchen, ist nicht naheliegend: Das Protein ist in dieser Struktur abgereichert gegenüber den sonstigen Surfactant-Aggregaten [175]. Darüber hinaus erfolgt ein wesentlicher Abbau von radioaktiv-markiertem SP-B über die Alveolar-makrophagen, was gegen eine Rolle des SP-B beim Surfactantrecycling spricht [72].

Vieles spricht dafür, dass eine zentrale Aufgabe des SP-B in der Wechselwirkung dieses Proteins mit den Lipiden an der Luft-Wasser-Grenzfläche zu suchen ist. Diese Lipidwechselwirkungen, die auch in den anderen Surfactant-Aggregaten stattfinden können, werden im Folgenden beschrieben.

### 1.10.4 Wechselwirkungen mit Surfactant-Lipiden

Obwohl der PG-Anteil in den übrigen SP-B enthaltenden Sekreten zu vernachlässigen ist (vgl. Abschnitt 1.10.2), wird die Rolle des SP-B im pulmonalen Surfactant bevorzugt in seiner spezifischen Interaktion mit diesem Lipid gesehen. Daneben zeigt SP-B auch einige unspezifische Wechselwirkungen mit Lipiden.

#### Unspezifische Wechselwirkungen

- **Membranbindung**

SP-B zeigt aufgrund seiner Hydrophobizität ein starkes Bestreben, sich an vorgeformte Vesikel oder Lipidmonoschichten anzulagern [68].

- **Katalyse der Lipid-Absorption**

In *in vitro* Experimenten katalysiert SP-B die Absorption von Lipiden an die Luft-Wasser-Grenzfläche. In Filmwaageexperimenten erwies sich die Zugabe von Calcium als Auslöser für die Absorption von Vesikeln [115, 116, 138]. Das Phänomen der Absorptionskatalyse ist allerdings ein relativ proteinunspezifischer Vorgang: Unterschiedliche hydrophobe Proteine sind ebenfalls in der Lage, eine Fusion von Vesikel und Monoschicht zu induzieren [123]. Im Gegensatz zu anderen Proteinen – wie zum Beispiel auch dem SP-C – scheint das SP-B beim Absorptionsvorgang eine gewisse Selektivität aufzuweisen: So sind SP-B- und DPPC-haltige Vesikel unterschiedlicher Lipidzusammensetzung in der Lage, zu Oberflächenfilmen zu spreiten, die bis zu einer minimalen Oberflächenspannung komprimierbar und somit vermutlich DPPC-angereichert sind [167].

- **Agglomeration und Fusion von Vesikeln**

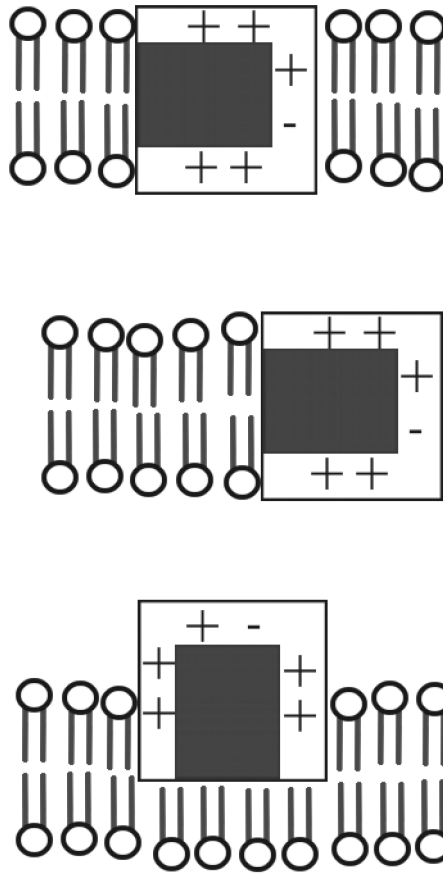
Das Protein ist in der Lage, in Vesikelsuspensionen Vesikel zu agglomerieren und zu fusionieren. Diese Eigenschaft des Proteins wird auf eine Wechselwirkung mit PG aufgrund ionischer Kräfte zurückgeführt [68, 22]. In der Regel wird der Fusionsvorgang zwischen zwei Vesikeln sowie zwischen Vesikel und Oberflächenfilm als analog ablaufend betrachtet [68].

- **Phasenseparation**

In Differential Scanning Calorimetrie (DSC) Experimenten konnte gezeigt werden, dass das SP-B in ternären Lipidmischungen (DPPC/POPG/POPC) eine Phasenseparation bewirkt [44]. Diese kann als Differenzierung des einen Phasenumwandlungsmaximums des reinen Lipidsystems in zwei Phasenumwandlungsmaxima in den proteinhaltigen Präparationen ersehen werden. Vergleichbare Effekte, die fluoreszenzspektrometrisch beobachtet wurden, wurden mit einer Agglomeration des negativ geladenen PGs durch das positiv geladene SP-B erklärt [29].

- **Ausbildung dreidimensionaler Ausstülpungen unter Monoschicht-Kompression**

Komprimiert man einen SP-B enthaltenden Lipid-Oberflächenfilm, so führt dies bei einem Oberflächendruck von etwa 35–40 mN/m zur Ausbildung dreidimensionaler Ausstülpungen (sog. Protrusions) [88]. Vermutlich handelt es sich beim Material dieser Ausstülpungen um Lipid-Protein-Mischungen [68, 88].



**Abbildung 1.11:** Mögliche strukturelle Wechselwirkungen zwischen Lipiden und SP-B (nach [184]). Oben: Transmembranposition des Proteins. Mitte: Interaktion des Proteins mit den Lipidkopfgruppen. Unten: Abschluss einer Lipiddoppelschicht durch das Protein.

### Struktur der Wechselwirkungen mit Lipiden

Abbildung 1.11 zeigt schematisch mögliche strukturelle Wechselwirkungen zwischen Lipiden und SP-B. Diese werden im Folgenden diskutiert.

- **Transmembran-Position**

Dem SP-B fehlt eine ausgesprochene Transmembrandomäne [184]: Zwar entspricht der Abstand der ausgeprägtesten hydrophilen Bereiche des SP-B Modells (vgl. Abb. 1.10) mit 37 nm in guter Näherung der Dicke einer Lipiddoppelschicht, jedoch ist der Abschnitt zwischen diesen hydrophilen Bereichen nicht durchgängig hydrophob, wie dies für ein Transmembranprotein zu erwarten wäre. Eine Transmembranposition des Proteins wird somit selten diskutiert.



- **Interaktion an den Lipid-Kopfgruppen**

H-NMR Untersuchungen an Vesikeln lassen vermuten, dass das Protein im Wesentlichen mit den Lipidkopfgruppen interagiert [104]. Die Wechselwirkungen mit den hydrophoben Fettsäurereste der Lipide sind demgegenüber geringer, auch wenn dem SP-B ein ordnender Effekt auf die Acylgruppen zugeschrieben wird [124]. Die Eindringtiefe in eine Lipidschicht kann je nach Präparation variieren: Bildet man Phospholipidvesikel unmittelbar aus einem lösemittelfreien SP-B/Lipid-Gemisch, so befinden sich die beiden Tryptophane des SP-B-Dimers näher am Zentrum der Doppelschicht als dies nach nachträglicher Zugabe von SP-B enthaltender Methanollösung zu vorgeformten Lipidvesikeldispersionen der Fall ist [33].

- **Abschluss einer Lipiddoppelschicht**

Ein drittes, von Hawgood entwickeltes Modell der Lipid-Protein-Wechselwirkung besagt, dass SP-B den Abschluss einer Lipiddoppelschicht bildet [75]. In dieser Position könnten die Nachteile der fehlenden Transmembrandomäne ausgeglichen werden, da nur partielle Abschnitte des zentralen SP-B-Bereichs mit den hydrophoben Bereichen der Lipide wechselwirken müssten. Die Anordnung des SP-B als Abschluss einer Lipiddoppelschicht wird insbesondere in Zusammenhang mit der Ausbildung von Protrusionen bei Kompression einer SP-B-haltigen Lipidmonoschicht diskutiert [88].

### Spezifische Wechselwirkungen

Zahlreiche Publikationen befassen sich mit einer möglichen spezifischen Interaktion von SP-B mit einer Lipidspezies, die einen selektiven Ein- oder Ausbau von Lipiden aus dem Oberflächenfilm erst ermöglichen würde. In den Mittelpunkt rücken dabei in der Regel die Hauptlipidkomponenten des Surfactant: DPPC und PG. Zumeist wird aus den Ergebnissen – die in die Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit einbezogen werden (vgl. Abschn. 3, 4, 6) – auf eine Interaktion des netto positiv geladenen SP-B mit dem anionischen PG zurückgeschlossen. Es wird also eine Wechselwirkung mit einem Lipid postuliert, das in den anderen Sekreten, in denen SP-B enthalten ist, gar nicht oder allenfalls in geringem Maße vorhanden ist (vgl. Abschn. 1.10.2).

Der Nachweis einer Spezifität des SP-B wäre ein Schlüssel für die Aufklärung wesentlicher molekularer Vorgänge innerhalb des Surfactant-Oberflächenfilms der Alveole.

### 1.10.5 Wechselwirkungen mit Surfactant-Proteinen

#### Wechselwirkungen mit SP-D

Eine der wenigen in der Literatur beschriebenen Wechselwirkungen des SP-B mit SP-D ist die Ausbildung von TM-ähnlichen Strukturen: Mit Hilfe von SP-B, SP-D, DPPC, PI und Calcium kann ein Lipidröhrensystem mit einem quadratischen Grundmuster hergestellt werden. Die Quadratlänge entspricht dabei mit 90 nm der Länge des SP-D [169].

### Wechselwirkungen mit SP-C

Vesikel-Absorptions- und Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Experimente legen nahe, dass SP-B und SP-C nicht direkt miteinander wechselwirken [174, 123].

### Wechselwirkungen mit SP-A

Es werden zwei Effekte der Wechselwirkungen zwischen SP-A und SP-B unterschieden. Auf der einen Seite beschleunigt SP-A die SP-B induzierte Absorption von Lipiden an die Luft-Wasser-Grenzfläche [169], auf der anderen Seite ist das gemeinsame Vorkommen beider Proteine im Tubulären Myelin hervorzuheben [106]. Vermutlich widersprechen sich beide Effekte nicht, da das TM ebenfalls der Absorptionskatalyse zu dienen scheint [56].

Es gelingt mit SP-B, SP-A, DPPC, PG und einer millimolaren Calciumkonzentration, eine künstliche, dem Tubulären Myelin ähnliche Struktur zu bilden [157]. Dem TM vergleichbare Strukturen konnten allerdings auch beim Fehlen von SP-B gebildet werden [122]. *In vivo* wird ein ganz wesentlicher Mechanismus der TM-Ausbildung im Wechsel von hoher Calciumkonzentration im Lamellar Body zu niedriger Calciumkonzentration im Extrazellulärraum vermutet: Die Konformationsänderung des SP-A bei sinkendem Calciumeinfluss (vgl. Abschnitt 1.9.1) führt vermutlich zur Ausbildung der Ecken des TM (vgl. Abb. 1.9) [121]. Dabei wird eine Spezifität des SP-A für DPPC sowie eine Spezifität des SP-B für PG angenommen [125].

## 1.11 Ziele dieser Arbeit

Aus dem zuvor Beschriebenen wird die Wichtigkeit der Ausbildung eines Oberflächenfilms von hohem Oberflächendruck im Rahmen der Lungenfunktion ersichtlich (vgl. Abschn. 1.1 – 1.6). Allgemein akzeptierte Hypothesen sind (vgl. Abschn. 1.8 – 1.10),

- dass ein solcher Film hochgradig DPPC angereichert ist.
- dass SP-B maßgeblich an diesem Anreicherungsprozess beteiligt ist.
- dass SP-B innerhalb des Surfactant spezifisch oder bevorzugt mit PG interagiert.
- dass die Calcium-Konzentration einen Einfluss auf die Funktion des SP-B hat.

Der Überprüfung von Teilaspekten dieser Hypothesen dient diese Arbeit. Dazu werden in Kapitel 3 Untersuchungen am Captive Bubble Surfactometer durchgeführt, die als Indizien für die Komposition des Surfactant-Oberflächenfilms dienen.

Im Anschluss daran werden in Kapitel 4 Filmwaage-, Rasterkraft- und Fluoreszenzmikroskopie-Untersuchungen sowie insbesondere Ergebnisse der Oberflächenmassenspektrometrie vorgestellt, die eine selektive Interaktion des SP-B mit einem Lipid in einem Surfactant-Modellsystem aufzeigen können. In beiden Kapiteln werden Untersuchungen bei unterschiedlichen Calcium-Konzentrationen durchgeführt, um den Einfluss des Calciums auf die untersuchten Parameter aufzuweisen.

In Kapitel 5 werden schließlich Absorptionsexperimente im Captive Bubble Surfactometer vorgestellt, die eine selektive SP-B/Lipid-Wechselwirkung aufzeigen können. Die Ergebnisse dieses Kapitels dienen somit der Validierung der oberflächenmassenspektrometrischen Daten des Kapitels 4.

Zunächst aber wird in Kapitel 2 die Aufreinigung des Proteins aus porcinen Lungen aufgezeigt und seine Reinheit und Funktionsfähigkeit nachgewiesen.

## Kapitel 2

# Aufreinigung, qualitative und quantitative Bestimmung der hydrophoben Surfactant-Proteine

Um die Ziele dieser Arbeit erreichen zu können, war es notwendig, die hydrophoben Surfactant-Proteine in quantitativem Maßstab aufzureinigen. Zu diesem Zweck stehen mehrere Verfahren zur Verfügung. Diese lassen sich sowohl nach verwendetem Extraktions- als auch nach durchgeführtem Chromatographieverfahren unterscheiden. Für die Extraktion stehen die Butanol-Extraktion nach HAAGSMAN et al. [62] und die Extraktion mit Chloroform nach FOLCH et al. (Chloroform/Methanol) [49] bzw. nach BLIGH und DYER (Chloroform/Methanol/Wasser) [11] zur Verfügung. Die hieraus hervorgehenden hydrophoben Extrakte können mittels kombinierter Adsorptions- und Gelfiltrationschromatographie als Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) [36] oder als High Performance Liquid Chromatography (HPLC) [21, 166] aufgereinigt werden.

Da gelegentlich Unterschiede zwischen den Ergebnissen dieser Aufreinigungsverfahren diskutiert werden [181, 160], stellt sich die Frage, welcher Methode der Vorzug zu geben ist. Zu diesem Zweck wurden die beiden – gerätetechnisch verfügbaren – FPLC-Verfahren durchgeführt und das Verhalten der gewonnenen Proteine an der Luft-Wasser-Grenzfläche untersucht. Die Ergebnisse der hier vorgestellten Untersuchungen ermöglichen eine Aussage über die Reinheit und eine Abschätzung bezüglich der Funktionalität der gewonnenen Proteine. Diese Ergebnisse entscheiden somit über die Wahl des Aufreinigungsverfahrens, mit welchem die im weiteren Verlauf dieser Arbeit eingesetzten Proteine gewonnen werden.

Im Folgenden wird die gelfiltrationschromatographische Aufreinigung mittels FPLC sowie die qualitative wie auch die quantitative Bestimmung von SP-B und SP-C sowohl nach HAAGSMAN et al. als auch nach BLIGH und DYER aufgezeigt. Anschließend werden die Isothermen der reinen Proteinfilm für beide Verfahren verglichen. In Übereinstimmung mit TANEVA et al. [160] werden die aus der Chloroform-Extraktion (chl) bzw. aus der Butanol-Extraktion (but) gewonnenen Proteine als SP-B<sub>chl</sub> und SP-B<sub>but</sub> bzw. SP-C<sub>chl</sub> und SP-C<sub>but</sub> bezeichnet.

## 2.1 Aufreinigung

Die Aufreinigung kann in die Arbeitsschritte „Gewinnung der Lavage“, „Extraktion der hydrophoben Bestandteile“ und „Gelfiltrationschromatographische Trennung“ aufgeteilt werden.

### 2.1.1 Gewinnung der Lavage

1. Die Lungen unmittelbar zuvor geschlachteter Hausschweine (*Sus scrofa scrofa*) wurden inklusive eines ca. 3 cm langen Stückes der Trachea entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung, die innerhalb von maximal drei Stunden erfolgte, in 4 °C kalter isotonischer Kochsalzlösung (154 mM NaCl) aufbewahrt.
2. Vor der weiteren Verarbeitung wurden die einzelnen Lungen auf Beschädigungen infolge von Entnahme, Transport oder Gerinnungsprozessen untersucht, von Verunreinigungen im Bereich der Trachea befreit und in einen Lungenflügel intubiert.
3. Über ein angeschlossenes Schlauchsystem wurden sie mit Hilfe einer Vakuumpumpe entlüftet und mit 4 °C kalter isotonischer Kochsalzlösung gefüllt.
4. Mittels sanften manuellen Drucks wurde die Spüllösung für etwa eine Minute in der Lunge durchmischt.
5. Mit Hilfe einer Vakuumpumpe wurde die Spüllösung, die im Weiteren als Lavage bezeichnet wird, in ein Auffanggefäß überführt. Eine intensive rote Färbung der Lavage deutet auf massive Verunreinigungen durch Erythrozyten und somit auf die Beschädigung des Lungenflügels hin. In diesem Fall wurden Lungenflügel und Lavage nicht weiterverarbeitet.
6. Die Schritte 3 bis 5 wurden pro unbeschädigten Lungenflügel zweimal wiederholt. Anschließend erfolgte die Bearbeitung des anderen Lungenflügels ab Schritt 2.
7. Die Lavage wurde in weiteren Schritten aufgearbeitet, die Lungenflügel wurden über den Hausmüll (geringe Menge) oder nach tiefgekühlter Lagerung über den Fleischabfall des Schlachthauses entsorgt.

### 2.1.2 Extraktion der hydrophoben Bestandteile

In diesem Arbeitsschritt weichen die Verfahren nach HAAGSMAN et al. (Butanolextraktion) und nach BLIGH und DYER (Chloroformextraktion) voneinander ab. Die Unterschiede der Verfahren sind im Folgenden gekennzeichnet.

1. Die Lavage wurde bei  $500 \times g$  für 5 Minuten zentrifugiert.
2. Das (rote) Pellet aus Erythrozyten und anderem Zellmaterial wurde verworfen.
3. Die Schritte 1 und 2 wurden einmal wiederholt.
4. Der verbliebene Überstand wurde bei  $17000 \times g$  für 90 Minuten zentrifugiert.
5. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in wenig Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

6. Ab diesem Arbeitsschritt teilt sich der Versuch in die Extraktion nach HAAGSMAN et al. und jene nach BLIGH und DYER<sup>1</sup>.

#### **Butanolextraktion nach HAAGSMAN et al.**

- 7a. Das suspendierte Pellet wurde mittels einer Infektionsspritze/Kantile in die 30-fache Menge Butanol eingespritzt und für mindestens 90 Minuten gerührt.
- 8a. Die Butanollösung wurde bei  $17700 \times g$  für 90 Minuten zentrifugiert<sup>2</sup>. Für diesen Arbeitsschritt wurden Zentrifugengefäße aus Stahl verwendet. Der Überstand wird als „hydrophober Extrakt“ bezeichnet und als solcher weiterverwendet.
- 9a. Der hydrophobe Extrakt wurde am Rotationsverdampfer bei maximal  $40^\circ\text{C}$  vom Lösemittel befreit.

#### **Chloroform-Extraktion nach BLIGH und DYER**

- 7b. In einem Scheidetrichter wurde das Pellet in Chloroform/ Methanol/ Wasser (100/100/60) aufgenommen und mehrfach gut geschüttelt.
- 8b. In diesem Fall wird die Chloroform-Phase als hydrophober Extrakt bezeichnet. Sie wurde abgetrennt und weiterverwendet.
- 9b. Der hydrophobe Extrakt wurde am Rotationsverdampfer bei maximal  $40^\circ\text{C}$  vom Lösungsmittel befreit.

### **2.1.3 Gelfiltrationschromatographische Trennung**

Die Auftrennung der hydrophoben Extrakte in ihre Bestandteile erfolgt mit Hilfe einer kombinierten Größenausschluss- und Affinitätschromatographie. Beginnend mit diesem Arbeitsschritt erfolgt die Aufreinigung für beide Verfahren erneut analog.

1. 38 g Sephadex LH-60 wurden in 300 mL Laufmittel (Chloroform/Methanol/HCl (0,1 N): 1/1/0,05) für 24 Stunden aufgeschwemmt und anschließend in eine SR 25 Chromatographie-Säule<sup>3</sup> gefüllt. Um eine einheitliche Packung des Säulenmaterials zu gewährleisten, wurde eine Flash-Kugel aufgesetzt und die Verbindung zwischen Säule und Flash-Kugel mit PTFE-Band abgedichtet.
2. Nach ca. 24 Stunden hatte sich die feste Phase gesetzt, die Säule wurde mit 200 mL Laufmittel gespült. Die Fließgeschwindigkeit des Laufmittels wurde mit Hilfe des hydrostatischen Druckes auf ca. 2 mL/10 min eingestellt.
3. Der farblose bis gelbe Rückstand der Extraktion der hydrophoben Bestandteile (vgl. Abschnitt 2.1.2) wurde in 4 mL Laufmittel aufgenommen und auf die vorbereitete Säule gegeben<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Ab diesem Arbeitsschritt bis zur Verwendung der Proteine ist jeglicher Kontakt der organischen Proteinlösung mit Kunststoffen (Ausnahme: PTFE) zu vermeiden, um eine Kontamination durch herausgelöste Kunststoffadditive zu verhindern.

<sup>2</sup>Die von HAAGSMAN et al. [62] beschriebenen Zentrifugationsgeschwindigkeit von  $53000 \times g$  war gerätetechnisch nicht erreichbar. Die hier verwendete Geschwindigkeit liegt jedoch über der von TANEVA et al. [160] verwendeten von  $8000 \times g$ .

<sup>3</sup>SR 25: solvent resistant;  $25 \times 800$  mm.

<sup>4</sup>Da keine Probenschleife verfügbar war, wurde zu diesem Zweck der Zuleitungsschlauch der Säule in das Probengefäß gehalten.

4. Die photometrische Detektion des Elutionsprofils erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 280$  nm.
5. Die Fraktionen des zuletzt eluierten Maximums wurden verworfen, da es sich hierbei um Lipide handelt, die nicht Ziel dieser Aufreinigung waren. Die Fraktionen, die einem der anderen Maxima zugeordnet werden konnten, wurden vereinigt. Mischfraktionen wurden verworfen.
6. Die vereinigten Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer vom Laufmittel befreit und in Chloroform/Methanol (50:50 v/v) aufgenommen<sup>5</sup>.

### 2.1.4 Ergebnisse und Diskussion

Die Elutionsprofile beider Aufreinigungsverfahren unterschieden sich kaum. Ein typisches, in diesem Fall aus der Butanol-Extraktion hervorgegangenes Elutionsprofil ist in Abbildung 2.1 zu sehen. Es zeigt fünf Maxima. In einigen Präparationen wurde weder das erste noch das dritte Maximum beobachtet, in anderen zeigten sie eine höhere Intensität. Dieses Elutionsprofil entspricht im Wesentlichen den Literaturangaben, in denen der gleiche Aufbau genutzt wurde [36, 21] oder aber Dichlormethan/Methanol/0,1 M HCl (75:25:5 vol%) als Laufmittel in einer HPLC verwendet wurde [166]. Eine Verwendung des zuletzt genannten Laufmittels ist bei künftigen Aufreinigungen zu bevorzugen, da es eine geringere Cancerogenität aufweist.

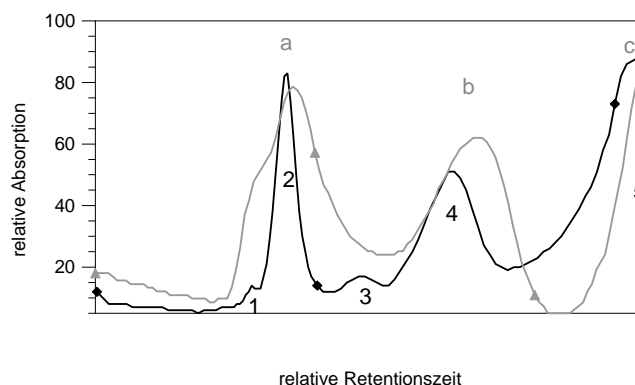
In der genannten Literatur werden jeweils nur drei Maxima unterschieden, die dem SP-B, dem SP-C und der Lipidfraktion zugeordnet werden. Allerdings weist das dem SP-B zugewiesene Maximum in der Regel eine Schulter auf, die für eine Überlagerung zweier Maxima spricht (vgl. Abb. 2.1). Die Vereinigung sämtlicher unter diesem Doppelmaximum zusammenfassenden Fraktionen könnte also gegebenenfalls zwei unterschiedliche Proteine enthalten haben, welche eine ähnliche Masse aufweisen und mit Hilfe der – in der Regel zum Nachweis der hydrophoben Proteine herangezogenen – nicht reduzierenden SDS-PAGE somit nicht zu unterscheiden wären. BÜNGER et al. [21] et al. erklären das mit Hilfe der HPLC-Methode nach Butanol-Extraktion ebenfalls erhaltene erste Maximum als oligomeres SP-B, da dieser nach Reduktion mit Mercaptoethanol nicht mehr zu beobachten sei. Ist, wie im vorliegenden Fall, dimeres SP-B Ziel der Aufreinigung, so ist eine Trennung des Eluats beider Maxima in jedem Fall sinnvoll. Darüber hinaus ist eine Identifizierung beider Proteine wünschenswert.

## 2.2 Qualitative Bestimmung

Als Ergebnis der chromatographischen Auftrennung wurden je Extraktionsverfahren vier Fraktionen aufgefangen. Um eine zweifelsfreie Identifizierung von SP-B und SP-C unter diesen vier Komponenten zu gewährleisten, wurde eine qualitative Bestimmung mit Hilfe der Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), der Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Massenspektrometrie (MALDI-MS), der Electrospray-Ionization-Massenspektrometrie (ESI-MS), und der EDMAN-Sequenzierung vorgenommen.

---

<sup>5</sup>Dieser Schritt ist insbesondere im Fall von SP-C relevant, um eine Hydrolyse der intramolekularen Thioesterbindung zu vermeiden [75].



**Abbildung 2.1:** Elutionsprofile von Butanol-extrahiertem, porcinem hydrophoben Extrakt auf einer Sephadex-LH60 Chromatographiesäule: ▲ FPLC-Elutionsprofil der in dieser Arbeit verwendeten Proteine mit den Elutionsmaxima 1–5; ● HPLC-Elutionsprofil nach VAN EIJK et al. mit den Elutionsmaxima a–c [166].

### 2.2.1 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Reinheit der einzelnen Elutionsfraktionen kann mittels SDS-PAGE nachvollzogen werden. Zudem ist eine Eingrenzung des Größenbereichs der molekularen Massen möglich. Unter reduzierenden Bedingungen sollte zudem das SP-B-Dimer in seine Monomere zerfallen, die Proteinbande also zu kleineren Massen verschoben sein.

Für die SDS-PAGE wird im vorliegenden Fall ein Tricine-System [142] mit einem hochvernetzten, 16%igen Laufgel verwendet. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Silberfärbung. Als Marker wurde ein Polypeptid-Marker der Firma Biorad verwendet.

### 2.2.2 Matrix-unterstützte Ionisation durch Laserdesorptions-Massenspektrometrie, Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie und EDMAN-Sequenzierung

In der Literatur werden sowohl MALDI-MS als auch ESI-MS zur Charakterisierung der hydrophoben Surfactant-Proteine herangezogen. Im vorliegenden Fall wurde die Masse der eluierten Proteine mittels ESI-MS bestimmt. Um vollständige Sicherheit über die Identität der Proteine zu erlangen, wurde eine Charakterisierung der Trypsin-Verdau-Proteinfragmente mittels MALDI-MS sowie eine Sequenzierung mittels EDMAN-Abbau angestrebt. Die ESI-MS wurden von Herrn Dr. Heinrich Luftmann im Organisch-Chemischen Institut der Universität Münster durchgeführt. Die MALDI-Untersuchungen für die Trypsin-Verdau-Fragmente der Proteine wurde von Frau Dr. Simone König im Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung (ZMBE) der Universität Münster durchgeführt. Die EDMAN-Sequenzierung wurde im Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie der Universität Münster in Auftrag gegeben.

### 2.2.3 Ergebnisse und Diskussion

#### SDS-PAGE

Abbildung 2.2 zeigt das Ergebnis der SDS-PAGE bei Auftragung von aus der Butanol-Extraktion hervorgegangenen Proteinen: Die Auftragung einer Probe der unter dem vierten Chromatographiemaximum zusammengefassten Fraktionen führt unter nicht reduzierenden Bedingungen zur Ausbildung einer Bande, die deutlich unterhalb der ersten erkennbaren Markerbande von 14,4 kDa liegt. Die Lage dieser Bande wird durch eine Änderung des Mediums zu reduzierenden Bedingungen nicht verändert.

Im Gegensatz dazu zeigt das unter dem zweiten Chromatographiemaximum gesammelte Protein unter reduzierenden Bedingungen ein anderes Verhalten als unter nicht reduzierenden Bedingungen: Unter nicht reduzierenden Bedingungen bildet sich in der SDS-PAGE eine Bande zwischen den Markerproteinen mit der Masse 14,4 kDa und 21,5 kDa aus. Oberhalb dieser Bande ist zwischen der Höhe der Markerproteine mit den Massen 31,0 kDa und 45 kDa eine weitere, kleinere Bande zu erkennen. Unter reduzierenden Bedingungen ist neben der erstgenannten Bande eine deutlich unterhalb des Markerproteins mit der Masse 14,4 kDa und deutlich oberhalb des aus dem vierten Chromatographiemaximums eluierten Proteins gelegene zweite Bande ersichtlich. Auf eine Auftragung der weiteren eluierten Proteine wurde verzichtet.

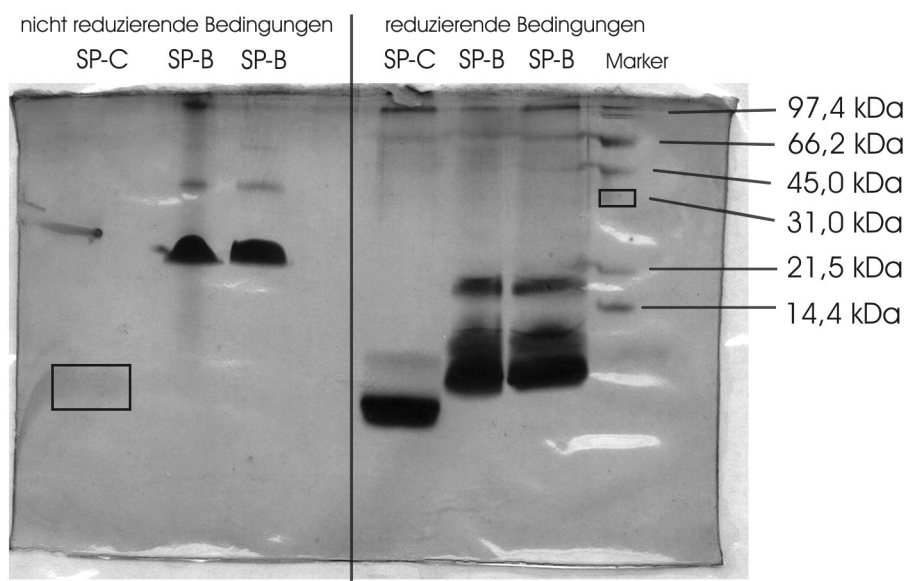
Das gezeigte Ergebnis entspricht dem erwarteten Ergebnis für die in diesen Fraktionen vermuteten Proteine. SP-B hat eine Masse von etwa 17,4 kDa und zeigt Tendenzen zur Selbstagglomeration [61]: Die Bande bei etwa 35 kDa unter nicht reduzierenden Bedingungen kann als Zusammenlagerung von zwei SP-B-Dimeren aufgefasst werden. Unter nicht reduzierenden Bedingungen wird eine Spaltung des Dimers erwartet, die zur Ausbildung des etwa 8,7 kDa schweren Monomers führen sollte. Dieses bildet unterhalb des 14,4 kDa schweren Markerproteins eine Bande aus. Die zweite, unter diesen Bedingungen zu beobachtende Bande ist über eine unvollständige Spaltung der Disulfidbrücken zu erklären.

Im Gegensatz dazu ist im Fall des SP-C unter reduzierenden Bedingungen allenfalls die Abspaltung der Palmitinsäureketten zu erwarten. Das ursprünglich 4,2 kDa schwere Protein reduziert dabei seine Masse lediglich um etwa 0,4 kDa, ein Unterschied, der in der SDS-PAGE nur geringe Auswirkungen hat.

#### ESI-MS

Da ein Dot Blot, der die Proteine zweifelsfrei identifiziert hätte, erfolglos verlief, wurde eine ESI-MS-Analyse durchgeführt (vgl. Tabelle 2.1). Auffallend ist zunächst, dass die Proteine nicht streng nach fallendem Molekulargewicht eluiert werden. Dies wäre für globuläre Proteine in einer reinen Gelfiltrationschromatographie zu erwarten gewesen. Bei der verwendeten festen Chromatographiephase handelt es sich um ein hydroxypropyl-funktionalisiertes Dextran [127]. Insofern liegt eine kombinierte Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie vor, bei der eine Trennung nach aufsteigender Masse nicht notwendigerweise vorliegen muss. Zudem zeigt sich, dass das zunächst eluierte Protein nicht multimeres SP-B sein kann, wie dies aus BÜNGERS et al. HPLC-Beobachtungen geschlossen werden konnte (vgl. Abschnitt 2.1.4): Die erhaltene Masse ist sowohl für ein beliebiges SP-B-Multimer, als auch für ein aus diesem gegebenenfalls hervorgegangenes SP-B-Dimer zu niedrig. Bei dem zuerst eluierten Protein kann es sich um ein hydrophiles Protein handeln, welches im Vergleich zum zweiten eluierten Protein unter Umständen auch eine weniger kompakte Sekundärstruktur aufweisen kann. Ein Protein ähnlicher Masse ( $M = 15002$  Da) wur-





**Abbildung 2.2:** SDS-Gel der Butanol-extrahierten Surfactant Proteine unter reduzierenden (rechts) und nicht reduzierenden Bedingungen (links). Schwach ausgeprägte Banden wurden mit schwarzen Rahmen markiert.

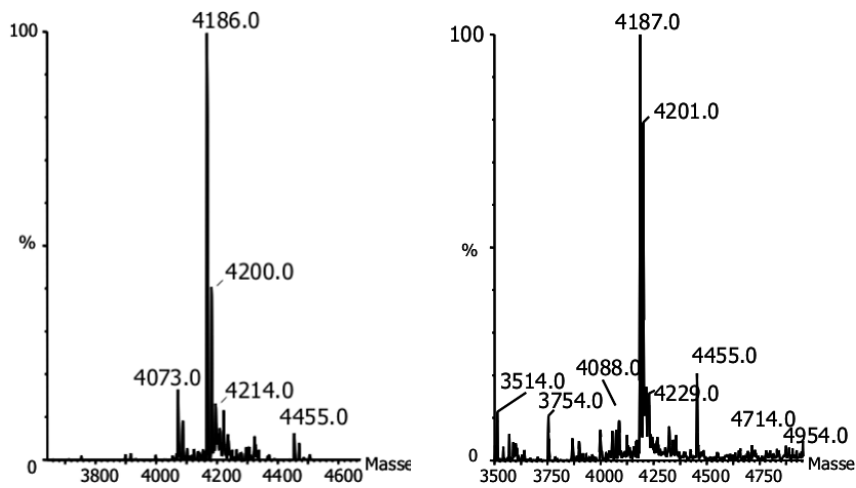
de bereits früher innerhalb der SP-B Fraktion nachgewiesen und als „trunktiertes SP-B“ bezeichnet [160]. Eine Identifikation dieses Proteins erscheint demnach weiterhin interessant, zumal eine Elution eines trunktierten SP-B vor dem nativen SP-B nicht unbedingt zu erwarten wäre.

Die Abbildungen 2.3 und 2.4 zeigen die rekonstruierten ESI-MS-Spektren für die unter den Maxima 2 und 4 eluierten Proteine.

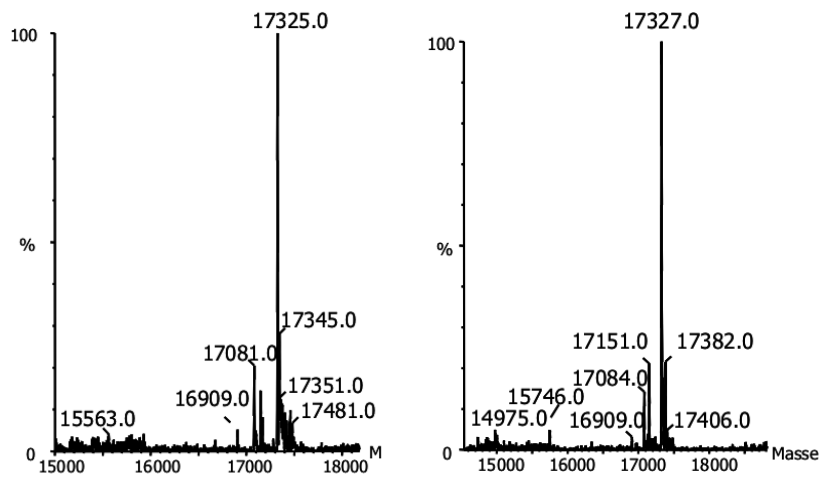
Die beiden gezeigten Spektren des niedermolekularen Proteins (Abb. 2.2) weisen lediglich geringe Abweichungen auf, welche mit dem Kalibrationsfehler des auf niedrige molekulare Massen kalibrierten Gerätes erklärt werden können: Der Hauptmasse bei 4186 Da bzw. 4187 Da ist ein Nebenpeak bei einer jeweils 14 Da höheren Masse zuzuordnen, der im Falle des aus der Chloroform-Extraktion hervorgegangenen Pro-

**Tabelle 2.1:** Aus den ESI-MS-Massenspektren rekonstruierte Masse der Protein-Bestandteile der aufgefangenen Fraktionen. But: Aus der Butanol-Extraktion hervorgegangene Proteine. Chl: Aus der Chloroform/Methanol-Extraktion hervorgegangene Proteine.

Nummer des Elutionsmaximums	M (But)/Da	M (Chl)/Da	Identität des Proteins
1	15030	n.d.	$\alpha$ -Hämoglobin
2	17325	17327	SP-B
3	9238	n.d.	-
4	4186	4187	SP-C



**Abbildung 2.3:** Rekonstruiertes ESI-MS-Massenspektrum der SP-C Aufreinigungen. Links: SP-C<sub>but</sub>; rechts: SP-C<sub>chl</sub>.



**Abbildung 2.4:** Rekonstruiertes ESI-MS-Massenspektrum der SP-B Aufreinigungen. Links: SP-B<sub>but</sub>; rechts: SP-B<sub>chl</sub>.

teins eine höhere relative Intensität aufweist. Des Weiteren ist in beiden Spektren eine Substanz der Masse 4455 Da nachzuweisen. Darüber hinaus zeigt die SP-C<sub>but</sub>-Präparation etwas weniger Verunreinigungen.

Für das hier erwartete SP-C sind in der Literatur sieben unterschiedliche Isoformen beschrieben worden [58]. Diese sind in unterschiedlichem Maße methyliert, oxidiert und palmitoyliert (vgl. Tabelle 2.2). Die drei wesentlichen hier gefundenen Massen entsprechen den Werten für das native, das methylierte und das tripalmitoylierte, oxidierte und methylierte SP-C.

Die Hauptmassen der beiden gezeigten Spektren des höhermolekularen Proteins (vgl. Abb. 2.3) sind mit 17327 Da bzw. 17325 Da im Rahmen der Messgenauigkeit identisch. Für die Hauptmasse des hier erwarteten SP-B sind in der Literatur verschiedene Werte angegeben (vgl. Tabelle 2.3). Es wird ersichtlich, dass die hier ermittelten Werte geringfügig niedriger als die meisten Literaturwerte sind.

Bei den Nebenmassen zeigen sich minimale Abweichungen. Das Phänomen dieser Nebenmassen ist in der Literatur mehrfach beschrieben, ohne dass Erklärungsansätze gegeben werden [107, 42]. Über ihren Ursprung kann nur spekuliert werden: Eine Anlagerung eines der Lösemittel erscheint rechnerisch nicht sinnvoll, ein Aminosäureaustausch wahrscheinlicher.

**Tabelle 2.2:** Molekulare Massen porciner SP-C-Aufreinigungen in der Literatur. Die Modifizierungen sind eine C-terminale Methylierung, eine Oxidation des Methionins, die Abspaltung des N-terminalen Leucins, die Verlängerung des C-terminalen Endes um je ein Histidin und Methionin oder die Veresterung einer dritten Palmitinsäurekette an den Lysinrest an Position 11 [58].

SP-C Isoform	gemessene Masse
nativ, unmodifiziert	4186,7 Da
methyliert	4200,7 Da
verlängert, oxidiert	4487,1 Da
methyliert, oxidiert	4216,7 Da
methyliert, oxidiert, verlängert	4501,1 Da
methyliert, oxidiert, verkürzt	4103,6 Da
tripalmitoyliert, methyliert, oxidiert	4455,2 Da

**Tabelle 2.3:** Molekulare Massen porciner SP-B-Aufreinigungen in der Literatur. Die Tabelle gibt unterschiedliche detektierte Massen für porcines SP-B wieder.

MS-Verfahren	Aufreinigung	Hauptmasse	Literaturzitat
theoretische Masse		17446 Da	[60]
MALDI	met, FPLC	17440 Da	[160]
MALDI	but, FPLC	17590 Da	[160]
ESI	but, FPLC	17398 Da	[106]
MALDI	but, FPLC	17490 Da	[60]
ESI	but, FPLC	17487 Da	[42]
ESI	but, FPLC	17216 Da	[42]

Das unter dem dritten Maximum eluierte Protein wurde nicht weiter untersucht. Rechnerisch ist auszuschließen, dass es sich hierbei um ein SP-C-Dimer oder ein SP-B-Monomer handelt. Vermutlich stellt dieses Protein, das nicht in jeder Präparation nachweisbar war, eine nicht Surfactant-spezifische Verunreinigung dar.

Da die Chloroform-Extraktion erst nach zweifelsfreier Identifizierung der Elutionskomponenten der Butanol-Aufreinigung erfolgte, wurde hier auf eine Massenbestimmung der Nicht-Surfactant-Proteine verzichtet. Für eine weitere Analyse sind demnach die Eluate des ersten, zweiten und vierten Maximums interessant.

### MALDI-MS nach Trypsin-Verdau

Das zunächst eluierte Protein ist  $\alpha$ -Hämoglobin. Seine Fragmente konnten mittels MALDI-MS nach vorhergehendem Trypsinabbau nachgewiesen werden. Die mittels ESI-MS bestimmte molekulare Masse ( $M = 15029$  Da) dieses Proteins zeigt zudem eine gute Übereinstimmung mit der aus der Aminosäuresequenz berechenbaren molekularen Masse des  $\alpha$ -Hämoglobin ( $M=15039$  Da)[19].

Der Trypsinverdau der Proteine mit den Massen  $M = 4186$  Da und  $M = 17325$  Da blieb erfolglos. Ein eindeutiges Ergebnis liefert eine – vergleichsweise aufwendige – EDMAN-Sequenzierung. Auf diese wurde im Falle von SP-C verzichtet: Die Haupt- und Nebenmassen entsprechen exakt den Erwartungen, und in sämtlichen durchgeführten Experimenten zeigte es die spezifischen Eigenschaften des SP-C. Dies wird als hinreichender Nachweis gewertet. Im Fall des SP-B wurde die EDMAN-Sequenzierung aus Kostengründen nur für das Butanol-extrahierte Protein vorgenommen.

### EDMAN-Sequenzierung

Um das Protein mit der molaren Masse  $M = 17325$  Da eindeutig als SP-B zu identifizieren, wurde eine Aminosäurebestimmung der ersten zehn N-terminalen Aminosäuren des Proteins mittels EDMAN-Abbau in Auftrag gegeben. Die N-terminale Aminosäuresequenz des Proteins lautet in Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz für porcines SP-B [34]:

*F P J P L P F X W L*

Hierbei entspricht „X“ einer vorhandenen, aber nicht identifizierbaren Aminosäure. Das Cystein, das im Falle des SP-B hier erwartet wird [34], ist eine der natürlich vorkommenden Aminosäuren, die ohne vorherige Derivatisierung mittels EDMAN-Abbau nicht nachweisbar ist [97].

Die hier gezeigte Übereinstimmung der ersten zehn N-terminalen Aminosäuren weist nicht nur das Protein mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit nach, sondern sie zeigt auch, dass die im Vergleich zu Ergebnissen der Literatur geringfügig niedrigere Masse nicht auf eine Abspaltung der N-terminalen Aminosäuren zurückzuführen ist. Es verbleiben zwei Erklärungsmöglichkeiten: Zum einen könnten Sequenzheterologien zu den in der Literatur beschriebenen Vergleichsproteinen vorliegen, zum anderen könnte eine C-terminale Degradation erfolgt sein, wobei die Abweichungen der bereits in der Literatur beschriebenen Daten (vgl. Tabelle 2.3) den ersten Erklärungsansatz wahrscheinlicher erscheinen lassen. Die im Weiteren gezeigten Ergebnisse (vgl. Abschnitte 2.4, 3, 4) weisen unabhängig von der Ursache der niedrigen Masse eindeutig auf ein funktionales Protein hin. Zudem übertrifft die Qualität des hier gezeigten Nachweises die meisten der in der Literatur zu findenden Angaben, die sich zumeist mit einem Nachweis mittels SDS-PAGE begnügen (vgl. z.B. [117, 22, 32]).

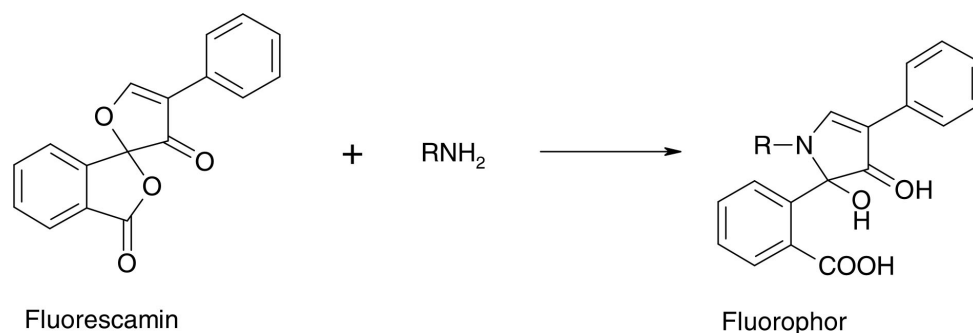
## 2.3 Quantitative Bestimmung

### 2.3.1 Fluorescamin-Test

Die Konzentrationsbestimmung der hydrophoben Surfactant-Proteine SP-B und SP-C erweist sich als schwierig. Aufgrund ihrer geringen Löslichkeit in Wasser scheiden zahlreiche Standardverfahren, wie etwa der LOWRY-Test oder der BRADFORD-Test aus [116]. Es existieren Bestimmungsverfahren, etwa auf ELISA-Basis [119], die sich auch in den Arbeitskreisen, die diese Verfahren entwickelten haben, nicht durchgesetzt haben. Andere Verfahren setzen eine reproduzierbare Flussrate der mobilen Chromatographiephase, wie sie in der HPLC gegeben ist, voraus [166, 21].

Als nachweisstärkstes Verfahren wird für das Problem der Konzentrationsbestimmung der hydrophoben Surfactantproteine die finanziell aufwendige Quantitative-Aminosäure-Analyse (QAAS) angewendet [32]. OSTERLAAKEN-DYKSTERHUIS et al. [116] konnten zeigen, dass der Fluorescamin-Assay nach BÖHLEN et al. [12] gut mit den Ergebnissen der QAAS übereinstimmt.

Der Fluorescamintest beruht auf der Reaktion des Reagenz 4-Phenylspiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'dione (Fluorescamin) mit primären Aminofunktionen bei einem  $\text{pH} \geq 7$  und Raumtemperatur (vgl. Abb 2.5). Das entstehende Fluorophor wird bei einer Anregungswellenlänge von 390 nm angeregt und fluoresziert mit einem Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 475 nm. Die Kalibration erfolgt über eine Albumin-Kalibrationsreihe (Bovines Serum Albumin, BSA).



**Abbildung 2.5:** Reaktion, die dem Fluorescamin-Test zugrunde liegt.

#### Durchführung

1. Proben der aufgereinigten hydrophoben Surfactant-Proteine wurden in Reagenzgläser gegeben, und das Lösemittel wurde im Stickstoffstrom verblasen.
2. Zudem wurde eine BSA-Kalibrationsreihe mit 0 bis 20  $\mu\text{g}$  Protein angesetzt.
3. Sämtliche Proben wurden mit 100  $\mu\text{L}$  10%iger SDS-Lösung versetzt und im Wasserbad für 5 Minuten aufgekocht.

4. Nach Abkühlen wurden sämtliche Proben bis zu einem Gesamtvolumen von 1,6 mL mit Natriumphosphatpuffer (0,05 M; pH 8,9) aufgefüllt.
5. Zu jeder Probe wurden 500  $\mu$ L Fluorescaminlösung (3 g/10 mL; in Aceton) pipettiert.
6. Die Lösungen wurden gevortext und bei einer Anregungswellenlänge von 390 nm und einer Emission von 475 nm im Fluoreszenzspektrometer vermessen.

### 2.3.2 Phosphor-Bestimmung

Da der Fluorescamintest auf einer Reaktion des Fluorophors mit endständigen Aminofunktionen basiert, können größere Verunreinigungen mit Phosphatidylethanolamin die Bestimmung stören. Eine Bestimmung der Phospholipidmenge ist also eine Qualitätskontrolle zum einen in Bezug auf die Reinheit des Proteins, zum anderen in Bezug auf die Validität der Konzentrationsbestimmung des Proteins. Als Standardverfahren der Lipidbestimmung dient der Phosphor-Nachweis mittels Ammoniummolybdat, wie er von ROUSER et al. [139] beschrieben wird. Dieser Nachweis wurde auch für die Bestimmung der Lipidkonzentrationen bei den Captive Bubble Surfactometry Experimenten benutzt (vgl. Kapitel 3). Der Fehler dieses Verfahrens wird auf 5 % geschätzt.

#### Durchführung

1. Die Proben wurden in hitzebeständige Reagenzläser gefüllt, und das Lösemittel wurde im Stickstoffstrom verblasen.
2. Eine Kalibrationsreihe mit 0 bis 300 nmol elementarem Phosphor wurde mit Hilfe einer 1 M Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung erstellt.
3. Zu allen Proben wurden 300 mL konzentrierte Perchlorsäure pipettiert.
4. Die Proben wurden bei 200 °C im Heizblock verascht.
5. Nach dem Abkühlen wurden zu jeder Probe 1 mL Wasser und je 0,25 mL Ammonium(VII)molybdat-Lösung (2,5 %ig) und Ascorbinsäurelösung (10 %ig) zugefügt.
6. Die Proben wurden im Wasserbad für 15 Minuten bei 60 °C inkubiert.
7. Nach dem Abkühlen erfolgte eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 830 nm.

### 2.3.3 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Phosphorbestimmung bestätigen die Qualität der Aufreinigung: Es ergibt sich für das in dieser Arbeit verwendete SP-B ein molares Protein/Lipid-Verhältnis von 0,55 und für das SP-C eines von 5,0. Der Wert für SP-C liegt damit über dem einzigen in der Literatur verfügbaren Vergleichswert für HPLC-aufgereinigtes SP-C von 3,6 bzw. 3,2 [181]. Für SP-B stehen keine Literaturwerte zur Verfügung. Da der Lipidanteil bei dem zunächst eluierten SP-B höher liegt als bei dem unmittelbar vor den Lipiden eluierten SP-C, ist eine im Rahmen der Aufreinigung unvermeidbare

Adhäsion der Lipide an die Proteine, nicht aber eine unzureichende Auftrennung der Bestandteile als wesentliche Ursache für diese Verunreinigung zu vermuten.

Demgegenüber erweist sich der Fluorescamintest als Schwachpunkt der Aufreinigung. Es wurde eine recht hohe Standardabweichung für exakt gleiche Ansätze festgestellt, die gelegentlich geringfügig über das in der Literatur beschriebene Maß von 10 % hinausging [163]. Bei künftigen Präparationen sollte über eine Anwendung der QAAS nachgedacht werden, deren Fehler allerdings ebenfalls mit 10% angegeben wird [97]. Ein Fehler in der Konzentrationsbestimmung der Proteine muss insofern akzeptiert werden.

## 2.4 Isothermen reiner Proteinfilme

Der Vergleich der Isothermen der zuvor isolierten Surfactant-Proteine ermöglicht sowohl den Vergleich der Ergebnisse beider durchgeführter Aufreinigungsmethoden als auch einen weiteren Abgleich mit Literaturdaten. Er bietet mithin ein weiteres Kriterium bei der Wahl der im Weiteren verwendeten Aufreinigungsmethode. Die Messungen erfolgten auf einer Nima Type 601 Bändchenfilmwaage (Nima, Coventry, GB) bei einer Temperatur von 20 °C auf einer Reinstwasser-Subphase. Eine detaillierte Vorstellung der Filmwaagemethode, die hier lediglich als qualitatives Testverfahren verwendet wurde, erfolgt in Kapitel 4.

### 2.4.1 Ergebnisse

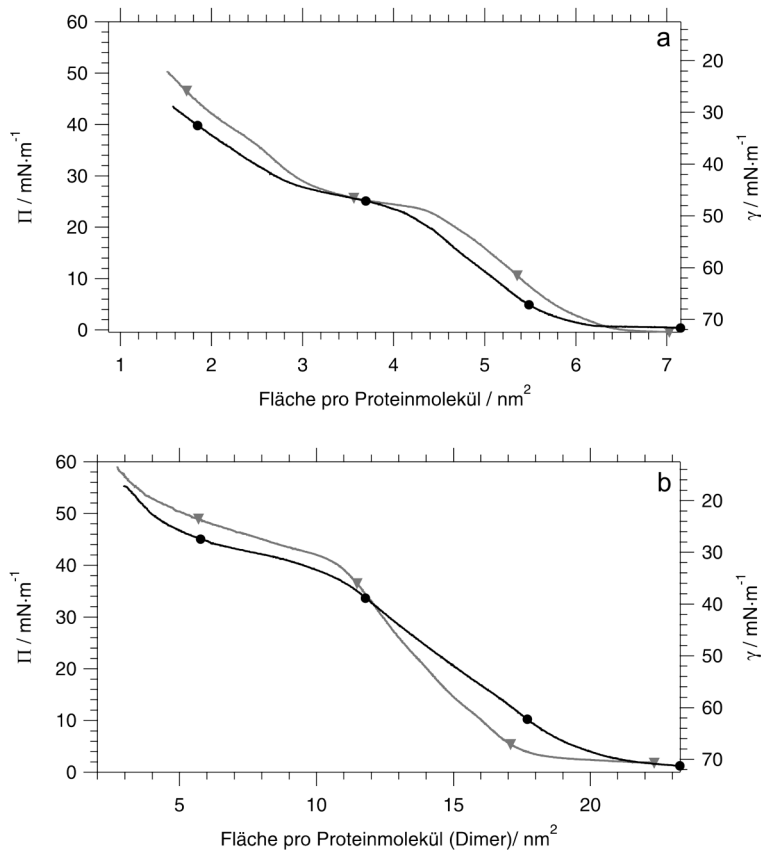
In Abbildung 2.6a sind die Isothermen des reinen SP-C für beide hier vorgestellten Aufreinigungsverfahren dargestellt. Die Isothermen zeigen in Bezug auf ihre Plateauhöhe bei  $\Pi = 25 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  und  $\Pi = 40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  einen identischen Verlauf. Allerdings ist die Isotherme des SP-C<sub>chl</sub> zu geringeren Flächen verschoben und weist ein im Vergleich zum SP-C<sub>chl</sub> weniger ausgeprägtes zweites Plateau auf.

Die SP-B Isothermen (vgl. Abb. 2.6b) weichen im Gegensatz zu den SP-C Isothermen etwas deutlicher voneinander ab. Die Isotherme des SP-B<sub>chl</sub> steigt gegenüber derjenigen des SP-B<sub>but</sub> bereits bei höherer molekularer Fläche an, weist aber eine geringere Steigung auf, so dass sich beide Isothermen schneiden. Zudem weist die SP-B<sub>chl</sub>-Isotherme geringfügig niedrigere Plateauhöhen auf. Bei beiden Isothermen ist ein deutliches Plateau geringfügig oberhalb von  $\Pi = 40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  sowie ein leichtes Plateau bei etwa  $\Pi = 18 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  zu erkennen.

### 2.4.2 Diskussion

Interessant ist ein Vergleich der ermittelten Isothermen mit Literaturdaten. Es existieren zwei Veröffentlichungen, die die Produkte verschiedener Aufreinigungsverfahren miteinander vergleichen: TANEVA et al. [160] untersuchten die Ergebnisse der beiden FPLC-Aufreinigungen, während WÜSTNECK et al. [181] die FPLC-Aufreinigung nach Butanol-Extraktion mit der HPLC-Methodik nach Chloroform-Extraktion verglichen. Obwohl WÜSTNECK et al. in ihrem Vergleich Lavage aus Schafslungen verwendete, erscheint ein Vergleich aufgrund der hohen Homologie der Proteine innerhalb der Klasse der Säugetiere legitim (vgl. Abschnitt 1.7.1).

Die hier gezeigten Isothermen beider Surfactant-Proteine entsprechen in ihren Plateauhöhen sowohl den von TANEVA et al. gezeigten als auch denen, die WÜSTNECK et



**Abbildung 2.6:** Isothermen reiner Protein-Monoschichten. **a** SP-C und **b** SP-B. Die Aufreinigung erfolgte mit der Chloroform-Extraktion ● bzw. der Butanol-Extraktion ▼. ( $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser).

al. als Ergebnis der HPLC-Aufreinigung nach Chloroform-Extraktion erhielten. Abweichungen existieren dagegen im Bereich der molekularen Flächen, bei denen die Isothermen ihren Verlauf nehmen: Gegenüber WÜSTNECKS et al. Publikation sind die hier gezeigten SP-C-Isothermen zu höheren und die gezeigten SP-B-Isothermen zu geringfügig niedrigeren molekularen Flächen verschoben.

Die beiden von TANEVA et al. gezeigten Isothermen weichen in diesem Kriterium untereinander ab: Sowohl die SP-B<sub>but</sub>- als auch die SP-C<sub>but</sub>-Isotherme sind im Vergleich zu den jeweils aus der Chloroform-Extraktion hervorgegangenen zu höheren molekularen Flächen verschoben. Eine solch deutliche Abweichung steht im Widerspruch zu den hier und den von WÜSTNECK et al. gezeigten Daten.

Im Fall des SP-B sind sowohl die hier gezeigten Isothermen als auch die von WÜSTNECK et al. publizierten im Vergleich zu beiden Isothermen TANEVAS et al. zu geringeren molekularen Flächen verschoben. Im Fall des SP-C sind die hier gezeigten Isothermen zu höheren molekularen Flächen verschoben.

Für eine vertikale Abweichung im Verlauf der Isothermen sich ähnelnder Substanzen können zwei Erklärungsmodelle herangezogen werden: Auf der einen Seite kann die



Substanz mit der zu niedrigeren molekularen Flächen verschobenen Isotherme einen geringeren Platzbedarf haben. Im Fall von gleichen Proteinen können diese sich also beispielsweise in ihrer Sekundärstruktur unterscheiden. Auf der anderen Seite kann eine Fehlbestimmung der Konzentration vorliegen. TANEVA et al. wählen in ihrer Publikation das erste Erklärungsmodell und schließen daraus, dass sich die Proteine, die aus unterschiedlichen Aufreinigungen hervorgehen, in ihrer Sekundärstruktur deutlich unterscheiden.

Die Argumentation in TANEVAS et al. Veröffentlichung stützt sich auf Ergebnisse aus drei Untersuchungen: Zum einen weichen die massenspektrometrisch bestimmten molekularen Massen für beide Proteine voneinander ab (MALDI-MS, vgl. Tabelle 2.3). Darüber hinaus zeigen die Proteine die zuvor beschriebene vertikale Verschiebung der Isothermen und schließlich unterscheiden sie sich in der Spreitkinetik proteinhaltiger DPPC-Vesikel. Dabei weisen die Chloroform-extrahierten Proteine, insbesondere das SP-B<sub>chl</sub>, eine niedrigere Adsorptionsrate im Vergleich zu den Butanol-extrahierten auf<sup>6</sup>. Eine Untersuchung der Sekundärstruktur, etwa mittels CD oder FTIR, wurde von TANEVA et al. nicht durchgeführt.

Neben der vertikalen Verschiebung der Isothermen ist auch die geringere Adsorptionsrate mit einer Fehlbestimmung der Proteinkonzentration erklärbar: Nimmt man einen solchen Fehler als einzige Ursache für die Abweichungen an, so ist für eine überbestimmte Proteinlösung sowohl eine Verschiebung der Proteinisotherme zu geringeren molekularen Flächen als auch eine geringere Adsorptionsrate zu erwarten – ein Verhalten, das in TANEVAS et al. Ergebnissen die Chloroform-extrahierten Proteine zeigen.

Zwei Argumente lassen TANEVAS et al. Argumentation einer aufreinigungsabhängigen Sekundärstruktur der Proteine zweifelhaft erscheinen: Zum einen benutzte sie für die Konzentrationsbestimmung den ungenauen Fluorescamintest (vgl. Abschnitt 2.5), zum anderen zeigt ihr SP-B<sub>chl</sub> Massenspektrum einen Nebenpeak bei  $M = 15002$  Da, den sie als „trunktiertes SP-B“ bezeichnet, ohne dieses Protein näher zu charakterisieren. Möglicherweise handelt es sich bei diesem Protein nicht um „trunktiertes SP-B“, welches in keiner anderen Literaturstelle Erwähnung findet, sondern um eine Verunreinigung mit einem anderen Protein, die im Fluorescamintest zu einer Überbestimmung des Proteins geführt hätte. Dass solche Verunreinigungen möglich sind, belegt die in dieser Arbeit gezeigte chromatographische Abtrennung des  $\alpha$ -Hämoglobins ( $M = 15030$  Da).

Dass zumindest das SP-C grundsätzlich in unterschiedlicher Sekundärstruktur vorliegen kann, zeigten WÜSTNECK et al. mit Hilfe von CD- und FTIR-Untersuchungen: Sie weisen dieses Protein nach unterschiedlicher Präparation sowohl in  $\alpha$ -helicalen als auch in  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen nach. WÜSTNECK et al. erklären diese Strukturunterschiede allerdings nicht mit der Art der Aufreinigung, sondern sieht die Umwandlung in die  $\beta$ -Faltblatt-Struktur durch die, die kritische Micellenkonzentration überschreitende, Lipidkonzentration angetrieben. So ist auch zu erklären, dass die in dieser Arbeit gezeigte SP-C-Isotherme nicht der des in gleicher Weise von WÜSTNECK et al. aufgereinigten Proteins entspricht, sondern die Charakteristik des Chloroform-extrahierten und mittels HPLC aufgereinigten Kandidaten aufweist. Dieser weist bei WÜSTNECK et al. eine Mischung aus  $\alpha$ -helicaler und  $\beta$ -Faltblatt-Struktur auf.

Für sämtliche SP-B-Präparationen findet WÜSTNECK einheitlich eine  $\alpha$ -helical dominierte Struktur.

---

<sup>6</sup>Die Kinetik-Ergebnisse weisen eine hohe Standardabweichung in Bezug auf den zeitlichen Verlauf des Oberflächendrucks und dessen Endwert für identische Experimente auf und verdeutlichen damit ein Hauptproblem dieser komplexen Methode.

Als Kernaussagen dieser Diskussion stellen sich demnach folgende Punkte dar:

- Die beiden im Rahmen dieser Arbeit mittels Butanol-Extraktion aufgereinigten hydrophoben Surfactant-Proteine weisen an der Luft-Wasser Grenzfläche ein in hohem Maße gleiches Verhalten wie ihre jeweils aus der Chloroform-Extraktion hervorgegangenen Gegenstücke auf.
- Dieses Verhalten entspricht den Literaturwerten.
- Eine Aussage über die Sekundärstruktur der Proteine ist mit den hier vorgestellten Daten nicht sinnvoll.

Folgt man WÜSTNECKS et al. These, dass die Sekundärstruktur des Proteins von dessen Umgebung abhängt, so ist eine weitere Analyse der Sekundärstruktur nicht angebracht. Auf sie wird in dieser Arbeit verzichtet, zumal die Proteine in den im Weiteren beschriebenen Experimenten das erwartete Verhalten aufzeigen.

## 2.5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit erwiesen sich die beiden untersuchten Aufreinigungsverfahren – sowohl in ihrem Ergebnis als auch in Bezug auf die Schwierigkeit ihrer Handhabung – als nahezu identisch.

Hohe Übereinstimmungen der Aufreinigungsverfahren zeigen sich dabei im Chromatogramm der FPLC (vgl. Abschnitt 2.1.3) sowie in den Ergebnissen der SDS-PAGE (vgl. Abschnitt 2.2.1), der massenspektrometrischen Bestimmung (vgl. Abschnitt 2.2.3) und den Filmwaage-Isothermen der reinen Proteinfilme (vgl. Abschnitt 2.4). Beide Aufreinigungsverfahren zeigen ähnliche Ausbeuten und vergleichbar niedrige Lipidkontaminationen der Proben (vgl. Abschnitt 2.3.2). Die gezeigten Daten erreichen die Qualität der Literaturdaten und übertreffen diese, etwa im Bereich der Lipidkontamination, teilweise deutlich.

Da einem der beiden Verfahren der Vorzug zu geben ist, wurde das Butanol-Extraktions-Verfahren gewählt, das auch im Labor des niederländischen Kooperationspartners angewendet wird. Von diesem stammt auch das zuvor in diesem Arbeitskreis verwendete SP-B [88, 87, 138]. Im Fall des SP-C zeigte dieses Verfahren zudem eine geringere Nebenmasse (vgl. Abschnitt 2.2.3). Sämtliches im weiteren Verlauf dieser Arbeit verwendete Protein entstammt der Butanol-Aufreinigung nach HAAGSMAN et al. [62].

Die zweifelsfreie Identifizierung der in dieser Arbeit verwendeten Proteine gelang im Fall des SP-B mittels EDMAN-Sequenzierung (vgl. Abschnitt 2.2.3). Im Fall des SP-C wird die den Literaturwerten entsprechende Masse (vgl. Abschnitt 2.2.3) sowie die Reproduzierbarkeit vorheriger Ergebnisse als ausreichend für die Identifizierung erachtet.

Optimierungsmöglichkeiten sind aus sicherheitstechnischen Gründen in der Wahl des Laufmittels der chromatographischen Auftrennung (vgl. Abschnitt 2.1.3) und in qualitativer Hinsicht in der Umstellung der quantitativen Proteinbestimmung auf die quantitative Aminosäureanalyse zu suchen (vgl. Abschnitt 2.3.1). Eine Umstellung der Aufreinigung auf HPLC-Basis würde darüber hinaus den Verbrauch an Lösemitteln drastisch reduzieren.

# Kapitel 3

## Stabilität von Surfactant-Modellsystemen bei hohen Oberflächendrücken

### 3.1 Einleitung

In den Alveolen der Lunge ist aus physikalischen Gründen die Ausbildung eines stabilen Lipid- bzw. Lipid-Protein-Oberflächenfilms oberhalb des Gleichgewichtsspreitdruckes erforderlich (vgl. Abschnitt 1.3). Unter welchen Bedingungen aber ist eine solche (Meta-)Stabilität möglich? Dieser Frage widmet sich das vorliegende Kapitel dieser Arbeit.

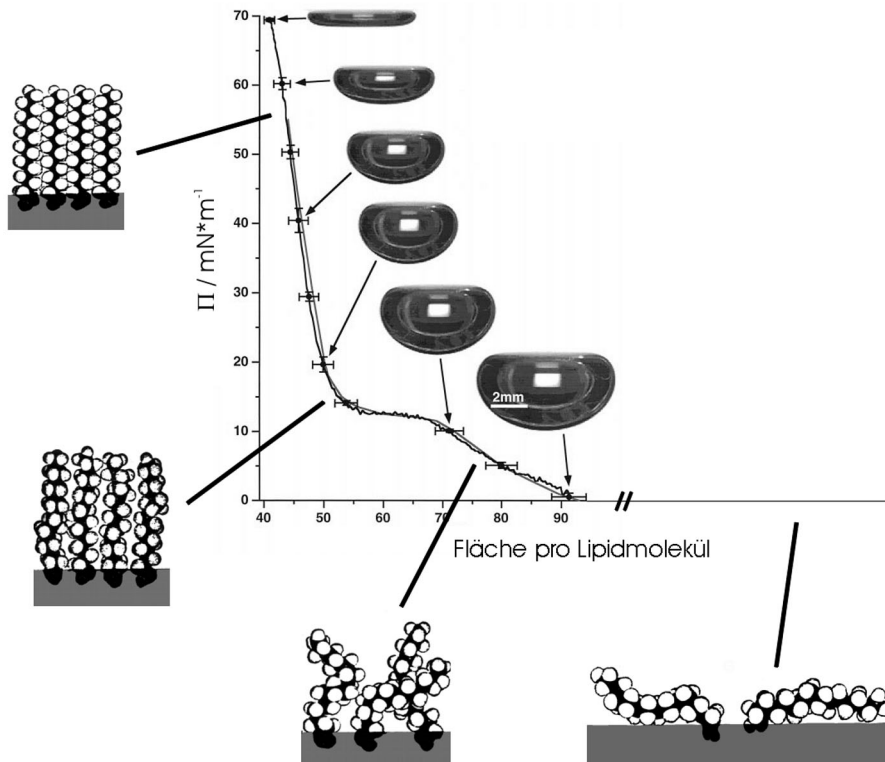
#### 3.1.1 Phasenverhalten von Lipiden an der Luft-Wasser-Grenzfläche

Lipide im zweidimensionalen System eines Oberflächenfilms zeigen unterschiedliche Aggregatzustände. Ähnlich dem dreidimensionalen System anderer Substanzen lassen sich im Phasendiagramm von Lipidmonoschichten Bereiche unterscheiden, in denen der Lipidfilm in gasanaloger ( $g$ ), flüssig analoger ( $l_e$ ) und kondensierter Phase vorliegt, wobei letztere weiter in eine flüssig kondensierte ( $l_c$ ) und eine festanaloge ( $s$ )-Phase unterteilt werden kann. Die jeweiligen Phasen sind durch unterschiedliche Beweglichkeiten und unterschiedliche strukturelle Anordnungen der Acylgruppen der Lipide bzw. der gesamten Lipidmoleküle gekennzeichnet: In der  $s$  Phase etwa beträgt die Neigung der Acylgruppen des Dipalmitoylphosphatidylcholins (DPPC) gegenüber der Oberflächenebene  $58^\circ$  [111]. In dieser Phase liegen die Acylgruppen in (linearer) all-Trans-Konformation vor, während ihnen in den anderen Phasen die Ausbildung von Gauche-Trans-Gauche-Kinken und somit das Vorliegen geringerer Winkel zwischen Acylgruppe und Oberfläche möglich ist [152]. Im zweidimensionalen System des Oberflächenfilms ist die laterale Diffusion von Molekülen in der  $g$ - und  $l_e$ -Phase uneingeschränkt möglich. Diese laterale Diffusion tritt in der  $l_c$ - und vor allem in der  $s$ -Phase lediglich in sehr begrenztem Maße auf [111].

In Filmwaageisothermen von Lipidfilmen ist die Koexistenz von Phasen als horizontaler Kurvenverlauf auszumachen [101]. In Abbildung 3.1 sind die unterschiedli-

chen Phasen in einer DPPC-Isotherme markiert. In Analogie zum dreidimensionalen System erfolgt bei steigender Temperatur der  $l_e/l_c$  Übergang bei höheren Oberflächendrücken, so dass der Bereich des Phasenübergangs in der Isotherme einen immer geringer werdenden Bereich molekularer Fläche pro Lipidmolekül einnimmt. Theoretisch sollte dieser immer geringer ausgeprägte Phasenkoexistenzbereich bei steigender Temperatur in einem Tripelpunkt enden, bei dem festanaloge, flüssiganaloge und gasanaloge Phase innerhalb des Lipidfilms koexistieren. In der Praxis ist dieser Punkt zumindest für das gezeigte DPPC-System nicht erreichbar: Die Extrapolation der Phasenübergangswerte führt zu einem Tripelpunkt bei einer Temperatur von  $57^\circ\text{C}$  und einem Oberflächendruck von  $77\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  [28]. Dieser Wert für den Oberflächendruck liegt oberhalb des maximal auf Wasser erreichbaren Oberflächendrucks (vgl. Abschnitt 1.3).

Das Phasenverhalten eines Lipids wird insbesondere vom Sättigungsgrad und der Länge der Acylreste bestimmt. Lipide mit kürzeren Acylresten zeigen eine niedrigere



**Abbildung 3.1:** Abhängigkeit der Luftblasengeometrie vom Oberflächendruck bei einem DPPC-Film auf wässriger Subphase: Vergleich der aus der Luftblasengeometrie bestimmten Oberflächenspannung (schwarz) mit einer Filmwaageisotherme (grau; Abbildung modifiziert nach CRANE et al. [28]). Darüber hinaus dargestellt ist das Phasenverhalten der Lipide (v.r.n.l.): gasanaloge ( $g$ ), flüssig expandierte ( $l_e$ ), flüssig kondensierte ( $l_c$ ) und feste ( $s$ ) Phase.

Phasenumwandlungstemperatur als längere. Darüber hinaus weisen ungesättigte Lipide eine niedrigere Umwandlungstemperatur als gesättigte Lipide auf [111]. Zudem hat die Zusammensetzung der Subphase – insbesondere deren Salzgehalt – einen Einfluss auf die Phasenumwandlungstemperatur. Vor allem Calcium-Ionen, aber auch andere Ionen bewirken eine Erhöhung der Phasenumwandlungstemperatur bei Lipiden [4].

Werte für die Phasenumwandlungstemperaturen werden zumeist aus kalorimetrischen Messungen gewonnen. Gegenstand dieser Untersuchungen sind Vesikel-Dispersionen, also Lipidbilayer [81]. Bei der Verwendung dieser Daten in Bezug auf Lipidmonoschichten wird zumeist nicht bedacht, dass in Vesikeln vermutlich ein relativ konstanter Oberflächendruck von etwa  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  vorherrscht [111], während dieser – und damit entsprechend der zweidimensionalen CLAUSIUS-CLAPEYRON-Gleichung auch die Phasenumwandlungstemperatur – in Monoschichtexperimenten zumeist variiert wird. So wird in der Surfactant-Literatur häufig angeführt, dass reines DPPC eine Phasenumwandlungstemperatur von  $42^\circ\text{C}$  aufweise. Dieser Wert ist für Vesikel-Bilayer richtig, für den physiologisch vorherrschenden Oberflächendruck des Surfactantfilm aber deutlich unterbestimmt [28].

### 3.1.2 Stabilität von Lipidoberflächenfilmen

In Abschnitt 1.3.5 wurde bereits auf die Wichtigkeit der Lipidgeometrie für die Ausbildung stabiler, hochkomprimierter Monoschichten hingewiesen. Es wurde darauf aufmerksam gemacht, dass im pulmonalen Surfactant lediglich Phosphatidylcholine die hierfür erforderliche zylindrische Geometrie aufweisen.

Die Stabilität einer hochkomprimierten, reinen Lipidmonoschicht aus Phosphatidylcholinen wird maßgeblich von deren Phasenverhalten beeinflusst: Liegt der Oberflächenfilm im festanalogen Zustand vor, so hält er hohen Oberflächendrücken stand, wird er im flüssiganalogen Zustand über den Gleichgewichtsspreitdruck komprimiert, kollabiert er [57]. Die Tatsache, dass nur DPPC oder länger-kettige, gesättigte PC-Moleküle in Vesikeln eine Phasenumwandlungstemperatur zeigen, die die Körpertemperatur von  $37^\circ\text{C}$  übersteigt [81], führte zu der Annahme, dass es im Oberflächenfilm des Surfactant zu einer Anreicherung dieses Lipids kommen muss [56]. Diese Annahme wurde in Zweifel gezogen, als es gelang, sowohl einen Oberflächenfilm des kompletten hydrophoben Surfactant-Extrakts als auch eine reine Dimyristoyl-phosphatidylcholin-Monoschicht bei  $37^\circ\text{C}$  weit über den Gleichgewichtsdruck zu komprimieren [27]. Hierzu war zunächst eine rasche erste Kompression notwendig, nach der der Oberflächenfilm nach zwischenzeitlicher Expansion auch bei langsamerer zweiter Kompression stabil blieb.

Eine physiologische Relevanz dieser Ergebnisse würde bedeuten, dass in der Lunge nicht notwendigerweise ein DPPC-Anreicherungsprozess stattfinden müsste (vgl. Abschnitt 1.6.1). Die Ergebnisse der extrem schnellen Kompression eines Oberflächenfilms widersprechen somit den Ergebnissen der extrem langsamen Kompression, die einen solchen Anreicherungsprozess notwendig erscheinen lassen.

### 3.1.3 Ziel der Untersuchungen

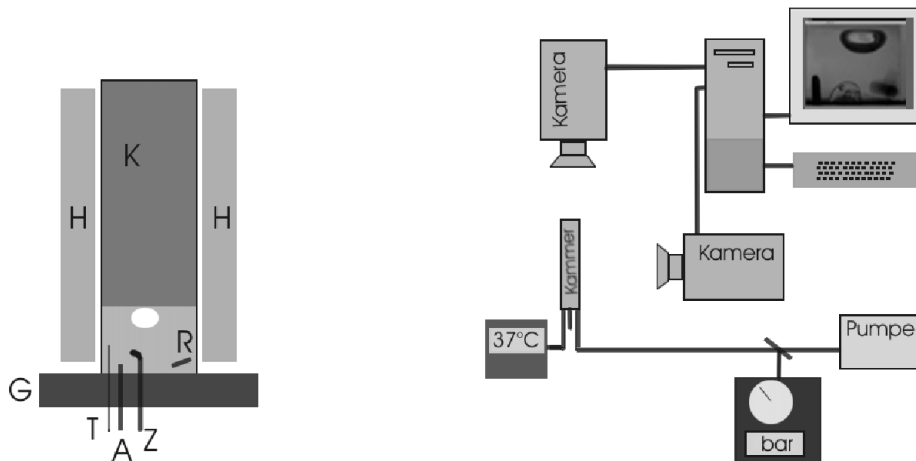
Ziel der in diesem Kapitel vorgestellten Untersuchungen war insbesondere das Verhalten von Lipiden und Lipid-Proteinmischungen bei hohen Oberflächendrücken, wie sie an der Filmwaage nur schwer erreicht werden können. Dabei interessierte, unter welchen Bedingungen unterschiedliche Phosphatidylcholine und -glycerole in der Lage

sind, oberhalb des Gleichgewichtsspreitdrucks einen stabilen Oberflächenfilm auszubilden. Mit dem gleichen Ziel wurden auch binäre PC/PG- und ternäre PC/PG/SP-B-Oberflächenfilme komprimiert. Methode der Wahl ist dabei die Captive Bubble Surfactometry.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Captive Bubble Surfactometrie (CBS)

Das Phasenverhalten von Lipiden an der Luft-Wasser-Grenzfläche kann mit unterschiedlichen Techniken untersucht werden: Im Bereich der Surfactant-Forschung konnte sich neben der „klassischen“ Filmwaagetechnik (vgl. Abschnitt 4.1.1) das Pulsating Bubble Surfactometer (PBS) [48] lediglich in begrenztem Maßstab durchsetzen. Beim PBS ist eine Luftblase an eine Röhre gekoppelt, in deren Innerem eine Pneulstange mit hoher Frequenz das Innenvolumen ändern kann. Die Volumenänderungen innerhalb der Röhre führen zu einer zyklischen Expansion und Kompression der Luftblase. Veränderungen der Oberflächenspannung während dieses Prozesses können über eine Veränderung der Luftblasenform beobachtet und errechnet werden. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, an einer geschlossenen Luftblase arbeiten zu können. Typische Messartefakte der Filmwaagetechnik, insbesondere das Übertreten des Oberflächenfilms über die seitlichen Barrieren der Filmwaage, können dadurch vermieden werden. Diesem Vorteil des PBS steht der Nachteil gegenüber, dass es im PBS zu einem Verlust an Oberflächenmaterial kommen kann [134]. Dieser Verlust wird durch die Kopplung



**Abbildung 3.2:** Schematischer Aufbau eines Captive Bubble Surfactometers: Die Probenkammer (Links) besteht aus einer auf eine Gummidichtung gepressten Küvette. Diese wird über Heizelemente temperiert und ist mit einem Temperatursensor, einem Rührer sowie einer Zu- und einer Ableitung, über die auch der hydrostatische Druck des Systems eingestellt wird, versehen. Diese Kammer wird in das CBS-Gerät eingehängt (rechts), in dem die Temperatur und der Druck eingestellt werden können. Die Spülung des Subphasenpuffers wird über eine Pumpe vorgenommen. Die Beobachtung der Luftblase ist über zwei Kameras gewährleistet.

der Luftblase an den Mechanismus zu deren Volumenänderung ermöglicht: Material des Oberflächenfilms der Luftblase kann in den Innenraum der mit ihm verbundenen Röhre verlorengehen.

Ein relativ neues Verfahren stellt demgegenüber die Captive Bubble Surfactometry (CBS) dar. Von SCHÜRCH et al. 1989 vorgestellt [145, 146], bietet sie den Vorteil des PBS – die zyklische Änderung der Oberfläche einer Luftblase – ohne den Nachteil des Materialverlusts in Kauf nehmen zu müssen. Grundlage des CBS ist eine Luftblase, die in einer Puffer-gefüllten Küvette festgehalten wird. Oberflächenaktive Substanzen können aus der Subphase an die Oberfläche der Luftblase adsorbieren oder werden direkt auf sie gespreitet (vgl. Abb. 3.2). Die Größe der Luftblasenoberfläche kann dynamisch verändert werden, indem der hydrostatische Druck, der auf dem System lastet, geändert wird. Durch die Entkopplung des Druckänderungsmechanismus von der freischwimmenden Luftblase wird ein Materialverlust, wie er im PBS auftritt, vermieden [134]. Isothermen moderner CBS-Geräte erreichen inzwischen eine der Filmwaage-technik vergleichbare Präzision und Reliabilität (vgl. Abb. 3.1).

Der Vorteil des CBS gegenüber der Filmwaage liegt darin, dass die Änderung der Oberflächengröße sowohl dynamisch [28] als auch quasistatisch vorgenommen werden kann [27]. Ein weiterer Vorteil liegt in der niedrigen Materialmenge, die für eine Messung benötigt wird. Zudem sind CBS-Messungen bei hohem Oberflächendruck leichter zu handhaben als entsprechende Messungen auf der Filmwaage.

Der Nachteil der relativ neuen CBS-Methodik liegt derzeit vor allem darin, dass sowohl präparative Techniken als auch Messmethoden, die über eine Bestimmung des Oberflächendrucks, der Temperatur und der Oberfläche hinausgehen, derzeit nicht möglich sind. Mit der Filmwaage gekoppelte Techniken wie etwa dem Langmuir-Blodgett-Transfer oder der Infrarot Reflexions Adsorptionen Spektroskopie (Infrared Reflection Adsorption Spectroscopy, IRRAS) fehlt somit ein CBS-Pendant.

In jüngerer Zeit sind auf diesem Gebiet allerdings Weiterentwicklungen zu verzeichnen gewesen: KNEBEL et al. gelang es, an immobilisierten Luftblasen sowohl Rasterkraftmikroskopie (SFM) als auch Fluoreszenzlichtmikroskopie vorzunehmen [83, 82]. Ein mögliches präparatives Verfahren für die CBS wird zudem in Abschnitt 7.1 diskutiert.

Die im Folgenden beschriebene Spreittechnik und das verwendete CBS wurden von PÜTZ et al. entwickelt und evaluiert [135, 133]. Die Vorgehensweise kann in vier Schritte unterteilt werden:

- Agarose Extraktion
- Vorbereitung der CBS-Messungen
- CBS-Messungen
- Berechnung der Oberflächenspannung

#### **Agarose-Extraktion**

Ziel der Agarose-Extraktion ist es, die Agarose von möglichen oberflächenaktiven Kontaminanten zu befreien.

1. 1 g Agarose, 1.6 mL Wasser, 4 mL Chloroform and 2 mL Methanol wurden intensiv gevortexed und anschließend für 5 min bei 700 g zentrifugiert.
2. Der Überstand wurde dekantiert.

3. Die verbliebene Agarose wurde in 4 mL Chloroform und 2 mL Methanol re-suspendiert. Diese Dispersion wurde gevortexed und bei 700 g für 5 Minuten zentrifugiert.
4. Der Überstand wurde dekantiert.
5. Die Schritte 3. und 4. wurden einmal wiederholt.
6. Die verbliebene Agarose wurde im Stickstoffstrom getrocknet und für maximal zwei Monate bei Raumtemperatur gelagert.

### Vorbereitung der CBS-Messungen

1. Spatel, Gummidichtung, Küvette und Metallstempel wurden zunächst mit Detergenz und dann mit Wasser gereinigt.
2. Mit einer Kanüle wurden zwei Löcher in die Gummidichtung gestochen, durch die zwei Schläuche (Länge: 5 cm und 80 cm) geführt wurden.
3. Der längere dieser Schläuche wurde nach Erhitzen an der der Probenkammer des CBS zugewandten Seite gebogen<sup>1</sup>.
4. Ein Temperatur-Sensor wurde durch die Gummidichtung gestochen.
5. Agarose (10 mg/mL, in Wasser) wurde in einer Mikrowelle aufgekocht und in die Küvette gefüllt.
6. Um die Probenkammer zu formen, wurde der Metallstempel auf die Küvette aufgesetzt.
7. Die Küvette wurde im Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt.
8. Die Gummidichtung wurde dünn mit Agarose beschichtet, um das Austreten oberflächenaktiver Substanzen in die Probenkammer zu verhindern.
9. Nach ihrer Gelierung wurde die überschüssige Agarose mit einem Spatel aus der Probenkammer entfernt.
10. Die Probenkammer wurde mit Puffer ausgespült und befüllt.
11. Die Heizvorrichtung, die Küvette und die Gummidichtung wurden zusammengefügt und verschraubt. Die Schläuche wurden mit Arterienklemmen verschlossen.
12. Der montierte Aufbau wurde in das CBS-Gerät eingehängt.

---

<sup>1</sup>Dies verhindert, dass während der Spülvorgänge die Flüssigkeit direkt gegen die Luftblasenoberfläche strömt.



### CBS-Messungen

1. Eine Luftblase mit definierter Oberfläche ( $0.5 \text{ cm}^2$ ) wurde durch Luftinjektion ( $28,5 \mu\text{l}$ ) in eine Puffer-gefüllte gasdichte Küvette bei Atmosphärendruck gebildet.
  - calciumfreier Puffer: 140 mM NaCl, 10 mM Hepes, 0,5 mM EDTA, pH 6,9;
  - calciumhaltiger Puffer: 140 mM NaCl, 10 mM Hepes, 0,5 mM EDTA, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 6,9;
2. Nach zentraler Positionierung der Luftblase wurde diese dynamisch komprimiert (ca. 54% Oberflächenreduktion) und die Oberflächenspannung gemessen. Nur Luftblasen mit einer Oberflächenspannung von mehr als  $\gamma = 68 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  wurden weiterverwendet.
3. Falls nötig wurde das System auf  $37^\circ\text{C}$  bzw.  $2^\circ\text{C}$  temperiert.
4. Auf die Oberfläche der Luftblase wurde ein Oberflächenfilm aus  $0,25 \text{ nmol}$  Lipiden in einem Volumen von  $0,05 \mu\text{l}$  Chloroform/Methanol 1:1 (v/v) mit einer stumpfendigen Mikroliter-Spritze gespreitet.
5. Insgesamt wurde die Subphase für 60 Minuten gerührt:
  - (a) Nachdem sie 30 Minuten gerührt wurde, wurde die Subphase innerhalb von 20 Minuten mit dem 10 fachen Subphasenvolumen gespült, um alle organischen Lösemittel zu entfernen.
  - (b) Zur Gleichgewichtseinstellung wurde das System anschließend für weitere 10 Minuten gerührt.
6. Das Volumen und die Oberfläche der Luftblase wurden zyklisch variiert. Dies erfolgte durch eine Änderung des Luftdrucks im Schlauchsystem des CBS zwischen 0,5 bar und 2,8 bar. Ein solcher Druckwechsel wurde 5-mal innerhalb von einer Minute vorgenommen (Cycling). Nach einer Pause von 5 Minuten erfolgte ein weiteres Cycling. Die Änderungen der Luftblasenform wurden dabei auf Video aufgezeichnet.

### Berechnung der Oberflächenspannung

Die Berechnung des Oberflächendrucks erfolgte nach der Methode von SCHOEL et al. [144]. Für dieses Standardverfahren der Captive Bubble Surfactometrie werden die Höhe (h) und der Durchmesser (d) der Luftblase digital ermittelt und aus diesen Daten das Volumen, die Fläche und die Oberflächenspannung der Luftblase berechnet. Die Oberflächenspannung wurde nach Gleichung 1.8 und den in Abschnitt 1.3 angegebenen Werten in den Oberflächendruck umgerechnet.

Voraussetzung für die Validität des SCHOELSchen Verfahrens ist die Achsensymmetrie der Luftblase, die während der Messung über die beiden Kameras des CBS kontrolliert wurde. Wie bereits von mehreren Autoren beschrieben, arbeitet das Verfahren mit extrem niedriger Standardabweichung bei niedrigem h/d Verhältnis und relativ hohen Standardabweichungen, wenn das h/d Verhältnis gegen 1 strebt [28, 144]. Somit liefert die Messmethodik präzisere Ergebnisse bei hohem Oberflächendruck.

Der Oberflächendruck wurde bei maximalem ( $\Pi_{\text{max}}$ ) und minimalem ( $\Pi_{\text{min}}$ ) Luftblasenvolumen gemessen ( $\Pi_{\text{min/max}}$ -Messungen). Als  $\Pi_{\text{min}}$  wurde der initial erreichbare Oberflächendruck gemessen. Ein nachträglicher Kollaps des Oberflächenfilms zum

Gleichgewichtsspreitdruck findet somit keinen Eingang in die Diagramme, wird aber im beschreibenden Text erwähnt.

Auf die Aufnahme von Druck-Fläche-Diagrammen wurde in dieser Arbeit verzichtet, da bei der verwendeten hohen Kompressionsgeschwindigkeit die Aufnahme-geschwindigkeit der Kamera zu unscharfen und wenig präzisen Ergebnissen führte.

### 3.3 Einkomponenten-Lipidsysteme

Unterschiedliche PC-Derivate bei verschiedenen Temperaturen wurden komprimiert, um zu überprüfen, unter welchen Bedingungen PC-Oberflächenfilme in der Lage sind, stabile Monoschichten aufzubauen (vgl. Tabelle 3.1). Das CBS-System der bei 2 °C gebildeten Oberflächenfilme wurde zudem mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 °C pro Minute erhitzt. Dieser Prozess war durch das Heizsystem des CBS-Gerätes auf Werte bis etwa 40 °C beschränkt.

**Tabelle 3.1:** Stabilität reiner Lipidmonoschichten unter isothermer Kompression bei 37 °C und bei 2 °C, bzw. bei isobarer Temperaturerhöhung bei  $\Pi = 68 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . +: (meta-) stabiler Oberflächenfilm bei maximalem Oberflächendruck; -: instabiler Oberflächenfilm bei maximalem Oberflächendruck. Angegeben ist die Temperatur des Oberflächenfilmkollapses.

Lipid	Stabilität bei 37 °C	Stabilität bei 2 °C	Temperatur des Kollapses
POPC	-	+	$6 \pm 1 \text{ °C}$
SOPC	n.d.	+	$18 \pm 1 \text{ °C}$
DMPC	n.d.	+	$39 \pm 2 \text{ °C}$
DPPC	+	+	$> 40 \text{ °C}$

Sämtliche untersuchten Lipidfilme sind bei 2 °C in der Lage, einem Oberflächendruck von  $\Pi > 69 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  standzuhalten. Bei isobarer Aufheizung dieser Systeme kollabieren die ungesättigten Lipidfilme eher als gesättigte. Bei gleichem Sättigungsgrad kollabieren die kurzkettigen Lipidfilme bei niedrigeren Temperaturen als die langkettigen.

Tabelle 3.3 zeigt entsprechende Ergebnisse für zwei verschiedene Phosphatidylglycerole bei 37 °C und bei 20 °C.

**Tabelle 3.2:** Isotherme Kompression von reinen DPPG- und POPG-Oberflächenfilmen bei verschiedenen Temperaturen. Die angegebenen Werte zeigen den maximal erreichbaren Oberflächendruck bei den untersuchten Bedingungen.

Lipid	Kompression bei 37 °C	Kompression bei 20 °C
POPG	$49,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$	$52,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$
DPPG	$49,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$	$58,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$

Nur bei 20 °C ist der DPPG-Oberflächenfilm über den Gleichgewichtsspreitdruck komprimierbar. POPG bei 20 °C und beide Systeme bei 37 °C sind hingegen lediglich in der Lage, den Gleichgewichtsspreitdruck zu erreichen.

## Diskussion

Die gezeigten Ergebnisse unterstützen die bislang zumeist vorherrschende Ansicht, dass PC-Monoschichten unterhalb ihrer Umwandlungstemperatur nicht in der Lage sind, stabile Monoschichten oberhalb des Gleichgewichtsspreitdruckes auszubilden. Allerdings konnte die Kompressionsgeschwindigkeit, die CRANE et al. in seinen Experimenten mit DMPC und dem hydrophoben Surfactant-Extrakt verwendete, experimentell nicht erreicht werden. Lag diese bei CRANE bei 112%/s [27]<sup>2</sup>, so konnten mit dem zur Verfügung stehenden Gerät lediglich Kompressionsgeschwindigkeiten von etwa 90%/s erreicht werden. Da CRANE die hohe Kompressionsgeschwindigkeit als Ursache für die Ausbildung stabiler Monoschichten ansieht, widersprechen die hier gezeigten Ergebnisse denen CRANES nur bedingt.

Interessant erscheint die Einbeziehung einer weiteren Beobachtung CRANES in die Diskussion: So untersuchte diese Arbeitsgruppe die Phasenübergänge von DPPC durch isobare Aufheizung einer CBS-Präparation bei unterschiedlichen Oberflächendrücken [28]. In diesen Experimenten zeigt sich das für PC erwartete Verhalten: Niedrig komprimierte DPPC-Filme ( $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1} < \Pi < 40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) bilden innerhalb des untersuchten Temperaturintervalls ( $20^\circ < \vartheta < 60^\circ \text{C}$ ) einen stabilen Oberflächenfilm aus. Innerhalb der unterschiedlich komprimierten Oberflächenfilme steigt die Phasenumwandlungstemperatur mit zunehmendem Druck. Bei Oberflächenfilmen mit einem Oberflächendruck  $\geq 45 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  zeigt sich ein Kollaps, der mit steigendem Druck zu höheren Temperaturen verschoben ist. So steigt diese Kollapstemperatur von etwa  $45^\circ \text{C}$  ( $\Pi = 50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) auf etwa  $65^\circ \text{C}$  ( $\Pi = 65 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ). Das Ende des Phasenübergangs, der als Änderung der Steigung der Auftragung der molekularen Fläche gegen die Temperatur ablesbar ist, kann bei diesen hoch komprimierten Oberflächenfilmen aufgrund des Kollapses nicht verfolgt werden.

Dies deckt sich aber mit früheren Beobachtungen GOERKES et al. [57]. Dieser zeigte für verschiedene Phosphatidylcholine, dass sie bei Temperaturen unter ihrer Phasenumwandlungstemperatur im Bilayer des Vesikel hohen Oberflächendrücken standhalten, und stellte einen Zusammenhang zwischen Kollaps und Phasenumwandlung im Monolayer her.

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten decken sich mit den Ergebnissen und Postulaten GOERKES: Die Abhängigkeit der Kollapstemperatur von Acylgruppenlänge und -sättigung, die die Phasenumwandlungstemperatur der PC-Lipidfilme bestimmt, wird aus den Ergebnissen ersichtlich. Folgt man der Ansicht GOERKES, dass der PC-Oberflächenfilm nach vollständiger Phasenumwandlung kollabiert, so müsste diese Umwandlung nach den hier gezeigten Daten bei DMPC unter einem Oberflächendruck von etwa  $70 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  bei etwa  $39^\circ \text{C}$  (SOPC:  $18^\circ \text{C}$ ; POPC:  $6^\circ \text{C}$ ) abgeschlossen sein. Die Phasenumwandlungstemperatur der Monoschicht bei etwa  $70 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  liegt demnach deutlich höher, als die der Vesikel in der Differential Scanning Calorimetry: Dieser Unterschied beträgt im Fall von DMPC  $15,5^\circ \text{C}$  (SOPC:  $11,5^\circ \text{C}$ ; POPC:  $8,5^\circ \text{C}$ ) gegenüber den Phasenumwandlungstemperaturen der jeweiligen Lipiddoppelschicht [45, 39]<sup>3</sup>. Damit wird zumindest eines der überraschenden Ergebnisse CRANES nachvollziehbar: Die erfolgreiche Kompression einer DMPC-Monoschicht bei  $37^\circ \text{C}$  wird auch mit den hier gezeigten Ergebnissen nachvollziehbar, da der bis zu maxima-

<sup>2</sup>CRANE berechnet die zeitabhängige Änderung der Oberfläche in Bezug auf die Oberflächengröße bei  $\Pi = 45 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ .

<sup>3</sup>Eine Datenbank der Phasenumwandlungstemperaturen von Lipiden ist unter [www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu](http://www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu) (Stand 6.2004) zugänglich.

len Oberflächendrücken komprimierte DMPC-Oberflächenfilm CRANES vermutlich in kondensiertem Zustand vorliegt.

Inwieweit die Ausbildung eines stabilen Oberflächenfilms bei hohen Oberflächendrücken auch im Fall des hydrophoben Extraktes nachvollziehbar ist, mag nach der Einbeziehung komplexerer Zwei- bzw. Dreikomponenten-Modellsysteme in die Untersuchungen abzuschätzen sein.

### 3.3.1 Kompression des binären Lipidsystems DPPC/DPPG

Die Kompression einer proteinfreien DPPC/DPPG- bzw. einer DPPC/POPG-Lipidmonoschicht (80:20 mol%) bei 37 °C auf calciumhaltigem Puffer zeigt ein uneinheitliches Verhalten. Diese Oberflächenfilme sind entweder auf maximale Drücke komprimierbar oder sie kollabieren unmittelbar auf den Gleichgewichtsspreitdruck (Daten nicht gezeigt).

#### Diskussion

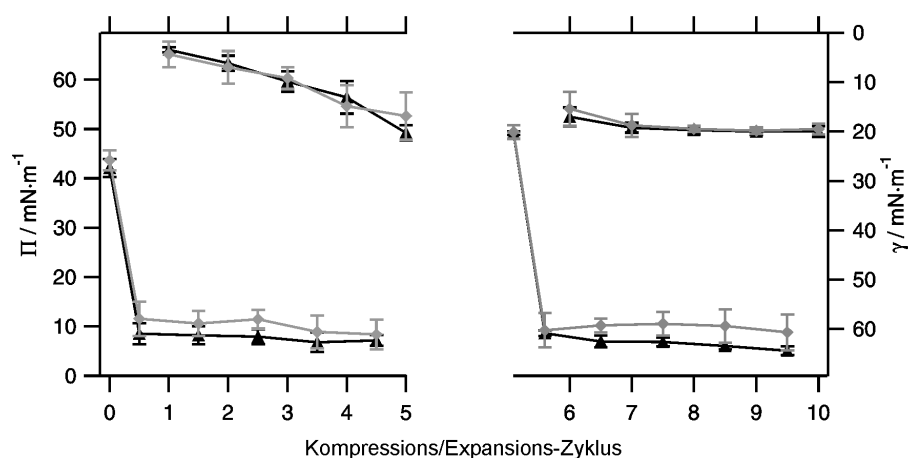
Der Einbau der Nicht-Bilayer-Lipide DPPG oder POPG destabilisiert den Oberflächenfilm. Der Umstand, dass bei einer Temperatur von 37 °C und einem PG-Anteil von 20 % die Oberflächenfilme nur teilweise auf Werte oberhalb des Gleichgewichtsspreitdrucks komprimierbar sind deutet darauf hin, dass bei einem solchen Anteil von konisch geformten Lipiden eine Stabilitätsgrenze für den Oberflächenfilm erreicht ist. Vergleichbare Ergebnisse erzielte VELDHUIZEN et al. für das hier vorgestellte DPPC/POPG-Lipidsystem im CBS [168], aber auch HAWCO et al. für ein DPPC/SOPC-Lipidsystem auf der Filmwaage [67]. Auch das oberhalb seiner Phasenumwandlungstemperatur konisch geformte SOPC hat somit einen destabilisierenden Einfluss auf den Oberflächenfilm: Sind DPPC/SOPC-Lipidfilme mit einem SOPC-Anteil von 10 % in der Lage stabile Oberflächenfilme auszubilden, so sind sie bei einem SOPC-Anteil von 50 % hierzu nicht mehr in der Lage. Bei einem SOPC-Anteil von 30 % zeigt sich auch hier ein uneinheitliches Bild.

Die Ergebnisse dieses Abschnittes stehen damit in Übereinstimmung mit der Theorie, dass nur hoch mit zylindrisch geformten Lipiden angereicherte Oberflächenfilme oberhalb des Gleichgewichtsspreitdrucks stabil sind. Nicht-Bilayer-Lipide destabilisieren somit auch bei Kompressionsgeschwindigkeiten von etwa 90 %/s aufgrund ihrer konischen Geometrie den Oberflächenfilm. Die gezeigten proteinfreien Lipidfilme zeigen somit nicht die Stabilität, die CRANE bei geringfügig höherer Kompressionsgeschwindigkeit (112 %/s) für DMPC- und hydrophobe-Extrakt-Präparationen beobachten konnte.

### 3.3.2 Ternäre DPPC/DPPG- bzw. DPPC/POPG-Monoschichten mit SP-B

Die Kompression von DPPC/DPPG/SP-B-Monoschichten (80:20:0,4 mol %) bei 37 °C auf einer calciumfreien Subphase ist in Abbildung 3.3 zu sehen. Die Oberflächenfilme sind im Gegensatz zu den reinen Lipidfilmen nicht in der Lage, eine Stabilität oberhalb ihres Gleichgewichtsspreitdrucks auszubilden. Bei jedem Zyklus sinkt der maximal erreichbare Oberflächendruck, so dass dieser schließlich bei etwa  $\Pi = 50 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  liegt.

Ein geändertes Bild zeigt sich bei den gleichen Präparationen auf calciumhaltiger Subphase (vgl. Abb. 3.4): In diesem Fall erreichen beide Präparationen Oberflächendrücke von etwa  $60 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ . Dieser Zustand ist allerdings nicht stabil: Innerhalb der



**Abbildung 3.3:** DPPC/PG/SP-B-Oberflächenfilme (80:20:0,4 mol %) auf calciumfreier Subphase bei 37 °C (▲ DPPC/DPPG/SP-B, ◆ DPPC/POPG/SP-B). Die Zyklen 1-5 wurden innerhalb von einer Minute durchgeführt. Der Wert bei 5,1 gibt den Wert des Oberflächenendrucks nach fünfminütiger Pause bei maximaler Kompression an. Die Zyklen 5,5 bis 10 wurden daran anschliessend innerhalb von einer Minute durchgeführt.

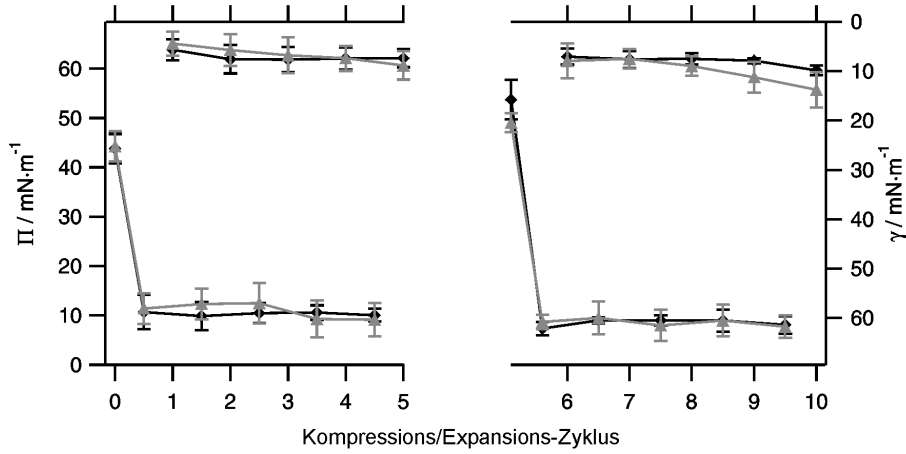
fünfsekündigen Pause vor einer erneuten Expansion kollabieren beide Oberflächenfilme bis zum Gleichgewichtsspreitdruck. Bei diesem Wert verbleiben die Oberflächenfilme auch bei einer fünfminütigen Pause im komprimierten Zustand.

Im Gegensatz zu den zuvor gezeigten Präparationen ist bei 20 °C sowohl auf calciumfreiem (vgl. Abb. 3.5) als auch auf calciumhaltigem Puffer (vgl. Abb. 3.6) mit den gewählten Lipidsystemen ein maximaler Oberflächenendruck von etwa  $\Pi = 70 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  erreichbar. Dieser Zustand ist relativ stabil. Nach fünfminütiger Pause zeigt sich lediglich bei der DPPC/POPG/SP-B-Präparation auf calciumhaltiger Subphase ein leichter Abfall des Oberflächenendrucks, der auf kollabierte Bereiche des Oberflächenfilms hindeutet. Allerdings wird auch in diesem Fall bei erneuter Expansion und Kompression wieder der maximale Oberflächenendruck erreicht.

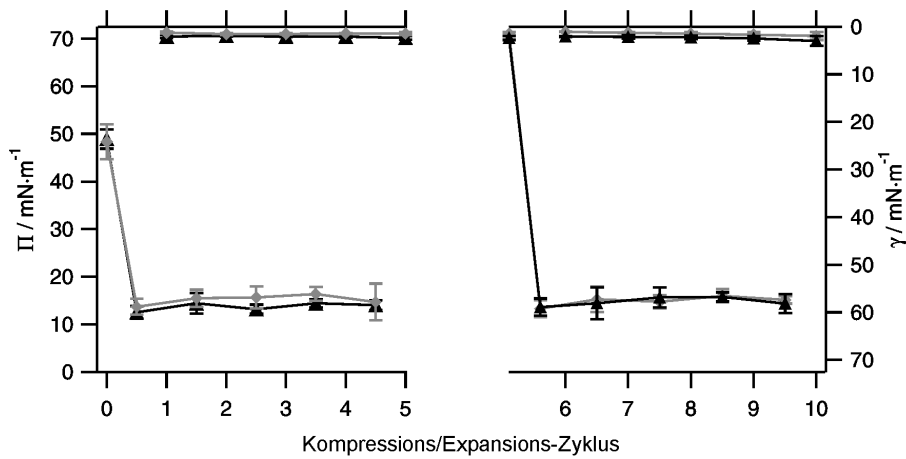
Um abschätzen zu können, ob das abweichende Verhalten des Lipidfilms bei 37 °C auf calciumhaltigem Puffer allein auf Calcium zurückzuführen ist, wurde ein Oberflächenfilm mit den Lipidmodellssystemen und SP-C komprimiert (vgl. Abb. 3.7). Diese Oberflächenfilme zeigen ein Verhalten, das von SP-B enthaltenden Oberflächenfilmen auf calciumfreier Subphase bekannt ist (vgl. Abb. 3.3): Sie kollabieren während der Kompressions/Expansions-Zyklen bis auf den Gleichgewichtsspreitdruck.

## Diskussion

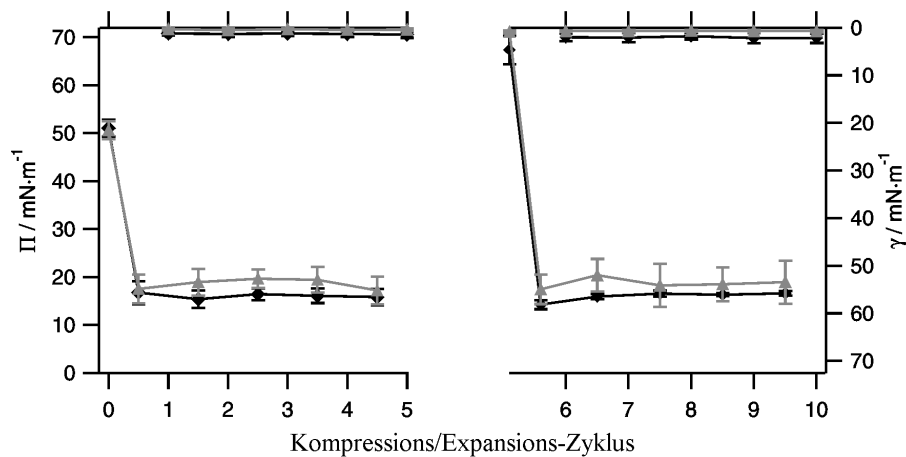
Die Zugabe von Surfactant-Proteinen zum ursprünglich stabilen Lipidoberflächenfilm führt zu dessen Instabilität. Surfactant-Proteine bilden mithin Fehlstellen in der zweidimensionalen Kristallstruktur des Oberflächenfilms, an denen ein Bruch des Oberflächenfilms bevorzugt stattfinden kann [185]. Da Surfactant-Proteine somit eine Sollbruchstelle des Oberflächenfilms darstellen, ist das von den SP-C-Oberflächenfilmen auf calciumhaltigem und von den SP-B-Oberflächenfilmen auf calciumfreiem Puffer



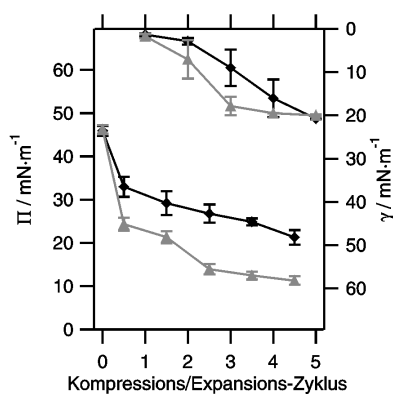
**Abbildung 3.4:** DPPC/PG/SP-B-Oberflächenfilme (80:20:0,4 mol %) auf calciumhaltiger Subphase bei 37 °C (▲ DPPC/DPPG/SP-B, ◆ DPPC/POPG/SP-B). Die Zyklen 1-5 wurden innerhalb von einer Minute durchgeführt. Der Wert bei 5,1 gibt den Wert des Oberflächendrucks nach fünfminütiger Pause bei maximaler Kompression an. Die Zyklen 5,5 bis 10 wurden daran anschliessend innerhalb von einer Minute durchgeführt.



**Abbildung 3.5:** DPPC/PG/SP-B-Oberflächenfilme (80:20:0,4 mol %) calciumfreier Subphase bei 20 °C (▲ DPPC/DPPG/SP-B, ◆ DPPC/POPG/SP-B). Die Zyklen 1-5 wurden innerhalb von einer Minute durchgeführt. Der Wert bei 5,1 gibt den Wert des Oberflächendrucks nach fünfminütiger Pause bei maximaler Kompression an. Die Zyklen 5,5 bis 10 wurden daran anschliessend innerhalb von einer Minute durchgeführt.



**Abbildung 3.6:** DPPC/PG/SP-B-Oberflächenfilme (80:20:0,4 mol %) auf calciumhaltiger Subphase bei 20 °C (▲ DPPC/DPPG/SP-B, ◆ DPPC/POPG/SP-B). Die Zyklen 1-5 wurden innerhalb von einer Minute durchgeführt. Der Wert bei 5,1 gibt den Wert des Oberflächendrucks nach fünfminütiger Pause bei maximaler Kompression an. Die Zyklen 5,5 bis 10 wurden daran anschliessend innerhalb von einer Minute durchgeführt.



**Abbildung 3.7:** DPPC/PG/SP-C-Oberflächenfilme (80:20:3 mol %) auf calciumhaltiger Subphase bei 37 °C (▲ DPPC/DPPG/SP-C, ◆ DPPC/POPG/SP-C). Die Zyklen 1-5 wurden innerhalb von einer Minute durchgeführt.

gezeigte Verhalten mit einem Protein-unspezifischen Bruch des Oberflächenfilms zu erklären: Die Fehlstelle des in den Oberflächenfilm eingeschlossenen Proteins führt bei hohem lateralen Druck zu dessen Kollaps.

Das Verhalten der SP-B-Oberflächenfilme bei 20 °C ist folgendermaßen interpretierbar: Der Lipidfilm befindet sich derart weit unterhalb seiner Phasenumwandlungstemperatur, dass auch geringe Mengen Protein ihn nicht zum Kollabieren bringen können. Aus Filmwaageexperimenten und rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen ist bekannt, dass aus solchen Präparationen durchaus Material ausgeschlossen wird, welches jedoch unter Expansion des Oberflächenfilms wieder in den Oberflächenfilm inseriert wird [88, 43] (vgl. Kapitel 4). Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist dieses ausgeschlossene Material angereichert an Proteinen, so dass unter hohem Oberflächendruck die stabile Monoschicht an der Luft-Wasser-Grenzfläche eine geringere Proteinkonzentration hat als der ursprünglich gespreitete Oberflächenfilm.

Das Verhalten der SP-B enthaltenden Lipidfilme bei 37 °C auf calciumhaltigem Puffer ist hingegen bemerkenswert: Im Gegensatz zu den anderen Präparationen bei dieser Temperatur erreicht der Oberflächenfilm trotz Kollaps immer wieder einen Oberflächendruck oberhalb des Gleichgewichtsspreitdruckes. Während in den anderen Präparationen bei 37 °C das einmal aus der Monoschicht ausgeschlossene Material nicht mehr in den Oberflächenfilm zurückkehrt, ist dies bei diesen Präparationen jedoch der Fall. Um welches Material es sich dabei handelt, kann aus den gezeigten Daten nicht erschlossen werden.

Bei dem für dieses System beschriebenen Vorgang des Kollapses innerhalb der fünfsekündigen Pause handelt es sich nicht um dass von SCHÜRCH et al. beschriebene „Bubble Clicking“ – einem spontanen Ausschluss von (wenig) Material aus dem Oberflächenfilm bei maximaler Kompression, die auf eine Überkompression des Oberflächenfilms zurückzuführen ist. Zu einem „Bubble Clicking“ kommt es lediglich bei maximalen Oberflächendrücken, und die Oberflächendruckänderung innerhalb dieses Phänomens ist sowohl minimal als auch kurzzeitig [147]. Im Gegensatz zum spontanen und schnellen „Click“ des „Bubble Clickings“ wird im vorliegenden Fall eine sanftere Formänderung der Luftblase über einen vergleichsweise langen Zeitraum beobachtet.

Die Ergebnisse entsprechen somit auch für die ternären Modellsysteme den Erwartungen, die an die Theorie einer notwendigen Anreicherung des Oberflächenfilms mit zylindrischen Lipiden geknüpft waren. Sie widersprechen jedoch nur bedingt den Beobachtungen CRANES, der stabile Oberflächenfilme mit vergleichbaren Präparationen des hydrophoben Extrakts oberhalb des Gleichgewichtsspreitdrucks erhielt, da die Kompressionsgeschwindigkeit in den letztgenannten Experimenten geringfügig höher lag. Lag sie in den in dieser Arbeit gezeigten Experimenten bei etwa 90 %/s, so lag sie bei CRANE bei 112%/s.

Für das Surfactant-System der Lunge sind somit zwei mögliche Szenarien zur Ausbildung des erforderlichen stabilen Oberflächenfilms denkbar: Einerseits kann ein DPPC-Anreicherungsprozess die Ausbildung eines solchen Oberflächenfilms ermöglichen, andererseits kann eine extrem hohe Kompressionsrate zumindest bei einer ersten Kompression der Alveole diese ermöglichen. Diese müsste, wie hier gezeigt, allerdings vermutlich über einer Kompressionsgeschwindigkeit von 90%/s liegen. Das Erreichen dieser ausgesprochen raschen Kompressionsgeschwindigkeit in den Alveolen der Lunge kann zwar physiologisch nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber bei Betrachtung des Atemvorgangs nicht naheliegend: Die Atemzugfrequenz liegt bei Erwachsenen bei 16–20 Atemzügen pro Minute. Bei Säuglingen liegt sie mit etwa 50 Atemzügen pro Minute ungleich höher [40]. Die Flächenänderung bei maximaler Atmung beträgt 54 % (vgl. Abschnitt 1.2). Wird davon ausgegangen, dass in der Lunge bei maxi-



maler Ausatmung ein Gleichgewichtsspreitdruck im Oberflächenfilm des Surfactants vorherrscht (vgl. Abschnitt 1.2), so kann in erster Näherung Folgendes angenommen werden: Bei einem die Totalkapazität der Lunge ausschöpfenden Säugling wird der Oberflächenfilm etwa jede Sekunde zu ungefähr 50% komprimiert. Geht man von einer gleichmäßigen Kompression der Oberfläche während dieses Vorganges aus, so läge die Kompressionsgeschwindigkeit somit bei 50%/s. Sie wäre beim Menschen somit maximal in etwa halb so groß, wie die in den hier gezeigten CBS-Experimenten verwendete. Bei einer solchen Kompressionsgeschwindigkeit ist jedoch nach den hier gezeigten Ergebnissen eine DPPC-Anreicherung des Oberflächenfilms erforderlich, um oberhalb des Gleichgewichtsspreitdrucks stabile Oberflächenfilme auszubilden.

Es ist keinesfalls vollkommen auszuschließen, dass während des Kompressionsvorganges die der Näherung zu Grunde liegende Annahme einer gleichförmigen Oberflächenänderung nicht erfüllt ist und somit die tatsächliche Kompressionsgeschwindigkeit im Oberflächenfilm des Surfactant höher liegt. Der Ansatz einer DPPC-Anreicherung im Oberflächenfilm des Surfactant erscheint allerdings wesentlich näherliegend. Dieser letztgenannten Hypothese wird somit in den weiteren Kapiteln dieser Arbeit der Vorzug gegeben. In Abschnitt 7.1 wird zudem eine Möglichkeit vorgestellt, mit der eine DPPC-Anreicherung in einem Modellsystem nachgewiesen oder falsifiziert werden könnte.



## Kapitel 4

# Mischungsverhalten von Surfactant-Modellsystemen

Sollte SP-B spezifisch mit einem Lipid wechselwirken, wie dies die in Abschnitt 1.10 angeführten Literaturergebnisse nahelegen, so müssten sich beide Wechselwirkungspartner im Oberflächenfilm in großer Nähe zueinander aufhalten. Mit einer Technik, die die laterale Verteilung von Molekülen im Oberflächenfilm angibt, wären also Hinweise auf eine spezifische SP-B/Lipid-Wechselwirkung zu erhalten.

Mit herkömmlichen Techniken ist dies bislang kaum möglich: In der Fluoreszenzlichtmikroskopie (FLM, z.B. [171]) und der Brewster Winkel Mikroskopie (Brewster Angle Microscopy, BAM, z.B. [128]) ist zwar der Nachweis unterschiedlicher Phasen, nicht aber ein Nachweis der chemischen Zusammensetzung dieser Phasen möglich. Zwar werden die Ergebnisse von FLM und BAM immer wieder in Bezug auf mögliche Zusammensetzungen der Phasen diskutiert, diese Diskussionen gehen jedoch immer von der Grundannahme aus, dass zylindrische Lipide bevorzugt kondensieren.

Ähnliche Beschränkungen liegen bei anderen verwendeten Methoden vor: In der Rasterkraftmikroskopie (Scanning Force Microscopy, SFM, z.B. [88, 43]) können neben den unterschiedlichen Phasen auch dreidimensionale Ausstülpungen von Material aus einem SP-B enthaltenden Oberflächenfilm beobachtet werden. Eine Aussage über deren Zusammensetzung ist allerdings streng genommen nicht möglich. In der Differential Scanning Calorimetry (DSC, z.B. [44]) können Entmischungsvorgänge beobachtet werden, eine Aussage, mit welchem Lipid das SP-B wechselwirkt, um solche Entmischungen herbeizuführen, gelingt jedoch nicht. In der Captive Bubble Surfactometry (CBS, z.B. [167], vgl. Kapitel 5) ist das SP-B zwar das bislang einzige Protein, das in Absorptionsexperimenten die Ausbildung eines oberhalb des Gleichgewichtsspreitdrucks stabilen Oberflächenfilms katalysiert; mit welchem Lipid es bei diesem Vorgang wechselwirkt, ist aus CBS-Daten jedoch nicht zu erschließen. Es existieren somit kaum zuverlässige Techniken, bei denen nicht auf eine der beiden Grundannahmen, der bevorzugten DPPC-Kondensation bzw. der Ausbildung stabiler Monoschichten durch DPPC-Anreicherung, zurückgegriffen werden muss.

Die bislang verlässlichsten Daten über SP-B-Lipid-Wechselwirkungen stammen aus der Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (Electron Spin Resonance Spectroscopy, ESR). Diese scheinen die Annahme zu bestätigen, dass das positiv geladene Protein spezifisch mit dem negativ geladenen Phosphatidylglycerol wechselwirkt [124].

Im Folgenden wird eine Technik vorgestellt, mit der die ESR-Daten evaluiert werden können: Die Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry, ToF-SIMS). Mit Hilfe der ToF-SIMS kann die atomare und molekulare Zusammensetzung von Oberflächen erfasst werden. Dies ist auch für festkörperunterstützte Membranen möglich [9]. Aus der lateralen Verteilung der spezifisch aus einer bestimmten Molekülsorte gebildeten Fragment- und Molekülionen kann auf die Verteilung dieser Molekülsorte im Oberflächenfilm geschlossen werden. Spezifische Wechselwirkungen von Molekülen sollten dabei als je entsprechende Verteilung ihrer Fragmentionen ersichtlich werden.

In dieser Arbeit wurde das bereits im vorangegangenen Kapitel (vgl. Kap. 3) vorgestellte DPPC/DPPG/SP-B-Modellsystem (80:20:0,4 mol%) mittels ToF-SIMS untersucht. Da bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass sich DPPC und DPPG nur in wenigen Fragmentionen unterscheiden lassen [16, 15], wurde neben diesem System auch eines verwendet, bei dem eine Lipidkomponente deuteriert wurde. Dieser Ansatz ermöglicht eine Unterscheidung beider Molekülspezies in zahlreichen Fragmentionen und erleichtert somit Aussagen über die Lipidverteilung in der festkörperunterstützten Membran.

Damit ein Austausch einer nativen durch eine deuterierte Komponente ohne Informationsverlust über das ausschließlich aus undeuterten Komponenten bestehende System vorgenommen werden kann, muss nachgewiesen werden, dass sich deuterierte und undeuterte Komponenten in diesen Lipid-Protein-Mischungen identisch verhalten. Hierzu wurden Filmwaage-, FLM-, SFM- und ToF-SIMS-Messungen durchgeführt. Für die Markierung einer Komponente standen vier deuterierte Lipidderivate zur Verfügung (vgl. Abb. 4.1). Um gegebenenfalls DPPC gegen ein deuteriertes Lipid austauschen zu können, kamen das kopfgruppeneuterte d9DPPC, das acylgruppeneuterte d62DPPC und das kopfgruppen- und fettsäureketteneuterte d75DPPC zum Einsatz. Um gegebenenfalls DPPG durch ein deuteriertes Isotopomer ersetzen zu können, wurde das acylgruppeneuterte d62DPPG verwendet (vgl. Abb. 4.1).

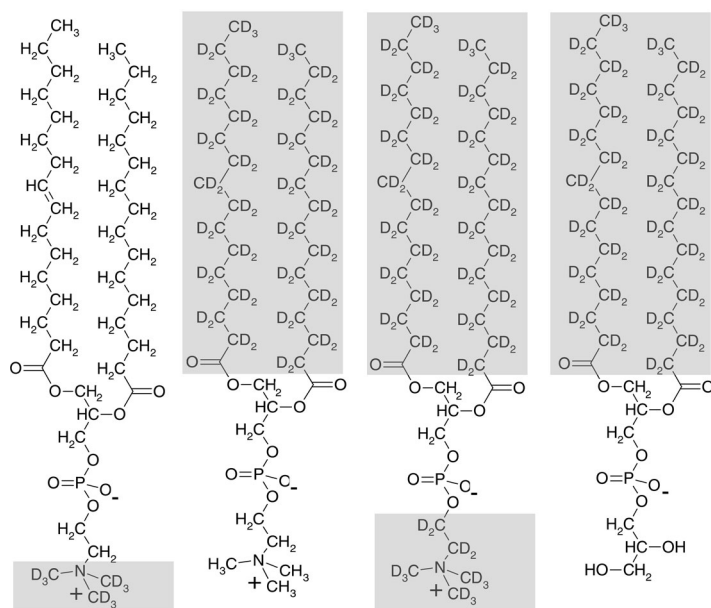
## 4.1 Methoden

### 4.1.1 Filmwaagemessungen

Die Messung sämtlicher in diesem Abschnitt gezeigten Isothermen wurde auf einer Filmwaage der Firma Riegler-Kirstein (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die Durchführung der in Abschnitt 2.4 gezeigten Isothermen auf der Nima Type 601 Bändchenfilmwaage (Nima, Coventry, GB) erfolgte analog.

#### Vorbereitung der Filmwaagemessungen

Die Filmwaage wurde für 15 Minuten mit dem Detergenz Mucisol (Brand, Wertheim, D) inkubiert. Nach dem Absaugen des Mucisol mit Hilfe einer Vakuumpumpe wurden Detergenzreste mittels Filterpapierstreifen entfernt. Die Filmwaage wurde einmal mit Wasser gespült und anschließend mit einem in Dichlormethan getränkten Kimwipes ausgewischt. Nach dreimaligem Spülen mit Reinstwasser wurde das Messsystem der Filmwaage mit einem Filterpapier versehen. Die Filmwaage wurde mit Subphase (Reinstwasser, pH 6,9 bzw. isotonische NaCl (140 mM) / CaCl<sub>2</sub> (2 mM) - Lösung, pH 6,8) gefüllt, und die Temperaturäquilibration wurde abgewartet.



**Abbildung 4.1:** Verschiedene kopfgruppen- und acylgruppendederisierte Lipide die in dieser Arbeit eingesetzt wurden: a) d9DPPC; b) d62DPPC; c) d75DPPC; d) d62DPPG. Deuterierte Molekülbereiche sind jeweils grau markiert.

### Vorbereitung der Lipidmischungen

Die Phospholipide wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Lipid- und Lipid/Protein-Lösungen wurden in Chloroform/Methanol (1:1 V/V) in einer 1 mM Konzentration angesetzt und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  für maximal 4 Monate gelagert. Ein nennenswerter Austausch von Wasserstoff- und Deuteriumatomen im Fall der deuterierten Lipide war massenspektrometrisch nicht zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

### Messung einer Isotherme

Nach der Kalibration der Filmwaage wurden die Lipid- und Lipid/Protein-Mischungen mittels einer Mikroliter-Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) auf die Subphasenoberfläche aufgebracht. Der Oberflächenfilm wurde für 15 Minuten äquilibriert und anschließend mit einer Geschwindigkeit von  $2.9\text{ cm}^2\cdot\text{min}^{-1}$  komprimiert.

### Konzentrationsbestimmung der Lipidlösungen

Die Konzentrationsbestimmung der Lipidlösungen erfolgte mittels Filmwaagemessungen. Ausgangspunkt dieser Bestimmung ist ein vollständig kondensierter Monofilm, bestehend aus einer Komponente auf einer Subphase aus Reinstwasser. Unter diesen Umständen richtet sich der Platzbedarf der hier verwendeten Phospholipide mit zwei gesättigten Fettsäuren nach der Größe der Kopfgruppe. Für DPPC wurde diese bei  $20\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  mit  $46\text{ \AA}^2$  und für DPPG mit  $42\text{ \AA}^2$  bestimmt [70, 130]. Der in dieser Arbeit vorgenommene Abgleich der Werte mit diesen Angaben liegt innerhalb

der Schwankungsbreite des ebenfalls durchgeführten Phosphortests nach Rouser (vgl. Abschnitt 2.3.2 [139], Daten nicht gezeigt) und ermöglicht darüberhinaus einen übersichtlicheren Vergleich der Isothermen unterschiedlich deuterierter Lipide im Vergleich zum Phosphortest. Im Fall der kopfgruppenmarkierten d9DPPC und d75DPPC ist diese Vorgehensweise nicht ganz korrekt, da die Deuterium-Kohlenstoff-Bindung um 0,01 % kürzer ist als die Wasserstoff-Kohlenstoffbindung. Der hieraus entstehende Fehler wird im vorliegenden Fall vernachlässigt, zumal er deutlich unter dem Fehler des alternativ zur Verfügung stehenden Phosphortests liegt.

#### 4.1.2 Fluoreszenzmikroskopie an der Luft/Wasser-Grenzfläche

Die Kopplung von Fluoreszenzlichtmikroskopie (FLM) und Filmwaagetechnik ermöglicht Einblicke in das Kondensationsverhalten eines Oberflächenfilms zum Beispiel während dessen Kompression. Zu diesem Zweck muss der Oberflächenfilm mit geringen Mengen eines Fluorophors versetzt werden, der sich entweder bevorzugt in kondensierten oder in fluiden Bereichen des Films anreichert. Im vorliegenden Fall wurde das die fluide Phase bevorzugende Bodipy-PC (2-(4,4-difluoro-5-methyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin; Molecular Probes inc., Eugene, USA) verwendet.

Nach Anregung des Fluorophors durch Licht der Wellenlänge 500 nm können die kondensierten Domänen im vorliegenden Fall als dunkle, die fluiden Bereiche aufgrund der Fluoreszenz des Fluorophors als helle Bereiche im Fluoreszenzlichtmikroskop visualisiert werden (vgl. Abb. 4.2.6).

Die Beobachtung der Domänenbildung in fluiden Lipid-Systemen ist mit der FLM aufgrund der raschen Bewegung der Oberflächenfilmmoleküle schwierig. Photographisch scharfe Aufnahmen sind unter diesen Bedingungen nicht möglich. Aus diesem Grund wurde diese Methode lediglich bei einer Temperatur von 20 °C angewendet.

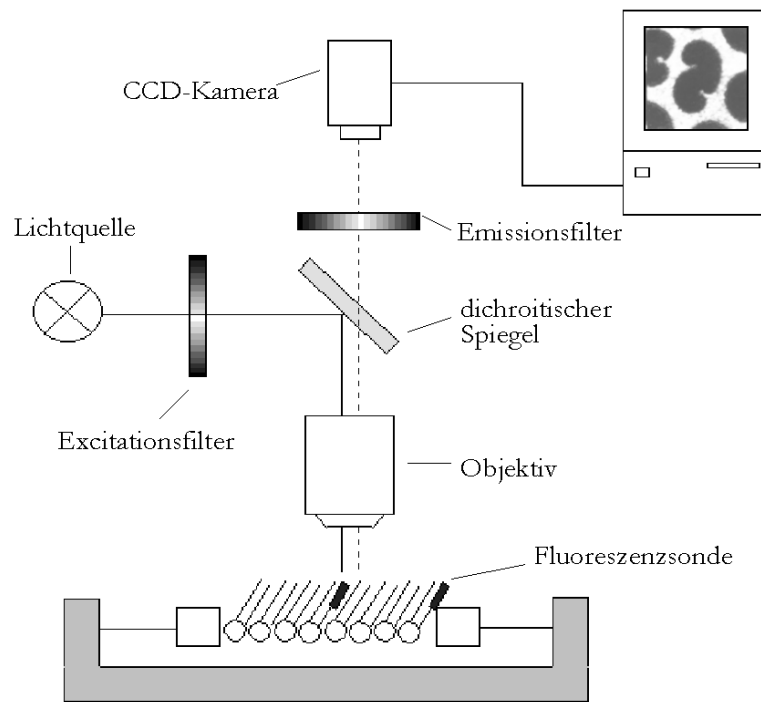
#### Beobachtung eines Oberflächenfilms mittels Fluoreszenzmikroskopie

Für die Beobachtung eines Oberflächenfilms wurde die Filmwaage (Riegler & Kirstein) unter einem Fluoreszenzlichtmikroskop (STM5-MJS, Olympus) fixiert. Licht der Wellenlänge 500 nm wurde aus dem Emissionsspektrum einer Quecksilberlampe gefiltert und über einen dichroiden Spiegel auf die Oberfläche der Filmwaage projiziert. Das von der Oberfläche emittierte Licht wurde durch ein Objektiv (50 ×, LMPlanFl, Olympus, Hamburg, D), einen anschließenden dichroiden Spiegel und in einem optischen Filtersystem gesammelt und von einer CCD-Kamera (C4742-95, Hamamatsu, Hersching, D) digitalisiert.

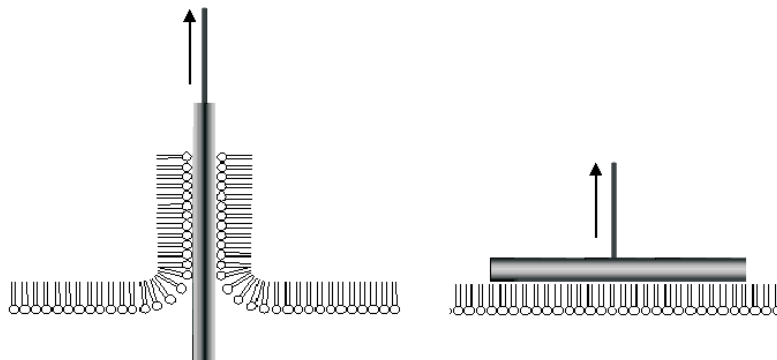
Die Oberflächenfilme wurden wie unter Abschnitt 4.1.1 beschrieben präpariert. Allerdings wurden die verwendeten oberflächenaktiven Substanzen zeitnah vor dem Spreiten mit methanolischer  $\beta$ -bodipy-PC-Lösung bis zu einer Konzentration von 0,5 mol% versetzt. Die Kompression des Oberflächenfilms erfolgte mit einer Geschwindigkeit von  $1.5 \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ . Sie wurde mehrfach bei je unterschiedlichem Oberflächen- druck für die Aufnahme von Fluoreszenzmikroskopie-Bildern unterbrochen.

#### 4.1.3 Präparation oberflächenunterstützter Membranen

Für die Immobilisierung der Oberflächenfilme auf festen Substraten wurden zwei Übertragstechniken (LANGMUIR-SCHÄFER- bzw. hydrophiler LANGMUIR-BLODGETT-Übertrag) auf je zwei unterschiedliche Trägermaterialien durchgeführt. Während sich



**Abbildung 4.2:** Experimenteller Aufbau der Fluoreszenzlichtmikroskopie. Mit dieser Technik kann u.a. der Kondensationsprozess von lipidhaltigen Oberflächenfilmen beobachtet werden.



**Abbildung 4.3:** Links: LANGMUIR-BLODGETT-Übertrag. Rechts: LANGMUIR-SCHÄFER-Übertrag. Während der (hydrophobe) LANGMUIR-BLODGETT-Übertrag zu einer festkörperunterstützten Membran führt, bei der die Kopfgruppen der Lipide dem Träger zugewandt vorliegen, liegen als Folge des LANGMUIR-SCHÄFER-Übertrags die Acylgruppen der Lipide zum Träger zugewandt vor.

die Wahl der Übertragungsarten aus der Fragestellung ergab (vgl. Abschn. 4.2.8), stellen die Trägermaterialien Mica und Gold Optimierungen für die jeweils verwendete Methode dar. Im ToF-SIMS wurde eine elektrisch leitende Gold-, im SFM die atomar ebene Mica-Oberfläche verwendet. Wie in Abbildung 4.3 schematisch dargestellt, ist das Ergebnis beider Überträge eine Präparation, bei der die Lipid-Kopfgruppen zur Substratseite angeordnet sind. Der LANGMUIR-SCHÄFER-Übertrag (LS-Übertrag) erfolgt hierbei nach horizontaler Annäherung des Trägers an die Probe, während dem LANGMUIR-BLODGETT-Übertrag (LB-Übertrag) ein vertikales Eintauchen des Trägers in die oberflächenfilmfreie Subphase vorausgeht. Generell ist der LB-Übertrag effizienter sowie einfacher zu handhaben und somit zu bevorzugen.

### Vorbereitung des Transfers auf Gold-Träger

Die Präparation von Trägern mit einer Gold-Oberfläche für die ToF-SIMS erfolgte wie von BOURDOS [15] beschrieben: Tempaxglas-Platten ( $25 \text{ mm} \times 11 \text{ mm} \times 1,1 \text{ mm}$ ) wurden zunächst mit Mucosol und nach Abspülen unter fließendem Reinstwasser mit Reinstwasser für je 15 Minuten bei  $70^\circ\text{C}$  im Ultraschallbad gereinigt. Die Glasplatten wurden anschließend erneut mit Reinstwasser abgespült, im Stickstoffstrom getrocknet und für drei Minuten im Argonplasma behandelt. Die derartig gereinigten Glas-träger wurden zunächst mit einer 1 nm starken Chrom- und dann mit einer 200 nm starken Goldschicht bedampft. Die Träger wurden für maximal 1 Jahr bei Raumtemperatur gelagert. Vor dem Gebrauch wurden sie für 8 h im Soxhlet-Extraktor unter Rückfluss mit n-Hexan gereinigt, unter fließendem Reinstwasser gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und für drei Minuten im Argonplasma behandelt.

### Vorbereitung des Transfers auf Mica-Träger

Zur Vorbereitung des Transfers auf Mica-Träger wurden je Seite fünf Schichten Glimmer durch wiederholtes Aufkleben und Entfernen von Tesafilm entfernt. Auf die somit gewonnenen sauberen und atomar ebenen Oberflächen wurde der Lipidfilm ohne weitere Vorbehandlung übertragen.

### LANGMUIR-BLODGETT-Transfer

Die Träger wurden mit Hilfe von Tesafilm in vertikaler Ausrichtung an der Hebevorrichtung der Filmwaage befestigt und ca. 0,5 cm tief in die gereinigte, oberflächenfilmfreie Subphase der Filmwaage eingetaucht. Nach Spreiten des Lipidfilms wurde das System für ca. 30 Minuten äquilibriert, anschließend bis zum Übertragungsoberflächendruck mit einer Geschwindigkeit von  $1,5 \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$  komprimiert und nach ca. 15 minütiger Äquilibrationszeit durch Anhebung des Trägers mit einer Geschwindigkeit von  $0,7 \text{ mm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$  übertragen. Der Transfer der Filme erfolgte in jedem der gezeigten Fälle unter Druckkontrolle: Ein durch Übertrag von Oberflächenfilm-Material auf den Festkörper zu erwartender Abfall des Oberflächendrucks während des Übertrags wurde durch eine automatische Nachregulierung des Barrierevorschubs durch die Filmwaage vermieden. Auch bei Überträgen niedrig kompressibler Oberflächenfilme (z.B. bei einem Oberflächendruck von  $2 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ) wurde auf einen Übertrag im Flächenkontroll-Modus verzichtet, da beide Kontroll-Modi zu übereinstimmenden Ergebnissen führten.



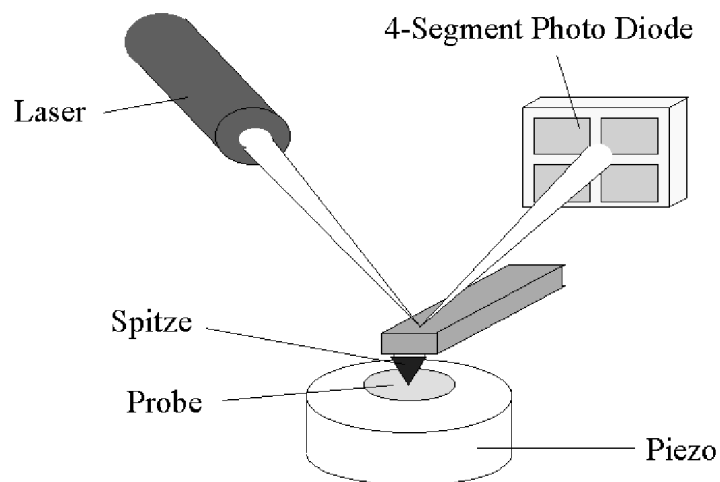
### LANGMUIR-SCHÄFER-Transfer

Zur Durchführung des LANGMUIR-SCHÄFER-Transfers wurde ein Winkelhaken an die Hebevorrichtung der Filmwaage montiert. Der Glasträger wurde mit Hilfe eines Fotoklebers an der Unterseite des Winkelhakens befestigt. Der Winkelhaken wurde mittels einer Wasserwaage horizontal ausgerichtet und langsam an den Oberflächenfilm angenähert. Im Gegensatz zu den in anderen Publikationen beschriebenen Versuchsanordnungen [153] wurde der Träger nicht durch die Phasengrenzfläche in die Subphase überführt, sondern unmittelbar nach der Benetzung durch den Oberflächenfilm mit maximaler Geschwindigkeit angehoben. Der Träger verblieb bis zur Trocknung in der Hebevorrichtung.

#### 4.1.4 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (Scanning force microscopy, SFM) ermöglicht die topographische Abbildung einer Probenoberfläche im Nanometermaßstab. Wesentlicher Bestandteil des SFM ist eine atomar scharfe Spitze, mit der die Probenoberfläche abgerastert wird. Diese Spitze ist mit einer Blattfeder verbunden, deren Auslenkung mit Hilfe eines auf eine 4-Segment-Photodiode ausgerichteten Laserstrahls nachvollzogen werden kann (vgl. Abbildung 4.4).

In dieser Arbeit wurden die SFM-Aufnahmen im sogenannten Tapping-Modus aufgenommen. Bei dieser Anwendung schwingt der Federbalken in seiner Resonanzfrequenz und wird so positioniert, dass er nur für den Bruchteil seiner Schwingungsamplitude auf die Probe trifft. Die Höhe des Federbalkens wird während des Rastervorgangs anhand einer Rückkopplungsschleife an das durch den Kontakt geänderte Amplitudensignal und somit an die Topographie der Probe angepasst. Die Positionierung des



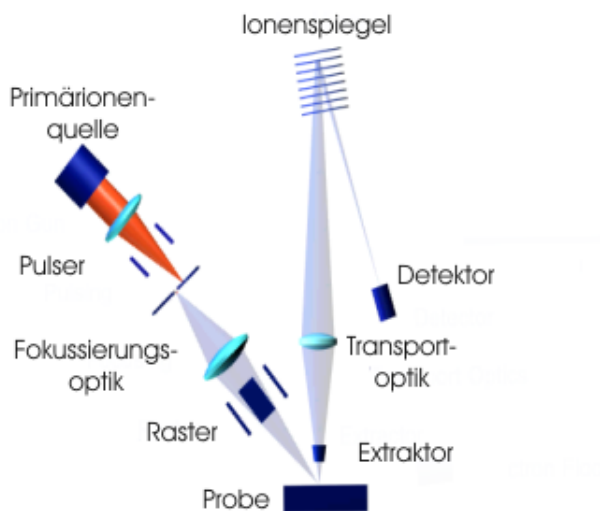
**Abbildung 4.4:** Aufbau der Detektionseinheit eines Rasterkraftmikroskops [15]. Mit Hilfe der dargestellten atomar scharfen Spitze kann die Probenoberfläche abgerastert werden. In dieser Arbeit verwendeten *Tapping*-Modus wird anhand von Änderungen der Schwingungsamplitude der mit der Spitze verbundenen Blattfeder ein Höhenprofil der Probe ermittelt. Die Detektion der Schwingungsänderung erfolgt über einen auf eine 4-Segment-Photodiode ausgerichteten Laserstrahl.

Federbalkens erfolgt dabei über piezoelektrische Stellglieder. Dieses Vorgehen liefert zugleich Daten über die Topographie der Probe, die über bildgebende Verfahren am Computer in eine optische Darstellung der Oberfläche umgewandelt werden können.

#### 4.1.5 Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie

Die Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry, ToF-SIMS) ermöglicht sowohl die massenspektrometrische Identifizierung als auch die orts aufgelöste Betrachtung der Verteilung einzelner Molekülspezies sowie ihrer Fragmente auf einer Oberfläche, nachdem diese als Folge eines Primärionenbeschusses ionisiert vorliegen. Ist die Untersuchung von Oberflächenfilmen Ziel der Oberflächenmassenspektrometrie, so können diese aufgrund des für diese Technik erforderlichen Hochvakuums nicht auf der Subphase beobachtet werden, sondern müssen als festkörperunterstützte Membranen vorliegen.

In Abbildung 4.5 ist das Grundprinzip der ToF-SIMS schematisch dargestellt: Ein Primärionenstrahl wird über ein elektrisches Linsensystem gebündelt und trifft auf die Probe. Auf der Probe verursacht der Einschlag der Primärionen die Desorption von Sekundärteilchen, die zu einem Anteil von etwa  $10^{-4}$ –10% geladen vorliegen [64]. Solche Sekundärionen werden im elektrischen Feld beschleunigt, im Flugzeitanalysator hinsichtlich ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses getrennt und anschließend im Detektor nachgewiesen. Das beschleunigende elektrische Feld kann in unterschied-



**Abbildung 4.5:** Schematische Darstellung eines Flugzeit-Sekundärionenmassenspektrometers. Mit Hilfe eines gepulsten Primärionenstrahls kann die Probenoberfläche abgerastert werden. Die beim Auftreffen der Primärionen desorbierenden Sekundärionen werden im Flugzeitanalysator entsprechend ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses ( $m/z$ ) aufgetrennt und detektiert [74].

licher Polarität geschaltet werden, so dass die Aufnahme von Spektren sowohl der positiven als auch der negativen Sekundärionen möglich ist. Im Folgenden werden der ToF-Analysator und die Primärionenquelle als wesentliche Komponenten des Oberflächenmassenspektrometers erklärt. Auf weitere, nicht unwesentliche Bestandteile des ToF-SIMS-Gerätes (Flood Gun, Vakuumsystem, Hebebühnensystem, etc.) soll im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen werden.

### Flugzeit-Analysator

Im Flugzeitanalysator kann das Verhältnis von Masse ( $m$ ) zu Ladung ( $z$ ) von zuvor im elektrischen Feld beschleunigten Ionen entsprechend ihrer Driftzeit im feldfreien Raum des Analysators bestimmt werden. Der Aufbau des ToF-Analysators gliedert sich in den Extraktor, die elektrische Linse, den Ionenspiegel und den Detektor (vgl. Abb. 4.6).

Der Extraktor dient der Beschleunigung der Sekundärionen. Durch Anlegen einer Spannung ( $U$ ) von  $\pm 2$  kV zwischen Extraktor und Probe werden die nach Aufschlag der Primärionen desorbierten Sekundärionen in Richtung des Extraktors beschleunigt. Dabei kann die kinetische Energie ( $E_{kin}$ ), die ein Ion einer bestimmten Ladung ( $z$ ) bei dieser Beschleunigung aufnimmt, mit Gl. (4.1) beschrieben werden.

$$E_{kin} = z U \quad (4.1)$$

Die Geschwindigkeit ( $v$ ), mit der die Ionen aus diesem Beschleunigungsvorgang hervorgehen, ist dabei nicht nur von der Ladung sondern auch von der Masse des beschleunigten Ions abhängig, wie aus Gl. (4.2) ersichtlich wird.

$$z U = \frac{1}{2} m v^2 \quad (4.2)$$

Die Geschwindigkeit eines Teilchens ist dessen pro Zeit ( $t$ ) zurückgelegte Strecke ( $s$ ):

$$v = \frac{t}{s} \quad (4.3)$$

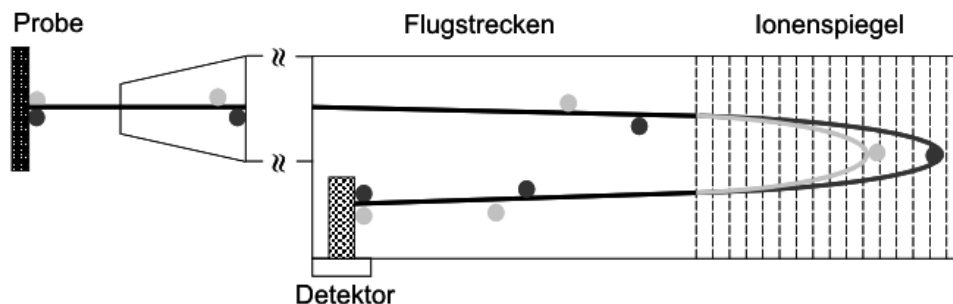
Diese Geschwindigkeit des beschleunigten Ions verändert sich im feldfreien Raum des ToF-Analysators nicht mehr, so dass sich aus Gl. (4.2) ein Zusammenhang nach Gl. (4.4) ergibt, aus dem auf das Verhältnis von Masse zu Ladung geschlossen werden kann.

$$\frac{m}{z} = 2 U \frac{t^2}{s^2} \quad (4.4)$$

Da in der SIMS in der Regel einfach geladene Ionen entstehen ( $z = 1$ ), ist die Masse des Ions proportional zum Quadrat seiner Driftzeit im Analysator ( $m \sim t^2$ ) und kann somit aus dieser bestimmt werden.

Bei dem verwendeten Detektor handelt es sich um eine Kombination aus Channelplate und Szintillator mit nachfolgendem Photomultiplier. Auftreffende Sekundärionen werden in der Channelplate in Elektronen umgewandelt und vervielfältigt. Anschließend lösen diese Elektronen im Szintillator Photonen aus, die im Photomultiplier wiederum in Elektronen umgewandelt werden. Diese optische Auskopplung ist notwendig, um Hochspannung abzukoppeln.

Reflektor und elektrische Linse stellen eine Optimierung des Systems dar: Mit Hilfe der elektrischen Linse werden aus unterschiedlichen Bereichen der Probe desorbierte



**Abbildung 4.6:** Aufbau eines Time-of-Flight-Analysators. Die desorbierten Sekundärionen werden im elektrischen Feld beschleunigt und über eine elektrische Linse und den Ionenspiegel auf den Detektor fokussiert.

Sekundärionen auf den Detektor fokussiert. Mit Hilfe des Reflektors werden unterschiedliche Geschwindigkeiten von Ionen einer Ionenspezies ausgeglichen: Schnellere Ionen dringen tiefer in das elektrische Feld des Ionenspiegels ein und haben somit eine längere Strecke zurückzulegen als langsame Ionen. Das elektrische Feld des Ionenspiegels kann nun so reguliert werden, dass sämtliche Ionen einer Ionenspezies zeitgleich auf dem Detektor auftreffen. Der Ionenspiegel dient somit der Minimierung der Zeitverteilung für das Auftreffen einer Ionenspezies im Detektor und optimiert somit die Massenauflösung des Gerätes.

### Primärionenquelle

Voraussetzung für eine Detektion von Sekundärionen mit hoher Massenauflösung mit Hilfe des Flugzeitanalysators ist ein gemeinsamer Zeitpunkt für die Desorption dieser Ionen.

Der gemeinsame Zeitpunkt der Desorption der Sekundärionen wird über eine Pulsung des Primärionenstrahls erreicht. Der Primärionenstrahl wird im vorliegenden Fall mit Hilfe einer Flüssigmetallionenquelle, bestehend aus einer Germanium/Gold-Legierung, erzeugt: Aus dem Flüssigmetall werden die Primärionen durch das Anlegen einer hohen Spannung (25 kV) extrahiert und über eine elektrische Linse fokussiert. Zu diesem Zeitpunkt enthält der Primärionenstrahl sowohl Gold- ( $\text{Au}_1^+$ ) als auch Germaniumionen ( $\text{Ge}_1^+$ ) sowie deren Clusterionen ( $\text{Au}_{1+n}^+$ ,  $\text{Ge}_{1+n}^+$ ). Eine entsprechend ausgelegte ionenoptische Einheit erlaubt die zuverlässige Trennung der einzelnen Strahlkomponenten. Zusätzlich werden aus dem kontinuierlichen Strahl einzelne Ionenpakete herausgeschnitten (Pulsung).

Die Ionenquelle wurde in zwei verschiedenen Betriebsarten verwendet [73]:

#### 1. *bunched mode*

- Lateralauflösung:  $3 - 5 \mu\text{m}$
- Pulslänge  $< 1 \text{ ns}$  (hohe Massenauflösung)
- $\rightarrow$  geeignet für die Aufnahme von Massenspektren zur Molekülidentifizierung.

## 2. *burst alignment mode*

- Lateralaufösung: 250 nm
- Pulslänge 10–100 ns (nominale Massenaufösung)
- → geeignet für die Darstellung der Lateralverteilung von Sekundärionen.

### Massenspektrometrie (*bunched Modus*)

Ziel der massenspektrometrischen Untersuchungen der Proben ist eine möglichst hohe Massenaufösung, wobei die laterale Auflösung eine demgegenüber geringe Rolle spielt.

Die Massenaufösung (Resolution,  $R$ ) ist die Fähigkeit des Massenspektrometers, zwischen zwei unterschiedlichen Massen zu differenzieren. Sie ist nach Gl. 4.5 definiert:

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (4.5)$$

$\Delta m$  ist dabei die Massendifferenz zwischen zwei benachbarten Signalen, die gerade noch voneinander getrennt werden können. Das Signal der niedrigeren Masse  $m$  gilt dabei dann von dem zweiten Signal ( $m + \Delta m$ ) getrennt, wenn die Höhe des gemeinsam geteilten Peakfußes maximal 10 % der Peakhöhe beträgt [151].

In der ToF-SIMS wird eine maximale Massenaufösung über eine möglichst kleine Zeitspanne für die Desorption der Sekundärionen und diese wiederum durch eine möglichst kurze Auftreffzeit für die Primärionen erreicht. Diese kann durch Einsatz des sogenannten Bunchers verkürzt werden: Ionen des Primärionenstrahls werden mit einer geringfügig unterschiedlichen Geschwindigkeit aus dem Flüssigmetall extrahiert. Nach Pulsung des Primärionenstrahls in der Deflector Unit führt diese unterschiedliche Geschwindigkeit auf der bis zur Probe verbleibenden Wegstrecke zu einer Ausdehnung des gepulsten Ionenpaketes und somit der Auftreffzeit des Ionenpaketes auf der Probe. Aufgabe des Bunchers ist die Beschleunigung der im hinteren Teil des Ionenpaketes anzutreffenden Ionen mit unterdurchschnittlicher Geschwindigkeit auf eine überdurchschnittliche Geschwindigkeit, so dass die Auftreffzeit der Primärionen auf der Probe minimal wird. Sie liegt in den gezeigten Fällen bei ca. 600 ps.

Mit dem gebunchten Modus werden Massenaufösungen zwischen 4000 und 10000 erreicht (vgl. Abb. 4.10). Selbst im ungünstigsten Fall kann somit ein einfach geladenes Ion der Masse 100,00 Da von einem der Masse 100,03 Da unterschieden werden.

### Oberflächenabbildung (*burst alignment Modus*)

Bei der Oberflächenabbildung ist nicht eine hohe Massen-, sondern vielmehr eine hohe Ortsauflösung erwünscht. Eine hohe Ortsauflösung setzt einen auf der Probe scharf fokussierten Primärionenstrahl voraus. Diese Fokussierung kann im zuvor vorgestellten *bunched* Modus nicht erreicht werden: Die Ionen des Primärionenstrahls besitzen, nachdem sie den Buncher passiert haben, eine stark unterschiedliche Energie und werden somit aufgrund des chromatischen Fehlers des dem Buncher nachfolgenden elektrischen Linsensystems in unterschiedlichem Maße abgelenkt, was eine Aufweitung des Primärionenfokusses zur Folge hat.

Für die Oberflächenabbildung wird daher auf den Einsatz des Bunchers verzichtet. Der Primärionenstrahl kann somit lateral stärker fokussiert werden. Es tritt allerdings ein Verlust der Massenaufösung ein. In diesem *burst alignment* Modus ist aus diesem Grund lediglich eine Nominalmassenaufösung möglich (vgl. Abb. 4.10). Das zuvor als Beispiel erwähnte einfach geladene Ion der Masse 100 Da kann im *burst alignment* Modus demnach nur von einem Ion der Masse 101 Da unterschieden werden.

Physikalisch ist die erreichbare Lateralauflösung der ToF-SIMS über die Ausdehnung der Stoßkaskade auf der Probe begrenzt: Der Einschlag eines beliebig scharf fokussierten Primärionenstrahls führt zu Stoßprozessen innerhalb der Oberflächenmoleküle, so dass nicht nur unmittelbar am Auftreffpunkt der Primärionen Teilchen desorbieren sondern auch im Umkreis des Einschlagpunktes. Die physikalisch maximal erreichbare laterale Auflösung liegt in der SIMS deshalb bei etwa 2–10 nm [64].

Technisch scheitert die Erreichung dieses Wertes derzeit (noch) an der Fokussierung des Primärionenstrahls. Dieser kann im verwendeten TOF IV Gerät derzeit „lediglich“ auf etwa 50–80 nm fokussiert werden [64].

Inwieweit die technisch erreichbare Auflösung des SIMS in einer Oberflächenabbildung ausgeschöpft werden kann, hängt nicht zuletzt von der Probe ab. So lassen sich verschiedene Proben unterschiedlich gut ionisieren: Während sich etwa aus Salzen leicht Ionen desorbieren lassen, ist dies bei organischem Material weitaus schwieriger, da in diesem Fall überwiegend ungeladene Teilchen desorbieren. Die geringe Ausbeute geladener organischer Moleküle bei zugleich begrenzter Probenmenge verhindert eine lateral hochauflösende Oberflächenabbildung von oberflächenunterstützten Membranen [79].

Im vorliegenden Fall ist zudem eine maximale Ortsauflösung nicht erforderlich: Für den Nachweis spezifischer Lipid-Protein-Wechselwirkungen erschien es ausreichend, die laterale Auflösung der Oberflächenabbildungen der ToF-SIMS in einem der Fluoreszenzlichtmikroskopie vergleichbaren Bereich zu wählen. Mit der zuletzt genannten Technik konnten bereits Entmischungsvorgänge des fluoreszenzmarkierten Proteins nachgewiesen werden [108].

Aus diesem Grund wurde mit den in Tabelle 4.1 dargestellten Parametern operiert. Sie ermöglichen eine laterale Auflösung von etwa 250 nm: Um mit Hilfe des *burst alignment* Modusses eine Oberflächenabbildung zu ermöglichen, wurde die Probe in einem gewählten Bildausschnitt von  $70 \times 70 \mu\text{m}^2$  in einer vorgegebenen Rasterung von  $128 \times 128$  Bildpunkten abgerastert, und in jedem Rasterpunkt wurde ein Massenspektrum aufgenommen. Dabei wird der Primärionenstrahl nach dem Zufallsprinzip auf die unterschiedlichen Rasterpunkte gelenkt, um Probenaufladungen durch den Ionenbeschuss, die den Desorptionsvorgang stören würden, zu vermeiden. Dieser Scansvorgang wird für alle Rasterpunkte auf derselben Probenstelle 300 Mal wiederholt, die 300 Massenspektren jedes Rasterpunktes werden aufaddiert. Die gewählte Anzahl der Scans stellt eine Optimierung für die Fragmentationen der Probe dar: Da die Ausbeute im Durchschnitt bei steigenden Massen abnimmt, sind Oberflächenabbildungen der Quasimolekülonen in der Regel zu kontrastarm, um Aussagen über deren laterale Verteilung treffen zu können. Da insbesondere die Bestandteile deuterierter Lipidsysteme in zahlreichen Fragmentationen unterscheidbar sind, wurde zugunsten eines höheren Probendurchsatzes auf eine zeitaufwendige höhere Scanrate verzichtet.

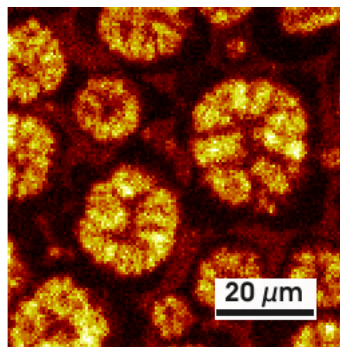
Die Wiederholrate ( $\nu_w$ ), also die Anzahl der pro Sekunde abgegebenen Primärionenpulse, lag bei 5 kHz. Die Wiederholrate legt den Massenbereich des Spektrums fest, da mit jedem abgegebenen Primärionenpuls die Aufzeichnung eines neuen Spektrums beginnt. Mit der hier gewählten Wiederholrate war die Aufzeichnung eines Massenspektrums bis zu einer Masse von 2000 Da möglich. Der Primärionenstrom ( $I_p$ ) lag bei 0,2 pA. Die Primärionenfluenz, also die Zahl der pro Messung und Fläche applizierten Primärionen, lag unter der „statischen Grenze“ der ToF-SIMS von  $10^{13} \text{ cm}^{-2}$ . Die „statische Grenze“ ist ein statistischer Grenzwert, unterhalb dessen ein zweimaliger Beschuss der exakt gleichen Probenstelle als nahezu ausgeschlossen gilt.

Ein typisches Ergebnis einer Oberflächenabbildung ist in Abbildung 4.7 zu sehen. Für jeden Rasterungspunkt können die aufaddierten Intensitäten jeder nominellen

**Tabelle 4.1:** Einstellungen des ToF-SIMS-Gerätes bei Oberflächenabbildungen.

Bildpunktraster	128 × 128
Bildfeld	70 × 70 $\mu\text{m}^2$
Scanrate (Pulse/Bildpunkt)	300
Wiederholrate	5 kHz
Pulslänge	200 ns
Primärionenstrom	0,2 pA

Masse einer Farbskala zugeordnet werden, die zu einem zweidimensionalen Bild der Ionenverteilung auf der Probe führt. Die Farbskala ist dabei in 250 unterschiedliche Farben unterteilt: Im vorliegenden Fall wird die dunkelste Farbe (schwarz) Rasterpunkten zugeordnet, in denen die Intensität 0 ist, die hellste Farbe (weiß) wird Rasterpunkten der maximalen Intensität zugeordnet. Wie in Abbildung 4.7 zu erkennen ist, ist insofern die Angabe der *maximum counts* (mc) von hoher Bedeutung: Dieser Wert gibt die Anzahl der detektierten Ionen im Bereich maximaler Intensität wieder. Ist dieser Wert beispielsweise kleiner als 250, werden demnach nicht alle Farben der Farbskala vergeben, was im visuellen Eindruck zu überzeichneten Kontrasten führt. Neben der Angabe der *maximum counts* erfolgt zu jedem Ionenbild die Angabe der Masse ( $M$ ) und der *total counts*, also der auf der gezeigten Fläche insgesamt detektierten Ionen der gezeigten Masse.



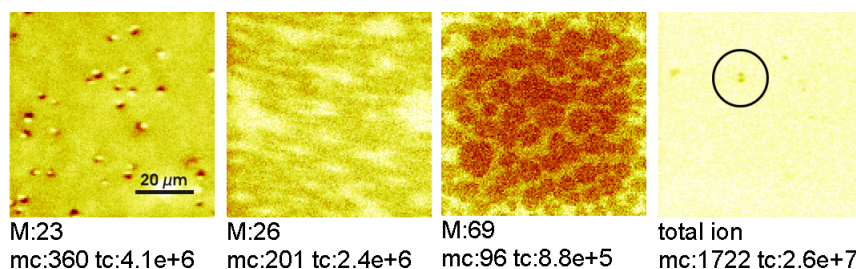
**M:2**  
**mc:83 tc:4.1e+5**

**Abbildung 4.7:** Beispiel für eine ToF-SIMS Oberflächenabbildung eines Sekundärons der Masse 2 Da. Die hellsten Rasterpunkte indizieren eine Ausbeute von 83 Sekundäronen dieser Masse (mc, *maximum counts*). Die schwarzen Rasterpunkte indizieren eine Ausbeute von 0 Sekundäronen. Auf der gesamten gezeigten Fläche wurden  $4,1 \cdot 10^5$  Sekundäronen (tc, *total counts*) der Masse 2 Da detektiert.

### Artefakte

In dieser Arbeit werden die ToF-SIMS-Abbildungen mit der Anzahl ( $n$ ) versehen, mit der unter exakt gleichen Bedingungen präparierte festkörperunterstützte Membranen in der ToF-SIMS analysiert wurden. So nicht anders angegeben, zeigten sich bei allen untersuchten Präparationen dieselben Kontraste in den Ionenbildern<sup>1</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurden gelegentlich Artefakte mit unterschiedlichen Ursachen beobachtet, wie sie in Abbildung 4.8 beispielhaft dargestellt werden. Folgende Artefakte wurden in die Ermittlung der Anzahl der Messungen ( $n$ ) einbezogen, da sie keine Auswirkungen auf das hier interessierende qualitative, wohl aber auf das quantitative Ergebniss der Messung haben:



**Abbildung 4.8:** Artefakte der ToF-SIMS-Oberflächenabbildungen: links: Kollaps des Oberflächenfilms; Mitte links: Shiften; Mitte rechts: Aufladung; rechts: Übersteuerung; In der rechten Oberflächenabbildung sind zudem Fehlstellen des Goldträgers zu erkennen (Kreis).

- **Übersteuerung:** Kommt im ToF-Detektor zu einem Zeitpunkt mehr als ein Ion an, so führt dies zu einer Fehlbestimmung der Ausbeute der entsprechenden Ionenspezies, da der Detektor in Einzelzähltechnik arbeitet. Eine Übersteuerung kann zumeist aus extrem hellen Oberflächenabbildungen erschlossen werden. Solche Abbildungen geben, solange es nicht im gesamten Probenbereich zu einer Übersteuerung kommt, zwar noch eine qualitative Aussage über die Ionenbildungseffizienz, quantitativ sind die gezeigten Werte (*total counts*, *maximum counts*) jedoch unterbestimmt.
- **Shiften:** Vibrationen des Messgerätes, induziert etwa durch Bewegungen von Personen im Messraum, können eine minimale Bewegung der Probe im Gerät nach sich ziehen. Geschieht dies im Verlauf einer Messung, so wandert der Primärionenfokus zu einer leicht anderen Probenstelle. Geshiftete Bilder sind somit daran zu erkennen, dass sie unscharf erscheinen. Sie können unter vergleichsweise hohem Aufwand mit Hilfe der Auswertesoftware korrigiert werden.
- **Aufladung:** Unterschiedliche Effekte können zu einer Aufladung der Probenoberfläche führen (vgl. [112]). Die Probenoberfläche lädt sich in der Regel im zentralen Bereich der Abbildung höher auf als in deren Randbereich. Eine solche Aufladung führt dazu, dass Ionen im zentralen Abbildungsbereich mit einer

<sup>1</sup>Zu beachten ist, dass in bisherigen Publikationen zu ToF-SIMS-Untersuchungen von Surfactant-Modellsystemen die Wiederholung von Messungen nicht erwähnt wurde und somit anzunehmen ist, dass hier  $n = 1$  war.



anderen Effizienz in den Flugzeit-Analysator extrahiert werden, als dies am Rand des Abbildungsbereiches der Fall ist. Aufladungserscheinungen können daran erkannt werden, dass am Probenrand ein rechteckiger Rahmen geänderter Ionenausbeute abgebildet wird.

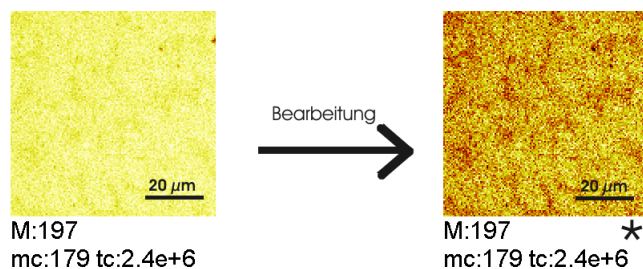
- **Fehlstellen auf Goldträgern:** Fehlstellen auf dem Goldträger führen zu dunklen Flecken in der Oberflächenabbildung der einzelnen Ionen. Solche Fehlstellen haben allenfalls Auswirkungen auf die Oberflächenstruktur der Oberflächenfilme in der näheren Umgebung solcher Fehlstellen. Insbesondere in kontrastarmen Präparationen wurden Fehlstellen enthaltende Oberflächenbereiche gelegentlich bevorzugt abgebildet, da in diesen Bereichen eine Qualitätskontrolle – etwa in Bezug auf das Shiften des Messbereichs – bereits während der Messung möglich ist.

Folgende Artefakte wurden in die Aufsummierung der Messungsanzahl ( $n$ ) nicht einbezogen, da sie qualitativ fehlerhafte Ergebnisse zur Folge haben:

- **Oberflächenfilm-Kollaps:** Gelegentlich wurden Strukturen beobachtet, wie sie in Abbildung 4.8 zu sehen sind: Diese konnten in jedem Fall mit Unregelmäßigkeiten im Isothermenverlauf des Übertrags in Zusammenhang gebracht werden und stellen somit kollabierte Bereiche des Oberflächenfilms dar. Grundsätzlich mag darüber nachgedacht werden, ob mit der Beobachtung solcher Filme ein selektiver Squeeze-Out von Oberflächenmaterial beobachtet werden kann (vgl. Abschnitt 1.6.1), auch wenn dies aufgrund von stark unterschiedlicher Probenmorphologie schwierig werden dürfte.
- **Lagerschäden:** Sehr selten wurden löchrige Oberflächenfilme beobachtet. Diese Beobachtung wurde mit der Lagerzeit dieser Filme in Zusammenhang gebracht. Sie ist vermutlich Folge einer Probendegenerationen.
- **Fehlender Kontrast:** In der Anfangsphase der ToF-SIMS-Messungen wurden in Oberflächenabbildungen sämtlicher Ionen keine Kontraste beobachtet. Dieses zu späteren Zeiten nicht mehr beobachtete Phänomen ist mit fehlerhaften LB-Überträgen erklärbar.

### Bearbeitete Ionenbilder

In seltenen Fällen wurden in dieser Arbeit abgebildete Ionenbilder bearbeitet. Dabei wurde in einem sehr intensiven Ionenbild der minimale Wert der Farbskala nicht der der Intensität 0, sondern einer höheren Intensität zugeordnet. Dies führt zu einer Verschiebung der Farbskala zu dunkleren Farben, die eine visuelle Wahrnehmung der Intensitätsunterschiede vereinfacht (vgl. Abb. 4.9). Ionenbilder, bei denen eine solche Bearbeitung stattfand, wurden mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.



**Abbildung 4.9:** Bearbeitung einer ToF-SIMS Oberflächenabbildung. Links: Unbearbeitete Oberflächenabbildung. Rechts: Identische Oberflächenabbildung nach Anpassung der Farbskala.

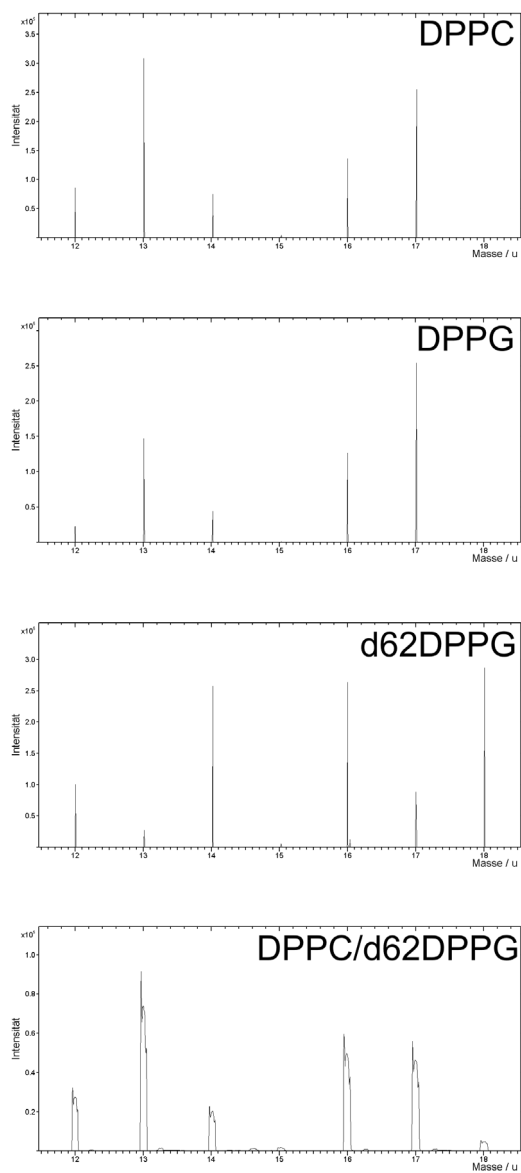
## 4.2 Ergebnisse und Diskussion

### 4.2.1 Massenspektren der Einzelkomponenten

Damit der Einsatz deuterierter Lipide in der massenspektrometrischen Oberflächenabbildung von Lipid/Protein-Präparationen zusätzliche Informationen im Vergleich zum undeuterten System liefern kann, müssen sich undeuterte und deutierte Lipide im ToF-SIMS-Massenspektrum deutlich voneinander unterscheiden lassen. Um zu verdeutlichen, dass dies zutrifft, ist in Abbildung 4.10 exemplarisch ein Vergleich der negativen Massenspektren der Lipide DPPC, DPPG und d62DPPG im Bereich ihrer Fragmentationen von 12 Da bis 18 Da dargestellt. Ein Vergleich des DPPC- und des DPPG-Massenspektrums verdeutlicht das Problem, das sich bei der ausschließlichen Verwendung von undeuterten Lipiden ergibt: Sowohl die erhaltenen Fragmente als auch ihre relativen Intensitäten sind in guter Näherung identisch. Aus den gezeigten Fragmenten kann somit nicht auf die Identität des Lipids zurückgeschlossen werden. Dieses Problem tritt auch bei zahlreichen weiteren Fragmenten im höheren Massenbereich auf (vgl. Anhang B), so dass lediglich bei den Kopfgruppenfragmenten des DPPC sowie bei den Molekülonen beider Lipide eine eindeutige Zuordnung von Ion zu Ursprungsmolekül möglich ist.

Ein anderes Bild liefert ein Vergleich der Massenspektren dieser beiden Moleküle mit dem Massenspektrum des d62DPPG. Während das DPPC- und das DPPG-Spektrum im Wesentlichen Fragmentationen der Massen 12 Da<sup>2</sup>, 13 Da, 14 Da, 16 Da und 17 Da zeigt, liefert die Fragmentierung des d62DPPG ein zusätzliches Fragmentation mit der Masse 18 Da. Auffällig ist die Verschiebung der höchsten relativen Intensitäten von den Massen 13 Da und 17 Da im Fall der DPPC- und DPPG-Massenspektren auf die Massen 14 Da und 18 Da beim d62DPPG-Massenspektrum. Das Signal der Masse 13 Da wird bei den undeuterten Spezies dem Fragmentation  $\text{CH}^-$ , das der Masse 17 Da dem  $\text{OH}^-$  zugeordnet [15]. Die Verschiebung der höchsten relativen Signalintensitäten auf die Massen 14 Da und 18 Da ist somit Folge des

<sup>2</sup>Exakt ausgedrückt wird hier ein Fragment mit dem Masse/Ladungsverhältnis 12 ( $m/z = 12$ ) detektiert. Der hier gewählte Ausdruck „Fragmentation der Masse 12 Da“ enthält somit bereits die Interpretation der Ergebnisse, dass es sich bei dem Ion – wie zumeist in der ToF-SIMS – um ein einfach geladenes Ion handelt. Aus Gründen der Lesbarkeit des Textes wurde diese Interpretation bei allen gezeigten Fragmenten durchgeführt. Dieses Vorgehen stellt ein durchaus übliches Verfahren in der Beschreibung massenspektrometrischer Ergebnisse dar [151].



**Abbildung 4.10:** Vergleich der nSIMS–Massenspektren im Massenbereich zwischen 12 Da und 18 Da. Im *gebunchten* Modus: DPPC, DPPG, d62DPPG. Im *burst alignment* Modus: DPPC/d62DPPG (80:20 mol%).

H → D Austausch, der im Fall des d62DPPG zur Ausbildung der Fragmente CD<sup>-</sup> und OD<sup>-</sup> führt.

Die Verschiebung der Signalintensitäten, wie sie für diesen begrenzten Massenbereich für die verwendeten Lipide im Massenspektrum der negativen Polarität gezeigt wurde, ist in beiden Polaritäten über den gesamten Massenbereich für einen Vergleich unterschiedlich deuterierter Lipide zu beobachten. Die Einzelspektren der Lipide DPPC, d75DPPC, DPPG und d62DPPG, aus denen dies ersichtlich wird, sind im Anhang aufgeführt. Dort finden sich auch das Massenspektrum der negativen (nSIMS) und jenes der positiven (pSIMS) Sekundärionen des SP-B (vgl. Anhang B).

Es sei darauf hingewiesen, dass bei keinem der verwendeten deuterierten Lipide alle Wasserstoffatome durch Deuteriumatome ersetzt wurden. Wasserstoffatome beinhaltende Ionen werden also auch von deuterierten Lipiden gebildet, wie dies im gezeigten Beispiel des d62DPPG durch den Peak der Masse 13 Da (CH<sup>-</sup>) repräsentiert wird (vgl. Abb. 4.10). Andererseits enthalten undeuterte Lipide lediglich im Rahmen der natürlichen Isotopenverteilung Deuterium. Da Deuterium mit einem Anteil von 0,015 % an allen Atomen des Elements Wasserstoff vorliegt [71], sind undeuterte Lipide in guter Näherung deuteriumfrei<sup>3</sup>. Diese beiden Aspekte erklären, warum deuteriumspezifische Fragmente in der Regel bessere Kontraste in den im Weiteren gezeigten Oberflächenabbildungen zeigen als dies bei den entsprechenden undeuterten Isotopomeren der Fall ist.

Zu beachten ist, dass in den seltensten Fällen, wie im zuvor beschriebenen Beispiel die Masse 18 Da im Massenspektrum des d62DPPG, ein Fragment nahezu ausschließlich einer Komponente zuzuordnen ist<sup>4</sup>. Im für die Oberflächenabbildung verwendeten *burst alignment* Modus werden in einer DPPC/d62DPPG-Mischung also beispielsweise die Fragmente CH<sub>2</sub><sup>-</sup> und CD<sup>-</sup> im Ionenbild der Masse 14 Da zusammengefasst (vgl. Abb. 4.10). In jenen verwendeten binären Lipidgemischen, in denen eine Komponente deuteriert vorliegt, werden – wie aus dem im *gebunchten* Modus aufgenommenen Massenspektren hervorgeht – allerdings bestimmte Massen von Fragmentionen einer Lipidkomponente derart stark dominiert, dass eine Zuordnung der Signale dieser Fragmente zu einer Lipidkomponente legitim erscheint. Im beschriebenen Beispiel etwa überwiegt der Anteil der CD<sup>-</sup> Ionen über den der CH<sub>2</sub><sup>-</sup> Ionen.

Die Voraussetzung für eine weitere Verfolgung des Ansatzes, mit Hilfe isotope-markierter Lipide spezifische Protein-Lipid-Wechselwirkungen nachzuweisen, ist somit gegeben: Diese Lipid-Isotopomere lassen sich im Massenspektrum deutlich von undeuterten Komponenten unterscheiden und ermöglichen so die Zuordnung zahlreicher Massenpeaks zu einer Komponente. Im Folgenden ist zu zeigen, dass sich die isotope-markierten Lipide in ihrem Verhalten in Oberflächenfilmen nicht von ihren unmarkierten Isotopomeren unterscheiden.

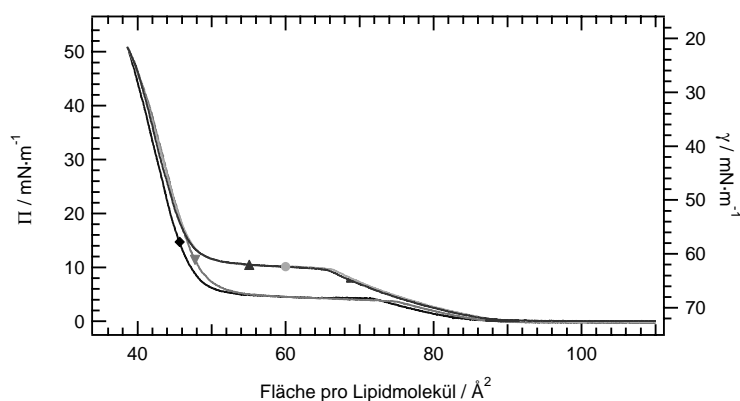
## 4.2.2 Einkomponentenlipidsysteme

### Einfluss des H → D Austausches auf DPPC-Monoschichten

Abbildung 4.11 zeigt die Isothermen der unterschiedlichen zur Verfügung stehenden DPPC-Isotopomere. In allen vier gezeigten Isothermen sind zwei Bereiche mit starker

<sup>3</sup>Der <sup>1</sup>H-Wasserstoff nimmt die restlichen 99,985 % nahezu vollständig ein. Tritium kommt nur ein Spurenanteil an der natürlichen Wasserstoff-Isotopenverteilung zu [71].

<sup>4</sup>Obschon auch in diesem Fall nicht eine ausschließliche Zuordnung des Fragments zu einem Ion möglich ist. Es sei in diesem Zusammenhang z.B. auf das in geringer Ausbeute nachzuweisende Fragment <sup>18</sup>O<sup>-</sup> hingewiesen.



**Abbildung 4.11:** Vergleich der Isothermen unterschiedlich deuterierter DPPC-Isotopomere: ◆ DPPC, ▼ d9DPPC, ▲ d62DPPC, ● d75DPPC ( $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser).

Steigung sowie zwei Bereiche horizontaler Kurvenverläufe erkennbar. Der horizontale Verlauf bei großen molekularen Flächen wird als Phasenübergang  $g/l_e$  interpretiert (vgl. Abschn. 3.1). Dieser horizontale Verlauf endet bei etwa  $85 \text{ \AA}^2$  in einer Steigung der Isothermen, in deren Verlauf das jeweilige System vollständig in der  $l_e$ -Phase vorliegt. Diese Steigung der Kurven hat bei den beiden acylgruppendeuterierten DPPC-Isotopomeren einen längeren, das anschließende, als  $l_e/l_c$ -Phasenübergang identifizierbare Plateau einen kürzeren Verlauf als bei den DPPC-Vertretern mit deuteriumfreien Acylgruppen. Dieser Plateaubereich ist für acylgruppendeuterierte Lipide bei einem Oberflächendruck von etwa  $10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  für die beiden anderen DPPC-Isotopomere dagegen bei etwa  $5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  zu beobachten. Der anschließende identische vertikale Verlauf sämtlicher Isothermen wird als  $l_c$  bzw. festanaloge Phase des Systems interpretiert [101, 6].

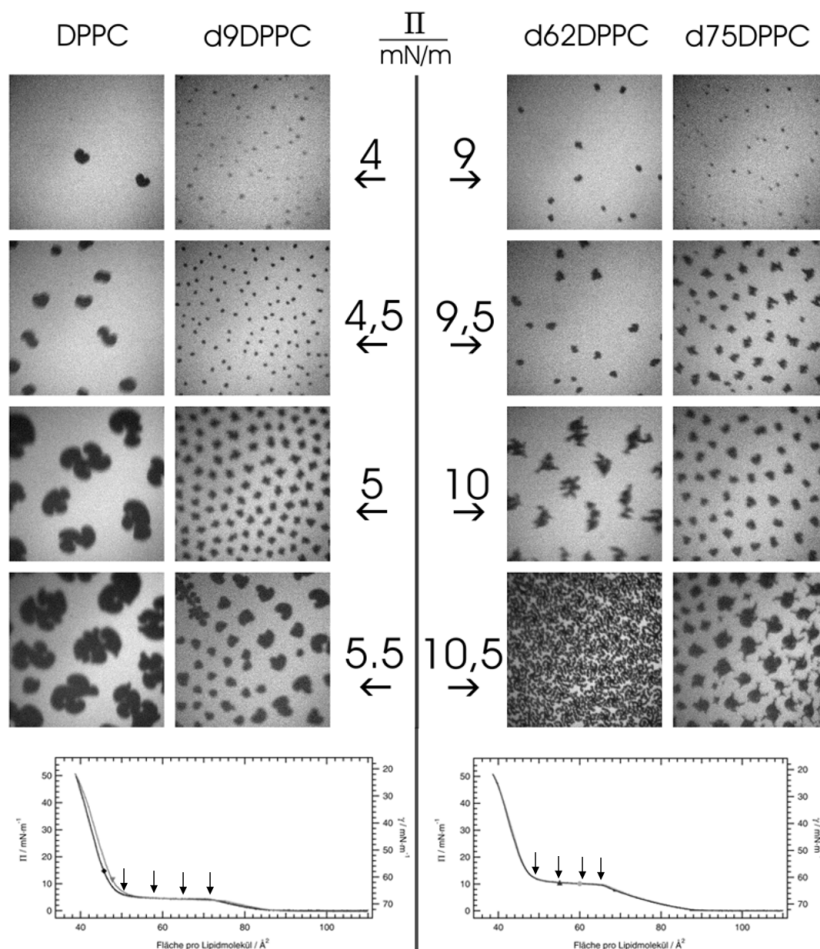
Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (vgl. Abb. 4.12) bestätigen die Interpretation der Isothermen: Für die acylgruppendeuterierten DPPC-Isotopomere ist der  $l_e/l_c$ -Kondensationsprozess bei höheren Oberflächendrücken ( $\Pi \approx 10 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) im Vergleich zu den undeuterierten Lipiden ( $\Pi \approx 5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) nachweisbar. Zudem kondensieren die unterschiedlichen Isotopomere in unterschiedlichen zweidimensionalen Formen.

Zwei der gezeigten DPPC-Isothermen sind literaturbekannt: So konnte die DPPC-Isotherme in dieser Form bereits von ALBRECHT et al. (vgl. Abb. 3.1) [2], die d62DPPC-Isotherme in dieser Form bereits von BALDYGA et al. beobachtet werden [6]. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der DPPC-Monoschicht entsprechen denjenigen Aufnahmen, die beispielsweise WEIS et al. und MA et al. bereits gezeigt haben [179, 98]. Für die übrigen Messungen stehen keine Literaturdaten zur Verfügung.

Der höhere laterale Druck des  $l_e/l_c$ -Koexistenzgebietes der deuterierten DPPC-Isotopomere kann mit deren erhöhter Fluidität erklärt werden: Die kovalente D-C Bindung ( $1,1190 \text{ \AA}$ ) ist geringfügig kürzer als die H-C Bindung ( $1,1199 \text{ \AA}$ ) [92]. Dies korreliert mit geringeren VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen zwischen den Kohlenwasserstoffketten acylgruppendeuterierter Lipide im Vergleich mit jenen Isotopomeren, die keine Deuteriummarkierung in diesem Bereich aufweisen. Die geringeren VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen haben einen erniedrigten Schmelzpunkt des Systems

zur Folge. Dieser Effekt wurde bereits für Lipiddoppelschichten nachgewiesen: Vesikel des acylgruppeneuterierten d62DPPC zeigen sowohl in Differential Scanning Calorimeter Untersuchungen [173, 59] als auch in Raman- und IR-spektroskopischen Untersuchungen [155] eine Phasenumwandlung bei etwa 37 °C. DPPC-Vesikel dagegen haben eine Phasenumwandlungstemperatur von 42 °C. Die Phasenumwandlung von d62DPPC läuft im Vergleich zum DPPC in einem größeren Temperaturintervall ab, was auf eine geringere Kooperativität zurückschließen lässt [59].

Eine Deuterierung der Kopfgruppe spielt demgegenüber für die Einstellung der Phasenumwandlungstemperatur offensichtlich keine Rolle: d13-DPPC zeigt auf der Filmwaage ein analoges Verhalten zu DPPC, und d75DPPC ein analoges Verhalten zu d62DPPC. Einzig der Deuterierungsgrad der Acylgruppen wirkt sich somit auf die Phasenumwandlungstemperatur aus [59].



**Abbildung 4.12:** Fluoreszenzmikroskopischer Vergleich unterschiedlich deuterierter DPPC-Isotopomere im Bereich des  $l_e/l_c$ -Phasenübergangs (v.l.n.r): DPPC; d9DPPC; d62DPPC; d75DPPC ( $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser).

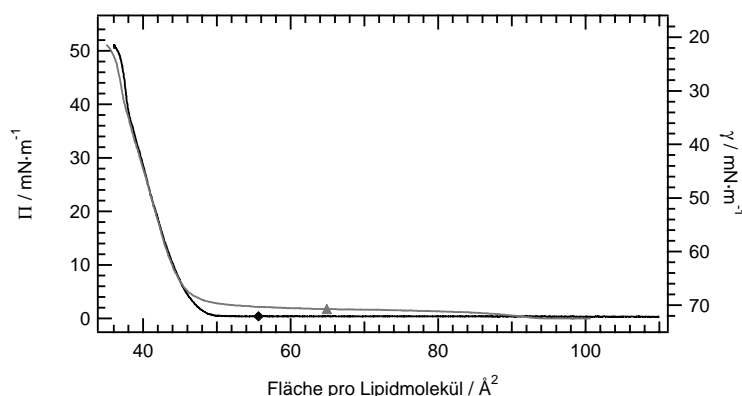
Abweichungen der Geometrie der kondensierten Phasen zwischen den unterschiedlichen Lipiden, wie sie hier fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden konnten, werden in der Regel mit den leicht geänderten intermolekularen Wechselwirkungen erklärt. So bildet beispielsweise das zu dem in der vorliegenden Arbeit verwendete, auch in natürlichen Membranen enthaltene r-DPPC chirale s-DPPC exakt spiegelbildliche nierenförmige Domänen aus [179]<sup>5</sup>. Die hier gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass bereits die geringfügige Änderung der intermolekularen Wechselwirkungen durch den H → D Austausch zu geometrisch unterschiedlichen Kondensationsstrukturen führen.

Für das in dieser Arbeit verfolgte Projekt ist festzuhalten, dass sich Oberflächenfilme des deuterierten und undeuterierten DPPC im Bereich niedriger und hoher Oberflächendrücke analog verhalten. Sie unterscheiden sich allerdings sowohl in Bezug auf den Oberflächendruck ihres  $l_e/l_c$ -Koexistenzgebietes als auch in Bezug auf die geometrische Struktur der kondensierten Bereiche in diesem Bereich der Isotherme.

Im Folgenden ist zu prüfen, inwieweit sich die Isothermen von deuteriertem gegenüber undeuteriertem DPPG ebenfalls unterscheiden. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, welche Markierung zu bevorzugen ist, wenn aus experimentellen Gründen eine Komponente des Systems DPPC/DPPG deuteriert vorliegen muss.

#### Einfluss des H → D Austausches auf DPPG-Monoschichten

Wie schon die acylgruppeneuterierten DPPC-Isotopomere, so zeigt auch das acylgruppeneuterierte DPPG-Isotopomer im Vergleich zur undeuterierten Lipidspezies eine höhere Fluidität (vgl. Abb. 4.13). Erfolgt beim undeuterierten DPPG ein direkter Übergang von gasanaloger zur  $l_c$ -Phase – ein Vorgang der anhand der geringen Kompressibilität der Lipide bei  $48 \text{ \AA}^2$  zu erkennen ist – so ist der d62DPPG-Oberflächenfilm fluider: Vor dem starken Anstieg ( $l_c$ -Phase) bei  $45 \text{ \AA}^2$  erfolgt ein kurzfristiger moderater Anstieg der Isotherme ab  $90 \text{ \AA}^2$ , der einen kurzfristigen Übergang des Systems in die  $l_e$ -Phase vermuten lässt. Die gezeigte Isotherme für DPPG stimmt mit Literaturwerten überein [162]. Entsprechende Literaturwerte für das d62DPPG existieren nicht.



**Abbildung 4.13:** Vergleich der Isothermen unterschiedlich deuterierter DPPG-Isotopomere:  $\blacklozenge$  DPPG,  $\blacktriangle$  d62DPPG ( $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser).

<sup>5</sup>Das einzige Chiralitätszentrum des DPPC ist das zentrale Kohlenstoffatom des Glycerolrückgrats.

Für beide Einzelkomponenten des DPPC/DPPG-Systems gilt demnach, dass ihre acylgruppeneuterierten Isotopomere eine höhere Umwandlungstemperatur aufweisen. Die Verwendung kopfgruppeneuterierter Systeme im Rahmen von ToF-SIMS-Untersuchungen macht im Fall von DPPC keinen Sinn: Die DPPC-Kopfgruppe und ein großer Teil ihrer Fragmente sind im Massenspektrum bereits im undeuterierten Zustand identifizierbar [16]. Das kopfgruppeneuterierte DPPC ist geeignet, um in Absorptionsexperimenten zwischen absorbiertem und bereits zuvor auf die Subphasenoberfläche gespreitem Material unterscheiden zu können – ein experimenteller Ansatz, der in dieser Arbeit nicht mehr verfolgt wurde.

Eine Deuterierung der DPPG-Kopfgruppe ist nicht nur teuer<sup>6</sup> sondern liefert aufgrund der geringen Anzahl der zu deuterierenden Wasserstoffatome der Kopfgruppe auch vermutlich nur wenige von jenen des DPPC unterscheidbare Fragmentationen<sup>7</sup>. Es ist allerdings zu prüfen, ob die Verwendung einer acylgruppeneuterierten Komponente im DPPC/DPPG-Gemisch zu einem abweichenden Phasen- und Mischungsverhalten führt.

### 4.2.3 Zweikomponentensysteme der Lipide: Isothermen und Phasenseparation

Die Überprüfung, ob unterschiedlich deuterierte binäre Lipidgemische ein sich gleichendes Verhalten im Oberflächenfilm aufweisen, wurde mit den Lipidgemischen DPPC/DPPG, DPPC/d62DPPG und d75DPPC/DPPG durchgeführt. In allen Präparationen wurde das Lipidverhältnis von PC:PG auf 80:20 % eingestellt. Auf eine Untersuchung der binären Mischung d62DPPC/DPPG wurde verzichtet, da aufgrund des vergleichbaren Verhaltens der jeweiligen Einzelkomponenten keine wesentlichen Unterschiede gegenüber dem d75DPPC/DPPG-Gemisch erwartet wurden.

#### **Einfluss des H → D Austausches auf DPPC/DPPG-Monoschichten**

Bei Betrachtung der Isothermen der drei Lipidgemische mit einem PC/PG-Anteil von 80:20 % bestätigt sich die Hypothese der Fluidisierung des Systems durch Einbau einer acylgruppeneuterierten Komponente (vgl. Abb. 4.14): Während die Änderung der Steigung der Isotherme des undeuterierten Systems bei einer molekularen Fläche von 60–45 Å<sup>2</sup> erfolgt, erstreckt sich diese bei den beiden teilweise deuterierten Systemen über einen deutlich größeren Bereich molekularer Fläche. Insbesondere das d75DPPC/DPPG-System, bei dem 80 % der Lipide deuteriert vorliegen, weist einen weitreichenden Übergangsbereich zwischen 85–45 Å<sup>2</sup> auf.

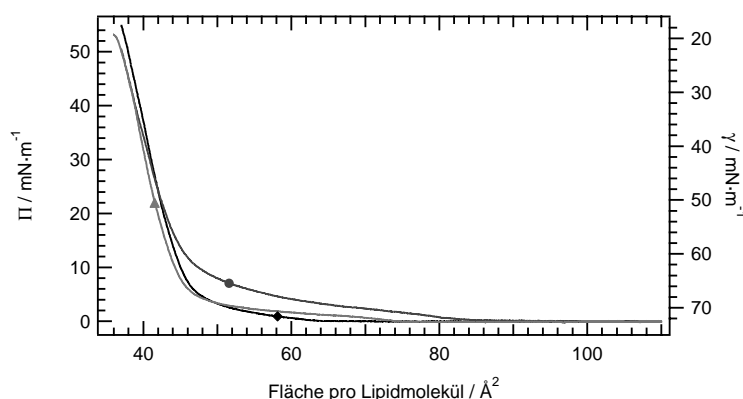
Wie die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (vgl. Abb. 4.15) zeigen, ist dieser Übergangsbereich das Gebiet der Phasenumwandlung von  $l_e$  nach  $l_c$ : In diesem Bereich erfolgt die Ausbildung der kondensierten Domänen, die bei maximal steigendem Kurvenverlauf zu einem komplett kondensierten Film führt. Wie schon für das Einkomponentensystem gezeigt, so unterscheidet sich auch im Fall der Lipidmischungen die Geometrie der ausgebildeten Domänen vermutlich aufgrund geringfügig geänderter intermolekularer Wechselwirkungen.

Die Fluidisierung des binären, teilweise deuterierten Systems wurde bereits von MORSE et al. festgestellt [105]: Sie wiesen in DSC-Untersuchungen nach, dass die Pha-

<sup>6</sup>10 mg d4DPPG kosten bei der Firma Avanti Polar Lipids etwa 1000 \$; 10 mg d62DPPG kosten etwa 50 \$ (Stand: Oktober 2003).

<sup>7</sup>Da die Wasserstoffatome der Hydroxylgruppen im wässrigen Medium austauschbar sind, ist die PG-Kopfgruppe nur mit vier Deuteriumatomen markierbar.





**Abbildung 4.14:** Vergleich der Isothermen von DPPC/DPPG Mischungen unterschiedlicher Isotopomere:  $\blacklozenge$  DPPC/DPPG,  $\blacktriangle$  DPPC/d62DPPG,  $\bullet$  d75DPPC/DPPG ( $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser).

senumwandlungstemperatur in Lipidvesikeln des Systems DPPC/DPPG (80:20) mit  $42^\circ\text{C}$  höher liegt, als die des entsprechenden d62DPPC/DPPG-Systems ( $38,7^\circ\text{C}$ ). Da die Kompression reiner d75DPPC- und d62DPPC-Oberflächenfilme auf der Filmwaage zu identischen Isothermen führen, erscheint ein Vergleich des d62DPPC/DPPG-System MORSES mit dem hier gezeigten d75DPPC/DPPG-System sinnvoll.

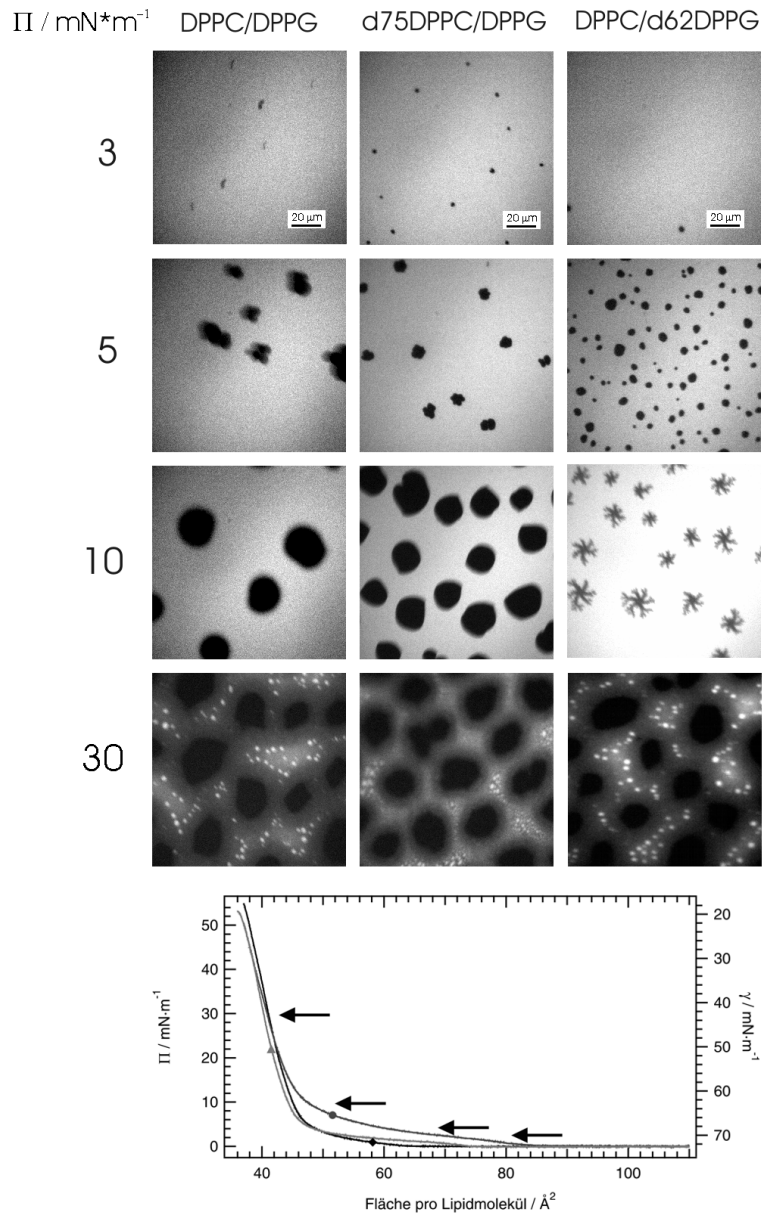
Die Ergebnisse werfen die Frage auf, ob neben den erkannten Unterschieden in Bezug auf die Phasenumwandlungstemperatur und Domänenstruktur auch Auswirkungen auf das Mischungsverhalten der Lipide zu verzeichnen sind.

#### 4.2.4 Zweikomponentensysteme der Lipide: Analyse des Mischungsverhaltens mit Hilfe der ToF-SIMS

Das Mischungsverhalten der Lipide kann in der ToF-SIMS nach Immobilisierung des vollständig kondensierten Oberflächenfilms als festkörperunterstützte Membran nachvollzogen werden. Zudem kann der Kondensationsprozess mit Hilfe der ToF-SIMS nachvollzogen werden, um eine vollständige Kondensation der nachher auf ihr Mischungsverhalten untersuchten Präparationen nachweisen zu können. Auf eine Quantifizierung der Oberflächenfilm-Komponenten in unterschiedlichen Bereichen des Oberflächenfilms wurde in dieser Arbeit verzichtet, da bereits BOURDOS für einen vergleichbaren Oberflächenfilm hohe Standardabweichungen bei diesem Vorgehen beobachtete [15]. Auch in anderen Publikationen wird darauf hingewiesen, dass die qualitativ exzellente ToF-SIMS-Methodik sich nur begrenzt quantitativ einsetzen lässt [89, 65].

#### Massenspektrometrische Beobachtung des Kondensationsprozesses der Lipidgemische

Die Abbildungen 4.16 und 4.17 zeigen ToF-SIMS-Aufnahmen des Kondensationsprozesses des DPPC/DPPG-Oberflächenfilms. Die Oberflächenfilme wurden bei Oberflächendrücken von  $2\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ,  $6\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  und  $30\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  mit Hilfe des LANGMUIR-BLODGETT-Transfers übertragen, und die Desorption negativer (nSIMS, vgl. Abb. 4.16)



**Abbildung 4.15:** Fluoreszenzmikroskopischer Vergleich von DPPC/DPPG-Mischungen (jeweils 80:20 mol%) unterschiedlicher Isotomere (v.l.n.r.): DPPC/DPPG; DPPC/d62DPPC; d75DPPC/DPPG ( $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser).

und positiver (pSIMS, vgl. Abb. 4.17) Sekundärionen wurde unter Primärionenbeschuss detektiert.

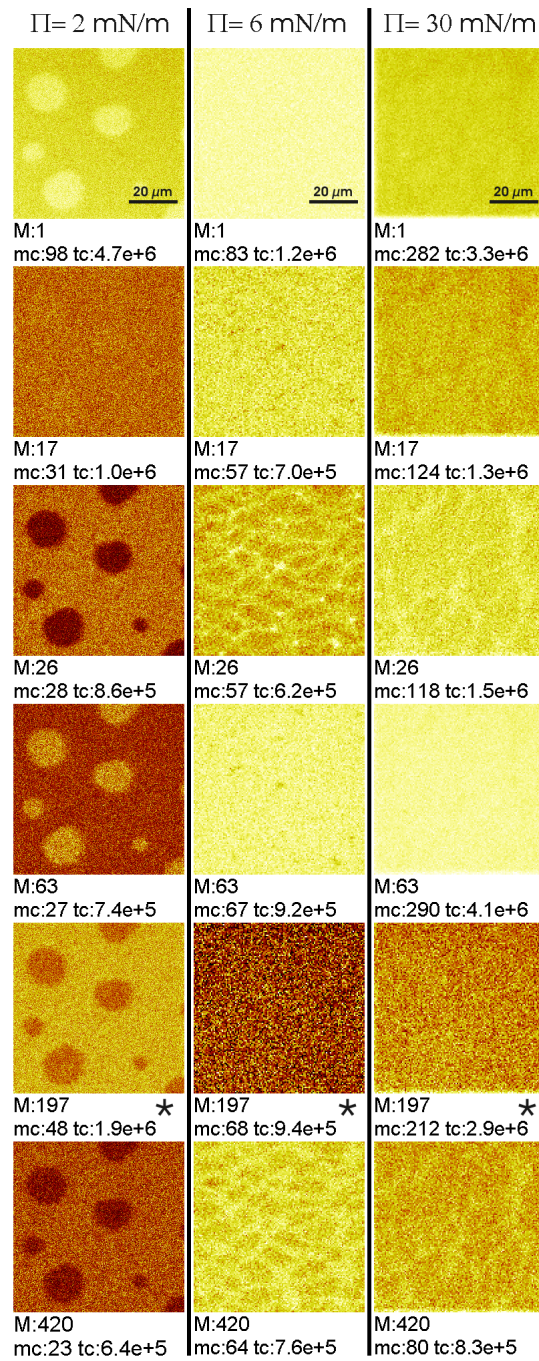
Die festkörperunterstützten Membranen zeigen bei  $6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  und  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  sich gleichende Ionenbilder. Zu erkennen sind in beiden Polaritäten Fragmentionenbilder, die in netzwerkartigen Strukturen eine hohe Signalintensität zeigen, und solche, die in den von diesen Netzwerken umschlossenen Domänen hohe Ionenausbeuten aufweisen. Zur ersten Gruppe gehören die Ionenbilder der Massen 58 Da, 72 Da, 86 Da, 104 Da und 184 Da (pSIMS)<sup>8</sup> sowie 26 Da und 420 Da (nSIMS). Sämtliche dieser Ionen lassen sich Fragmenten des DPPC zugeordnen. Es konnte kein positives Fragmention mit erhöhter Ausbeute in den vom Netzwerk umschlossenen Domänen nachgewiesen werden. In der nSIMS lassen sich dieser Gruppe zum Beispiel die Fragmentionen mit den Massen 17 Da und 63 Da zuordnen. Diese Fragmente werden mit einer größeren Ausbeute vom DPPG gebildet.

Aus den Abbildungen bei Oberflächendrücken von  $6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  und  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  lässt sich schließen, dass der Oberflächenfilm in beiden Fällen ein identisches Phasenverhalten aufweist. Es ist somit anzunehmen, dass der Oberflächenfilm bei beiden Oberflächendrücken kondensiert vorliegt. Dieses Ergebnis des LB-Transfers steht in Widerspruch zu den FLM-Aufnahmen (vgl. Abb 4.15), nach denen der Film bei  $6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  noch fluide Bereiche aufweist, während er bei  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  vollständig kondensiert vorliegt. Dieser Widerspruch wurde bereits in früheren Veröffentlichungen aufgedeckt, sein Ursprung aber nicht geklärt [15]. Denkbar sind sowohl Artefakte während des der ToF-SIMS-Messung vorangehenden LB-Transfers als auch Artefakte aufgrund der Zugabe von Fluoreszenzsonden in der FLM. Ein Abgleich der FLM- und ToF-SIMS-Ergebnisse mit solchen der Brewster-Winkel-Mikroskopie (BAM) könnte vermutlich aufdecken, welchen Kondensationszustand der Oberflächenfilm bei diesem Oberflächendruck einnimmt. Für das in dieser Arbeit verfolgte Projekt ist diese Frage allerdings nicht wesentlich, so dass auf die Durchführung dieser BAM-Messungen verzichtet wurde.

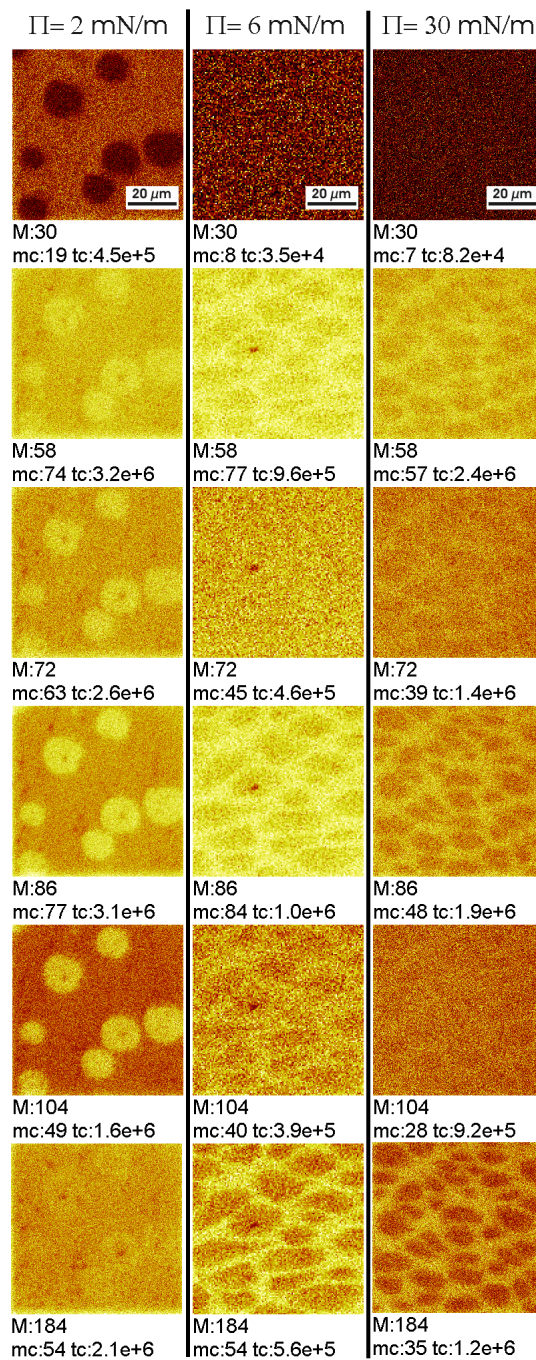
Im Gegensatz zu den Oberflächenabbildungen bei  $6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  und  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  zeigt der Film bei  $2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ein geändertes Verhalten: Es sind runde Domänen zu erkennen, die von einem großflächigen Bereich anderer Ionenausbeute verteilt vorliegen. Eine solche Anordnung von domänenhaltigen zu domänenfreien Bereichen ist aus fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nicht vollständig kondensierter Filme bekannt und wurde für eine Abbildung bei  $2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  erwartet. Allerdings sind die Domänen in der ToF-SIMS mit einem Durchmesser von  $5 - 15 \mu\text{m}$  geringfügig größer als jene, die in der FLM beobachtet werden (Durchmesser:  $2 - 5 \text{ nm}$ ; vgl. Abb 4.15). Die in der ToF-SIMS beobachtete Domänengröße entspricht der in der FLM bei einem Oberflächendruck von  $5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ermittelten. Somit zeigt sich auch bei einem Oberflächendruck von  $2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  der für die Abbildung bei  $6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  diskutierte Unterschied im beobachteten Kondensationsprozess zwischen den Ergebnissen des LB-Transfers und jenen der FLM.

In den Abbildungen bei  $2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (vgl. Abb. 4.16 und 4.17) ist eine Eigenschaft der ToF-SIMS zu erkennen, die eine quantitative Aussage über die Lateralverteilung von Molekülen erschweren kann: der Matrixeffekt. Die Ionisierung und Fragmentbildung einer Molekülspezies hängt von deren Umgebung ab. Beispielsweise desorbieren in einer elektronenreichen Umgebung einige negative Fragmentionen bevorzugt. Die Aussage, dass ein Fragmention oder Quasimolekülion in den Bereichen bevorzugt ge-

<sup>8</sup>Eine Aufstellung der Kontraste der unterschiedlichen – teilweise nicht gezeigten – Oberflächenabbildungen erfolgt für alle in diesem Kapitel vorgestellten ToF-SIMS-Ergebnisse im Anhang (vgl. Abschnitt C).



**Abbildung 4.16:** Beobachtung des Kondensationsprozesses von DPPC/DPPG-Oberflächenfilmen (80:20 mol%) mittels ToF-SIMS im nSIMS-Modus nach LB-Transfer von der Filmwaagensubphase ( $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser). Links:  $\Pi = 2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ( $n = 1$ ); Mitte:  $\Pi = 6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ( $n = 1$ ); rechts:  $\Pi = 30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ( $n = 3$ ). Exemplarisch gezeigt sind die Oberflächenabbildungen der Ionen mit den Massen: 1 Da ( $\text{H}^-$ ), 17 Da ( $\text{OH}^-$ ), 26 Da ( $\text{CN}^-$ ), 63 Da ( $\text{PO}_2^-$ ), 197 Da ( $\text{Au}^-$ ) und 420 Da ( $\text{AuCN}^-$ ).



**Abbildung 4.17:** Beobachtung des Kondensationsprozesses von DPPC/DPPG-Oberflächenfilmen (80:20 mol%) mittels ToF-SIMS im pSIMS-Modus nach LB-Transfer von der Filmwaagensubphase ( $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser). Links:  $\Pi = 2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ( $n = 1$ ); Mitte:  $\Pi = 6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ( $n = 1$ ); rechts:  $\Pi = 30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ( $n = 3$ ). Exemplarisch gezeigt sind die Oberflächenabbildungen der Ionen mit den Massen: 30 Da ( $\text{CH}_4\text{N}^+$ ), 58 Da ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{N}^+$ ), 72 Da ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}^+$ ), 86 Da ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}^+$ ), 104 Da ( $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NO}^+$ ) und 184 Da ( $\text{C}_5\text{H}_{15}\text{PNO}_4^+$ ).

bildet wird, in denen es in größerer Konzentration vorliegt, ist insofern nicht immer korrekt: Beispielsweise sollten bei der erwarteten idealen Mischbarkeit beider Lipide [51] diese in den fluiden Bereichen des gezeigten Oberflächenfilms in geringerer Konzentration vorliegen als in der kondensierten Phase [111]. Die Ionenbilder zeigen zumeist, aber nicht in jedem Fall eine erhöhte Ausbeute in den Domänen: So zeigen die Fragmentionen der Masse 26 Da (nSIMS) und 30 Da (pSIMS) eine erhöhte Ausbeute im Bereich der fluiden Phase. Im Gegensatz dazu zeigt das Fragment mit der Masse 104 Da in der pSIMS eine erhöhte Ausbeute in diesen Domänen. Beide Fragmentionen sind jedoch eindeutig dem DPPC zuzuordnen. Es ist davon auszugehen, dass das Fragment der Masse 104 Da eher der tatsächlichen quantitativen Verteilung des DPPC entspricht als dies etwa bei dem Fragment der Masse 30 Da der Fall ist, da aufgrund der höheren Packungsdichte der kondensierten Phase hier eine erhöhte Lipidkonzentration der sich nahezu ideal mischenden Lipide erwartet wird [111]. Bei der Oberflächenabbildung des Fragmentions der Masse 26 Da erfolgt somit eine Kontrastumkehr, die auf einen Matrixeffekt schließen lässt.

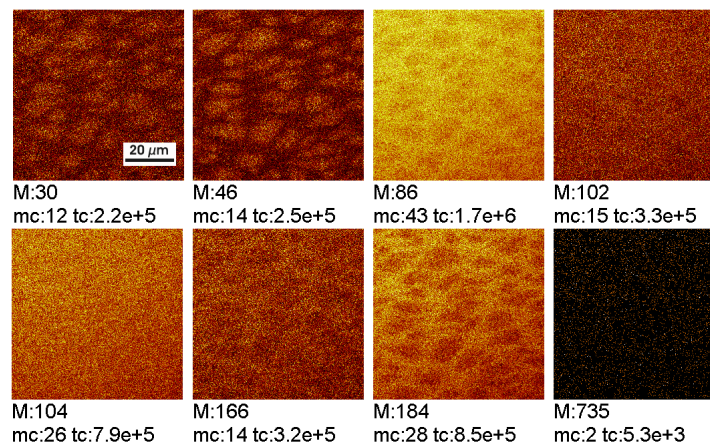
Bei diesem bereits zuvor nachgewiesenen Effekt [15], der bei einigen Fragmentionen im nicht vollständig kondensierten Film zu beobachten ist, ist keine Spezifität für ein Lipid oder eine bestimmte Fragmentposition im intakten Molekül zu erkennen. Im vollständig kondensierten Oberflächenfilm konnte kein solches Artefakt beobachtet werden: Hier zeigen alle Ionen, die einem Molekül zugeordnet werden können, in den gleichen Bereichen eine erhöhte Intensität<sup>9</sup>.

Im Gegensatz zum vollständig kondensierten Oberflächenfilm, bei dem die Lipide in guter Näherung eine identische Umgebung haben und somit die Verteilung der gebildeten Fragmentionen die laterale Verteilung ihrer Ursprungsmoleküle angibt, ist dies bei einem im  $l_c/l_e$ -Koexistenzgebiet präparierten Oberflächenfilm nicht der Fall [101]. Die Umgebung der einzelnen Lipide ist in den beiden verschiedenen Phasen unterschiedlich, die gezeigte Kontrastumkehr in einigen Ionenbildern somit nachvollziehbar.

Das Signal des Fragmentions der Masse 197 Da erweist sich als guter Indikator für das Phasenverhalten der Lipidfilme. Dieses Signal ist dem Gold-Anion ( $\text{Au}^-$ ) zuzuordnen und stellt somit ein Signal des Substrates unterhalb des Lipidfilms dar. Da der Primärionenbeschuss in der ToF-SIMS die Desorption von Ionen bis in Tiefen von 15 nm verursacht [89], ist eine Desorption von atomaren Goldionen und Gold-Clusterionen aus der unter der etwa 2 nm dicken Lipidschicht befindlichen Goldoberfläche nachweisbar [16, 66]. Das  $\text{Au}^-$ -Ion wird bevorzugt in den  $l_e$ -Phasen-Bereichen des Oberflächenfilms bei  $2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , also jenen Bereichen, in denen die Lipiddichte relativ gering ist, gebildet, während es in den vollständig kondensierten Oberflächenfilmen bei  $6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  und  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  nahezu gleich verteilt vorliegt.

Für das in den Abbildungen 4.16 und 4.17 gezeigte Lipidsystem aus DPPC/DPPG (80:20 mol%) sind ToF-SIMS-Daten verfügbar [16]. Diese zeigen bei  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  keinen und bei  $6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  einen mit den hier gezeigten Werten vergleichbaren Kontrast. Es ist möglich, dass die in der Literatur gezeigten Daten bei  $6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  nicht – wie angegeben – einen phasenseparierten, sondern einen bereits vollständig kondensierten Film darstellen. Für diese Annahme spricht zudem, dass für einen phasenseparierten Film nahezu runde Domänen erwartet werden, wie sie hier und in einem System des hydrophoben Surfactantextraktes [66], nicht aber in den zuvor zitierten Daten gezeigt werden konnten. Dafür, dass in den ToF-SIMS-Analysen den Ergebnissen der FLM

<sup>9</sup>Es ist somit auch möglich, jedoch sehr unwahrscheinlich, dass für alle beobachteten Fragmentionen eine Kontrastumkehr vorliegt.



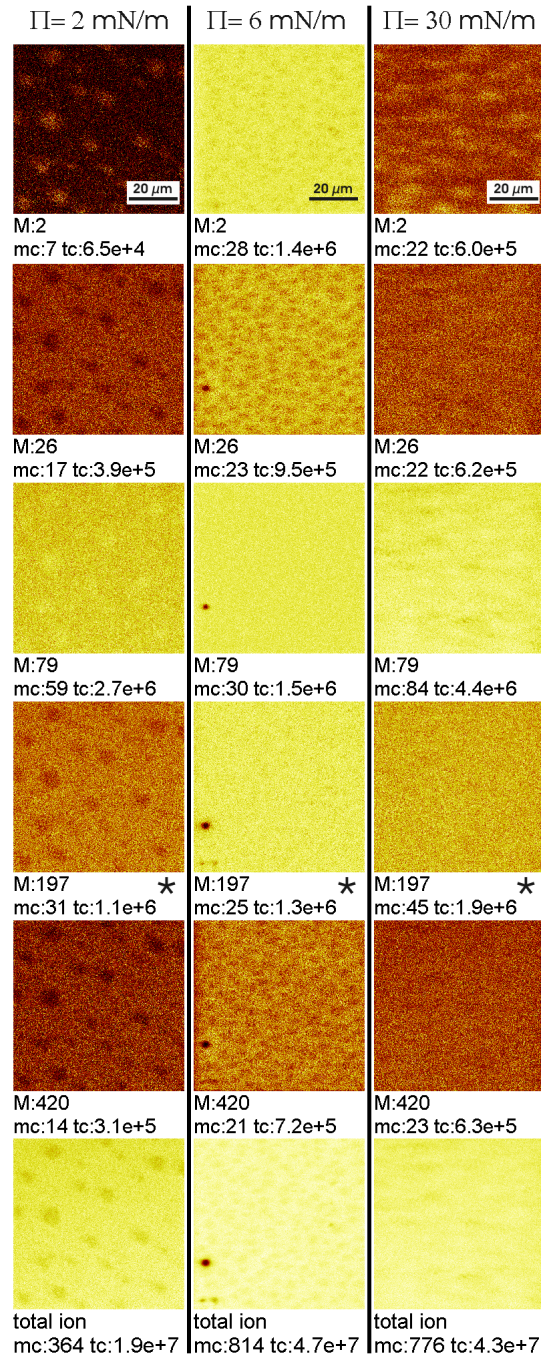
**Abbildung 4.18:** Beobachtung des DPPC/d62DPPG-Oberflächenfilms (80:20 mol%) mittels ToF-SIMS im pSIMS-Modus nach LB-Transfer von der Filmwaagensubphase ( $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser,  $\Pi = 30\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ,  $n = 1$ ). Exemplarisch gezeigt sind die Oberflächenabbildungen der Ionen mit den Massen: 30 Da ( $\text{CH}_4\text{N}^+$ ), 46 Da ( $\text{C}_3\text{D}_5^+$ ), 86 Da ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}^+$ ), 102 Da ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{NO}^+$ ), 104 Da ( $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NO}^+$ ), 166 Da ( $\text{C}_5\text{H}_{13}\text{PNO}_3^+$ ), 184 Da ( $\text{C}_5\text{H}_{15}\text{PNO}_4^+$ ) und 735 Da ( $\text{DPPC}^+$ ).

vergleichbare Abbildungen zu erwarten sind, sprechen zudem die Veröffentlichungen von Analysen des DPPC-Einkomponenten-Systems [90, 17].

Der fehlende Phasenkontrast der Literaturdaten bei  $30\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  konnte in den hier vorgestellten Ergebnissen bei fehlerhaft präparierten Filmen beobachtet werden, insbesondere bei solchen, die auf der Filmwaage in einen hohen Vordruck gespreitet wurden (vgl. Abschn. 4.1.5).

Die Abbildung des DPPC/d62DPPG-Oberflächenfilms (80:20 mol%; vgl. Abb. 4.18 und 4.19) erbringt dem DPPC/DPPG-System (80:20 mol%) vergleichbare Daten. Bei  $2\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  zeigen sich auf eine  $l_e/l_c$ -Koexistenz hinweisende Domänen, die jedoch im Vergleich zum DPPC/DPPG-Oberflächenfilm kleiner und zahlreicher sind. Kleinere und zahlreichere Domänen im Vergleich zum undeuterten System wurden bereits in der FLM beobachtet (vgl. Abb. 4.15). Jedoch entsprechen auch die ToF-SIMS Oberflächenabbildungen des DPPC/d62DPPG-Systems bei  $2\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  mit etwa  $5\ \mu\text{m}$  Durchmesser den in der FLM bei höherem Oberflächendruck ( $5\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) beobachteten. Wie bereits im Fall des DPPC/DPPG-Oberflächenfilms diskutiert, ist auch beim DPPC/d62DPPG-Oberflächenfilm eine Kontrastumkehr bei Ionenbildern dieses nicht vollständig kondensierten Films zu beobachten. Diese trat beispielsweise erneut bei dem DPPC-Fragmentation der Masse 26 Da in der nSIMS auf.

Bei  $6\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  und  $30\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  zeigt auch der DPPC/d62DPPG-Oberflächenfilm eine jeweils vergleichbare laterale Verteilung der Sekundärionenausbeute. Auch dieser Oberflächenfilm scheint somit bereits bei einem Oberflächendruck von  $6\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  vollständig kondensiert vorzuliegen, wie die nSIMS-Oberflächenabbildungen nahelegen (vgl. Abb. 4.19). Wie schon in der Oberflächenabbildung der DPPC/DPPG-Präparation, so werden auch in diesem Fall die netzwerkartigen Strukturen von Fragmentationen des DPPC dominiert (nSIMS: 26 Da, 420 Da), während in den von die-



**Abbildung 4.19:** Beobachtung des Kondensationsprozesses von DPPC/DPPG-Oberflächenfilmen (80:20 mol%) mittels ToF-SIMS im nSIMS-Modus nach LB-Transfer von der Filmwaagensubphase ( $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser). Links:  $\Pi = 2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ( $n = 1$ ); Mitte:  $\Pi = 6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ( $n = 1$ ); rechts:  $\Pi = 30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ( $n = 3$ ). Exemplarisch gezeigt sind die Oberflächenabbildungen der Ionen mit den Massen: 2 Da ( $\text{D}^-$ ), 26 Da ( $\text{CN}^-$ ), 79 Da ( $\text{PO}_3^-$ ), 197 Da ( $\text{Au}^-$ ), 420 Da ( $\text{AuCN}^-$ ) und das Totalionenbild. Das Totalionenbild ist die Oberflächenabbildung sämtlicher detektierter Ionen.



sem Netzwerk umgebenen Domänen bevorzugt d62DPPG-Fragmentionen desorbieren (nSIMS: 2 Da).

Insgesamt sind die Kontraste innerhalb des DPPC/d62DPPG-Oberflächenfilms wie schon im DPPC/DPPG-Oberflächenfilm gering ausgeprägt. Dies spricht für eine gute Mischbarkeit der Lipide innerhalb dieser Systeme. Aufgrund der ausgesprochen schwachen Kontraste wird auf eine Darstellung des DPPC/d62DPPG-Oberflächenfilms im pSIMS-Modus bei  $2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  und  $6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  verzichtet. Bei  $6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  zeigte sich auch im pSIMS-Modus ein Verhalten, wie es bei  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (vgl. Abb. 4.18) zu beobachten ist. Unter beiden Bedingungen können Kontraste in den Domänen für die d62DPPG-spezifischen Fragmentionen der Massen 30 Da und 46 Da sowie in dem diese Domänen umgebenden Netzwerk für die Fragmentionen der Massen 86 Da und 184 Da beobachtet werden. Letztere sind Kopfgruppenfragmente des DPPC. Bei anderen DPPC-Kopfgruppenfragmenten, wie denen der Masse 102 Da, 104 Da und 166 Da, sind derartige Kontraste allenfalls zu erahnen.

Die Oberflächenabbildung des Quasimoleküls des DPPC mit der Masse 735 Da ( $M_{DPPC} = 734,5 \text{ Da}$ ) verdeutlicht das Problem, das eine Abbildung dieser massereichen Ionen mit sich bringt: Pro Rasterpunkt konnten während der etwa halbstündigen Messung maximal zwei Ionen detektiert werden (maximal count, MC), obwohl die Darstellung alle natürlichen Isotopomere des DPPC einschließt. Wie aus anderen in dieser Arbeit gezeigten Abbildung ersichtlich wird, ist für eine interpretierbare Abbildung allerdings mindestens die sieben- bis 15-fache Ionenausbeute erforderlich, die nur durch eine entsprechende Verlängerung der Messzeit erreichbar wird. Dies verdeutlicht den Vorteil der Deuterierung einer Komponente, auch wenn die bisher gezeigten Oberflächenfilme aufgrund der guten Mischbarkeit ihrer Einzelkomponenten kaum Kontraste zeigen konnten.

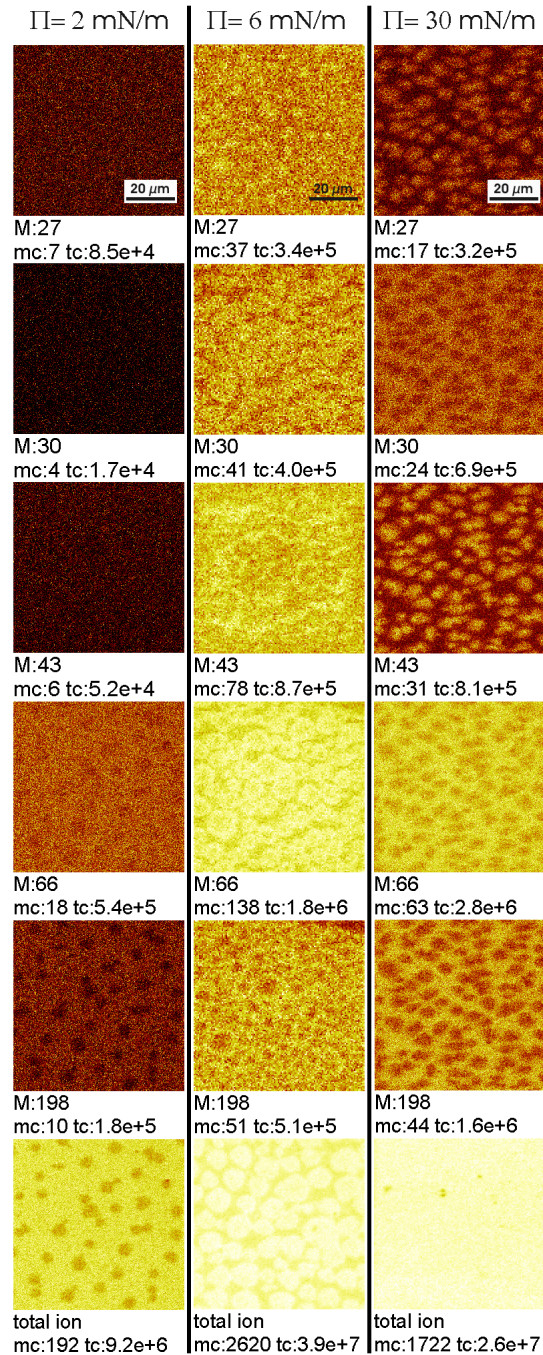
Grundsätzlich ist es verwunderlich, dass in einem vollständig kondensierten Oberflächenfilm aus DPPC/DPPG bzw. aus DPPC/d62DPPG überhaupt Kontraste darstellbar sind. Beide Lipidsysteme sollten eine nahezu ideale Mischbarkeit aufweisen, wie aus DSC-Messungen hervorgeht [51]. Mischen sich die Lipide ideal, so liegen sie innerhalb der vollständig kondensierten festkörperunterstützten Membran nicht nur überall in identischer Konzentration sondern auch in gleicher Umgebung vor. Ein solches Verhalten würde in der ToF-SIMS zu einem vollständigen Ausbleiben des Kontrastes führen. Die ToF-SIMS-Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich DPPC und DPPG zwar nahezu, aber nicht vollständig ideal mischen<sup>10</sup>.

Für den d75DPPC/DPPG-Film zeigt sich ein etwas anderes Bild (vgl. Abb. 4.20 und 4.21): Neben dem bereits bekannten  $l_c/l_e$ -Koexistenzbereich bei  $2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  und dem vermutlich vollständig kondensierten Oberflächenfilm bei  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ist bei  $6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ebenfalls ein Koexistenzbereich von fluiden und festen Oberflächenfilm-Bereichen zu erkennen. Wie schon für die anderen beiden binären Lipidmischungen beobachtet, zeigen in der d75DPPC/DPPG-Präparation bei  $2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  einzelne Ionenbilder eine Kontrastumkehr (z.B. Fragment der Masse 26 Da (nSIMS)<sup>11</sup>), während derartige Präparationen bei  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  erneut das DPPC-Fragmentionen-Netzwerk aufweisen (nSIMS: 2 Da, 18 Da, 26 Da; pSIMS: 30 Da, 198 Da<sup>12</sup>), welches die DPPG-dominierten Domänen (nSIMS: 1 Da, 17 Da; pSIMS 27 Da, 43 Da) umschließt.

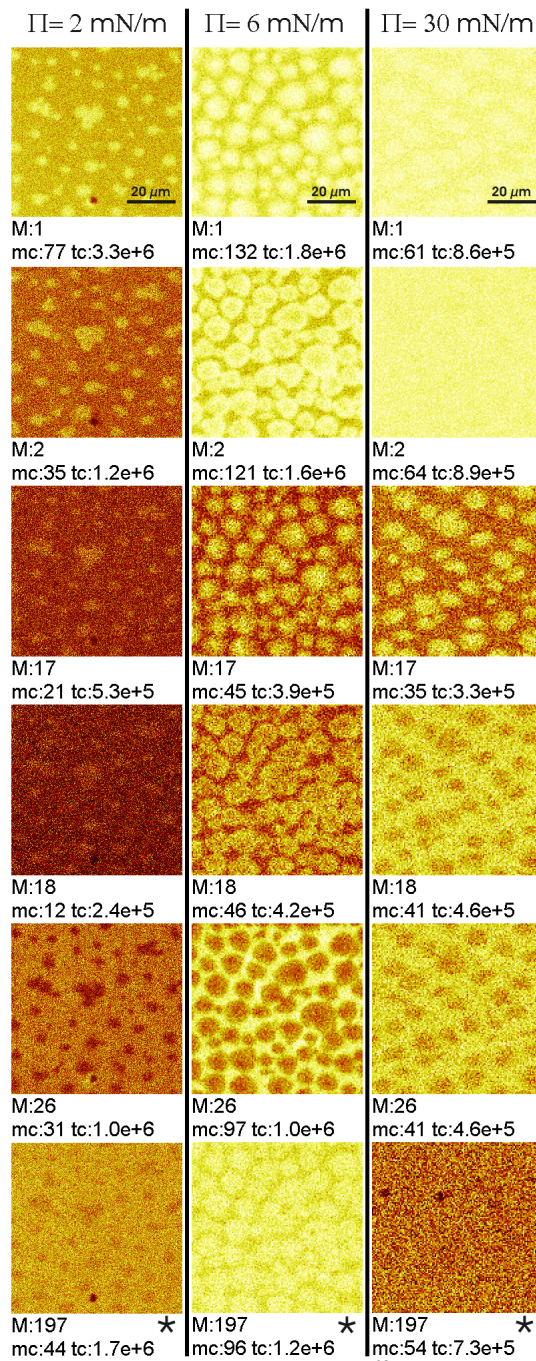
<sup>10</sup>Auch für Mischungen der strukturell nahezu identischen DPPC- und d75DPPC-Moleküle konnte in der ToF-SIMS keine absolut ideale Mischung ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

<sup>11</sup>Zwar zeigt das Fragment der Masse 26 Da auch bei einem Oberflächendruck von  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  die gleiche Verteilung wie bei  $2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ; bei  $2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  liegt d75DPPC jedoch vermutlich in höherer Konzentration in der kondensierten Phase und somit in den Domänen vor. Die Situation entspricht somit der für das undeuterte System beschriebenen.

<sup>12</sup>Dieses deuterierte Fragmention entspricht dem undeuterten Fragmention der Masse 184 Da.



**Abbildung 4.20:** Beobachtung des Kondensationsprozesses von d75DPPC/DPPG-Oberflächenfilmen (80:20 mol%) mittels ToF-SIMS im pSIMS-Modus nach LB-Transfer von der Filmwaagensubphase ( $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser). Links:  $\Pi = 2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ( $n = 1$ ); Mitte:  $\Pi = 6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ( $n = 2$ ); rechts:  $\Pi = 30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ( $n = 3$ ). Exemplarisch gezeigt sind die Oberflächenabbildungen der Ionen mit den Massen: 27 Da ( $\text{C}_2\text{H}_3^+$ ), 30 Da ( $\text{C}_2\text{D}_3^+$ ), 43 Da ( $\text{C}_3\text{H}_7^+$ ), 66 Da ( $\text{C}_3\text{D}_8\text{N}^+$ ), 198 Da ( $\text{C}_5\text{D}_{15}\text{PNO}_4^+$ ) und das Totalionenbild.



**Abbildung 4.21:** Beobachtung des Kondensationsprozesses von d75DPPC/DPPG-Oberflächenfilmen (80:20 mol%) mittels ToF-SIMS im pSIMS-Modus nach LB-Transfer von der Filmwaagensubphase ( $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser). Links:  $\Pi = 2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ( $n = 1$ ); Mitte:  $\Pi = 6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ( $n = 2$ ); rechts:  $\Pi = 30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ( $n = 3$ ). Exemplarisch gezeigt sind die Oberflächenabbildungen der Ionen mit den Massen: 1 Da ( $\text{H}^-$ ), 2 Da ( $\text{D}^-$ ), 17 Da ( $\text{OH}^-$ ), 18 Da ( $\text{OD}^-$ ), 26 Da ( $\text{CN}^-$ ) und 197 Da ( $\text{Au}^-$ ).

Bei  $6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ist darüber hinaus eine weitere Beobachtung möglich: Die festen Domänen des Oberflächenfilms lassen sich in zwei Bereiche unterteilen. Im zentralen Bereich der Domänen werden die Fragmentationen in einer anderen Ausbeute detektiert als an deren Rand. Der zentrale Bereich der Domäne zeigt die Kontraste, die bereits bei  $2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  beobachtbar sind, wohingegen die Ränder eine andere Fragmentationsverteilung aufweisen. Dieses Ergebnis kann so interpretiert werden, dass sich bereits im Kondensationsprozess eine leichte Entmischung der Lipide abzeichnet. Die Ränder der Domänen weisen bereits jene Kontraste auf, die im vollständig kondensierten Film in dem die Domänen umgebenden Netzwerk vorliegen (2 Da, 18 Da), während die Kontraste im Inneren der Domäne auch im vollständig kondensierten Film den Kontrasten der Domäne entsprechen (1 Da, 17 Da).

Die Betrachtung des Ionenbildes der Masse  $197 \text{ Da}$  ( $\text{Au}^-$ ) zeigt, dass dieses Ion zwar weiterhin in guter Genauigkeit die Unterscheidung von  $l_c$ - und  $l_e$ -Phasen indiziert, dass aber im halb kondensierten Film eine Kontrastumkehr stattfindet: In diesem Bereich zeigt dieses Ion überraschenderweise in den kondensierten Bereichen eine höhere Signalintensität.

Zusammengefasst wird aus den gezeigten Daten folgendes Bild deutlich: In allen gezeigten DPPC/DPPG-Mischungen zeigt sich bei  $2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  eine Phasenseparation zwischen  $l_e$ - und  $l_c$ -Phase, die anhand unterschiedlicher Signalintensitäten in den Bereichen der jeweiligen Phase deutlich wird. Dieses Verhalten ist im Fall des d75DPPC/DPPG-Gemisches auch bei  $6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  zu beobachten. Dass dieses Gemisch bei höheren Drücken noch fluider ist als die beiden anderen Systeme, war anhand der Daten der Filmwaageisothermen (vgl. Abb. 4.14) zu erwarten gewesen.

Die kondensierten Oberflächenfilme sämtlicher Systeme weisen in einer domänenartigen Struktur, die vermutlich die zunächst kondensierten Bereiche des Oberflächenfilms ausmachen, einen hohen Anteil an DPPG-Fragmentationensignalen auf. Dieser Anteil ist in dem die Domänen umgebenden Netzwerk in allen Präparationen geringer ausgeprägt. In diesen Bereichen dominieren die DPPC-Fragmentationensignale. Diese Ergebnisse legen nahe, dass zunächst ein Lipidgemisch kondensiert, in dem der DPPG-Anteil höher ist als der eingesetzte 20 %ige Anteil, während erst gegen Ende des Kondensationsprozesses ein Gemisch kondensiert, in dem die Konzentration des DPPG unterhalb dieses Anteils liegt.

Dieses Ergebnis widerspricht nicht den Erwartungen: In DPPC/DPPG-Mischsystemen war eine nahezu ideale Mischung erwartet worden [51], und in der Tat sind die Domänen nicht frei von DPPC-Fragmentationensignalen und die Netzwerke nicht frei von DPPG-Fragmentationensignalen.

Der visuelle Vergleich der Ergebnisse der unterschiedlichen vollständig kondensierten Lipidmonoschichten bei einem Oberflächendruck von  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  lässt vermuten, dass sich das d75DPPC/DPPG-Gemisch stärker entmischt, als dies beim DPPC/DPPG-System der Fall ist. Demgegenüber zeigen das DPPC/DPPG- und das DPPC/d62DPPG-Gemisch ein nahezu identisches Mischungsverhalten. Nicht nur dieser geringfügige Unterschied in der Mischbarkeit der Substanzen spricht dafür, ein DPPC/d62DPPG-Gemisch als teilweise deuteriertes Lipidsystem einem d75DPPC/DPPG-System vorzuziehen: Auch die erwartete Wechselwirkung des SP-B mit dem verwendeten DPPG-Isotopomer (vgl. Abschnitt 1.10) lässt es sinnvoll erscheinen, diese Komponente in der massenspektrometrisch einfacher zu identifizierenden deuterierten Form einzusetzen, wenn deren Eigenschaften sich nicht wesentlich von denen des undeuterierten DPPG-Isotopomers unterscheiden.

#### 4.2.5 Einfluss des H → D Austausches auf DPPG/SP-B-Monoschichten

Abbildung 4.22 zeigt einen Vergleich der Isotherme des DPPC/SP-B-Gemisches mit jener des d62DPPG/SP-B-Gemisches. Beide Isothermen zeigen das aus zahlreichen anderen Lipid-SP-B-Mischungen bekannte Plateau bei etwa  $38 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . Dieses Plateau ist beispielsweise auch in SP-B-haltigen DPPC- [87], DPPC/DPPG- (80:20 mol%) [88], DPPC/POPG- (80:20 mol%) [43] oder auch DPPG/POPG- (75:25 mol%) [159] Oberflächenfilmen zu beobachten. Es indiziert die Ausbildung dreidimensionaler Protein- oder Protein/Lipidaggregate (Protrusions), wie sie in der SFM nachweisbar sind [87, 43, 159]. In diesen Aggregaten ist aus dem Oberflächenfilm ausgeschlossenes Material enthalten, das bei erneuter Expansion des Oberflächenfilms wieder vollständig in diesen inseriert wird. Die Tatsache, dass solche Protrusions unabhängig von dem das Protein umgebenden Lipidsystem gebildet werden, ist ein Hinweis darauf, dass dieser Vorgang möglicherweise nicht von spezifischen Protein-Lipid-Wechselwirkungen abhängig ist.

Für diese Annahme spricht zudem, dass andere amphipathische Peptide ähnliche Plateaubereiche bei diesem Druck ausbilden. So zeigt das  $\gamma_1$ -Peptid des Flock House Virus [70] sowie das gp41-Peptid des Human Immunodeficiency Virus (HIV) [162] ein analoges Verhalten. In beiden Fällen erfolgt der Ausschluss von Material aus unterschiedlichen Monoschichten bei vergleichbaren Oberflächendrücken, welches bei erneuter Expansion teilweise wieder in diesen inseriert wird<sup>13</sup>. Dieses Verhalten konnte zudem bei amphipathischen, n-terminalen Fragmenten des SP-C [109], nicht aber beim Gesamtmolekül beobachtet werden [172]. In dem zuletzt genannten Fall sorgt vermutlich die Transmembrandomäne, die den anderen hier erwähnten Peptiden fehlt, für ein leicht geändertes Verhalten: Protrusions werden erst bei hohen Oberflächendrücken von etwa  $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  beobachtet, die zudem größere Ausmaße annehmen.

Unabhängig davon, ob das gezeigte SP-B-Plateau die Ausbildung wohlgeordneter Lipid-Protein-Ausstülpungen indiziert, oder ob dieses Verhalten lediglich den ungeordneten Ausschluss des Proteins aus dem Oberflächenfilm widerspiegelt, ist dieses Verhalten sowohl für das teilweise deuterierte als auch für das undeuterierte System zu verfolgen. Ein Austausch des DPPG durch d62DPPG hat demnach keine Auswirkung auf diese proteininduzierte Charakteristik der Isotherme. Unterschiede sind hingegen aufgrund des fluidisierenden Effekts des deuterierten Lipids im Bereich der molekularen Fläche von  $55 \text{ \AA}^2$  bis  $110 \text{ \AA}^2$  zu erkennen.

#### 4.2.6 Einfluss des H → D Austausches auf DPPC/DPPG/SP-B-Monoschichten

Im Folgenden ist zu ermitteln, inwieweit die Eigenschaften des teilweise deuterierten Dreikomponentensystem DPPC/d62DPPG/SP-B dem des entsprechenden undeuterierten Systems gleichen. Hierzu werden Filmwaage, Fluoreszenz- und SFM-Messungen durchgeführt.

<sup>13</sup>Für das gp41-Peptid gilt dies in einer Mischung mit DPPG. In einer Mischung mit DPPC ist der Materialausschluss irreversibel.

### Filmwaageuntersuchungen

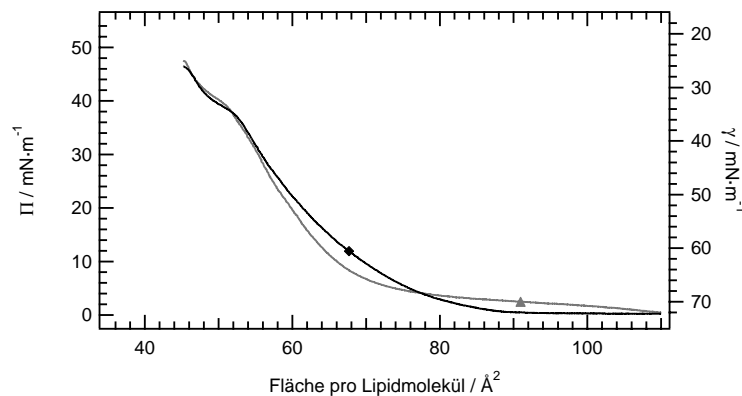
Ein Vergleich der Filmwaageisothermen der Mischungen DPPC/DPPG/SP-B und DPPC/d62DPPC/SP-B (jeweils 80:20:0,4 mol%) ist in Abbildung 4.23 dargestellt. Die Isothermen zeigen einen in guter Näherung übereinstimmenden Verlauf. Im Gegensatz zum reinen Lipidsystem sind die Isothermen der ternären Mischung zu höheren molekularen Flächen verschoben, wie dies bei einer Addition des relativ großen SP-B-Moleküls in den Oberflächenfilm zu erwarten und bereits zuvor gezeigt worden ist [87, 43]. Die abgebildete Isotherme für die undeuterte Mischung entspricht den von KROL et al. gezeigten Daten [87].

Die geringe Verschiebung der DPPC/DPPG/SP-B-Isotherme gegenüber der Isotherme der deuterierten Mischung zu leicht höheren molekularen Flächen ist aufgrund der übereinstimmenden Verläufe der Isothermen der DPPG-Einzelkomponenten nicht zu erwarten. Sie liegt allerdings im Rahmen des erwarteten Fehlers für derartige Messungen.

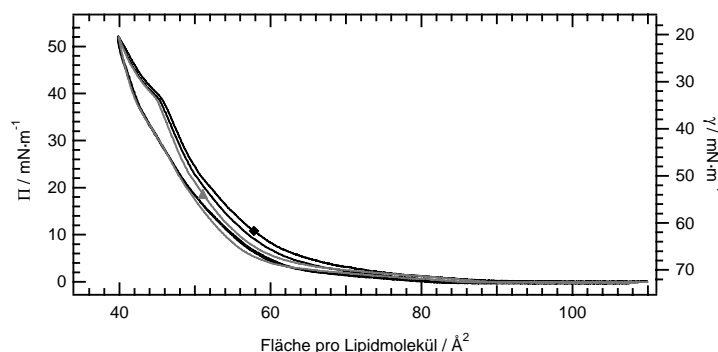
Im Verlauf des Anstiegs beider Isotherme ist ein abrupter Anstieg der Steigung bei etwa  $24 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  auszumachen. Dieser ist möglicherweise auf eine Konformationsänderung des Proteins zurückzuführen.

Auffallend ist zudem das Plateau, das sich ab einem Druck von  $38 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ausbildet. Dieser Kurvenverlauf spiegelt mit seinen beiden Plateaubereichen die bereits für die DPPG/SP-B-Mischung beschriebene Ausbildung von Protrusions wider. Wie in den reinen Proteinisothermen (vgl. Abschn. 2.4) sind somit in den Lipidisothermen zwei Unstetigkeiten im Kurvenverlauf feststellbar. Es ist gut möglich, dass das Verhalten des Proteins des reinen Proteinfilms dem des Proteins im Lipidgemisch entspricht. Dieses könnte als Indiz dafür gewertet werden, dass zur Ausbildung von Protrusions kein Lipid benötigt wird.

Dass das Material der Protrusions bei Expansion (nahezu) vollständig in den Oberflächenfilm eingebaut wird, ist an dem geringen (undeutertes System) bzw. nicht zu detektierenden (deutertes System) Versatz der Isothermen zu geringeren molekularen Flächen bei erneuter Kompression zu erkennen.



**Abbildung 4.22:** Vergleich der Isothermen von DPPG/SP-B-Mischungen unterschiedlicher Isotopomere:  $\blacklozenge$  DPPG/SP-B,  $\blacktriangle$  d62DPPG/SP-B ( $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser). Jedes System wurde zweimal komprimiert und expandiert, wobei lediglich die Kurve des undeuterten Systems bei der zweiten Kompression zu geringeren molekularen Flächen verschoben wurde.

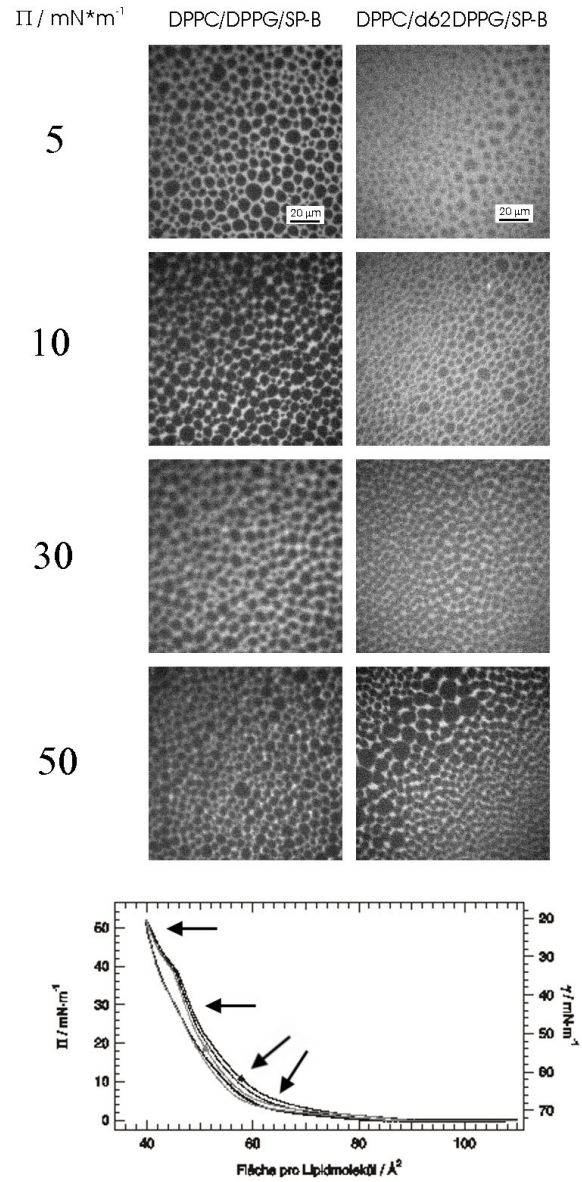


**Abbildung 4.23:** Vergleich der Isothermen von DPPC/DPPG/SP-B-Mischungen unterschiedlicher Isotopomere:  $\blacktriangle$  DPPC/DPPG/SP-B,  $\blacktriangle$  DPPC/d62DPPG/SP-B ( $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser)

### Fluoreszenzmikroskopie

Wie bereits die Filmwaageisothermen, so gleichen sich auch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der DPPC/DPPG/SP-B- sowie der DPPC/d62DPPG/SP-B-Mischungen (80:20:0,4 mol%; vgl. Abb. 4.24). Erscheint das deuterierte System bei  $5\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  noch etwas fluider, so ist bei höheren Drücken kein Unterschied in der Domänenbildung auszumachen. Die Fluidisierung des deuterierten Systems ist, wie schon in den proteinfreien Lipidsystemen, auf die geringeren VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen acylgruppendeuterierter Lipide zurückführbar.

Bei Kompression der Protein/Lipid-Oberflächenfilme bilden sich runde Kondensationsstrukturen aus. Diese runde Geometrie steht in Gegensatz zu den unterschiedlich geometrisch ausgeformten Kondensationsstrukturen der zuvor gezeigten proteinfreien Oberflächenfilme. Bei der Ausbildung der runden Domänen dominiert der Effekt des SP-B, das sich bevorzugt in den Inhomogenitäten an den Phasengrenzen einlagert, wie dies bereits zuvor im undeuterierten System gezeigt werden konnte [88]. Diese Ausbildung runder Kondensationsstrukturen ist eher proteinunspezifisch und wurde zum Beispiel auch für das SP-C beobachtet [171]. Dieses Verhalten deutet auf eine Erhöhung der Linienspannung durch das Protein hin: An der eindimensionalen Phasengrenze zwischen  $l_e$ - und  $l_c$ -Phase gelten vergleichbare Gesetzmäßigkeiten zur zweidimensionalen Phasengrenze, wie sie etwa die Luft-Wasser-Grenzfläche darstellt (vgl. Abschnitt 1.3). Auch diese eindimensionale Phasengrenze strebt beim Fehlen sonstiger Kräfte einen möglichst geringen Phasenkontaktbereich an [101]. Das entgegengesetzte Verhalten, die Verringerung der Linienspannung, welche durch das Ausbilden extrem „ausgefranster“ Domänen ersichtlich wird, wurde etwa für das  $\gamma_1$ -Peptid des Flock House Virus beobachtet [70].



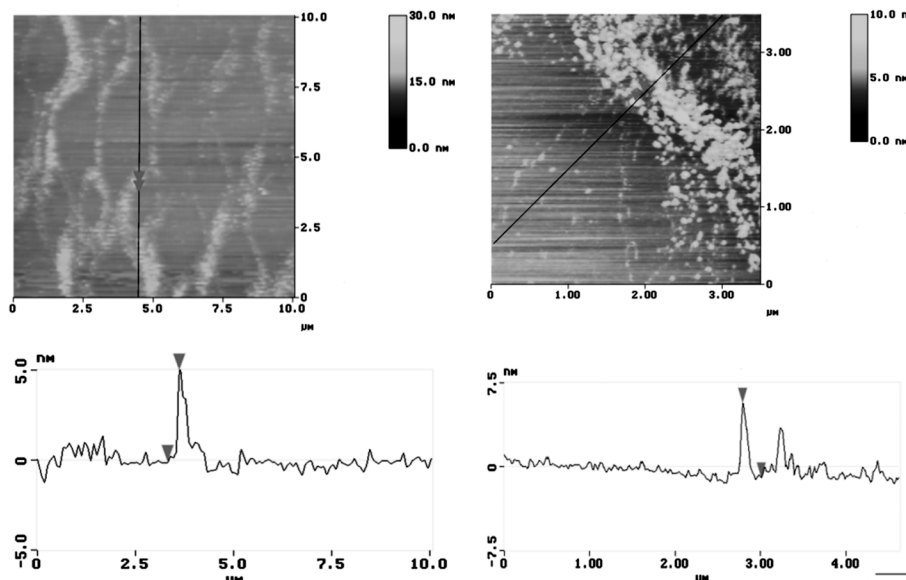
**Abbildung 4.24:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer DPPC/DPPG/SP-B (80:20:0,4 mol%, links) sowie einer DPPC/d62DPPG/SP-B-Präparation (80:20:0,4 mol%, rechts) bei unterschiedlichen Oberflächendrücken ( $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser).



## Rasterkraftmikroskopie

Abbildung 4.25 zeigt SFM-Aufnahmen des deuterierten Systems DPPC/d62DPPG/SP-B (80:20:0,4 mol%) nach LANGMUIR-BLODGETT-Übertrag auf Mica bei einem Oberflächendruck von  $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  von einer Reinstwasser-Subphase. Wie für das un-deuterierte System bekannt [88], so weist auch dieses System dreidimensionale Aggregate unterschiedlicher Höhe auf. Diese Ausstülpungen liegen alle in einer netzwerkartigen Struktur, die vermutlich den zuletzt kondensierten Bereich des Lipidfilms kennzeichnet. Es ist zu vermuten, dass das SP-B sich innerhalb des Kondensationsprozesses in den fluiden Bereichen des Oberflächenfilms aufhält und zuletzt kondensiert. Dieser Entmischungsvorgang erklärt, warum keine Protrusions in den zuerst kondensierten Bereichen zu finden sind.

Die gezeigten Protrusions weisen eine Höhe von 4 nm bzw. 7 nm auf. Entsprechende Protrusions wurden aber auch mit deutlich höheren topographischen Erhebungen (bis etwa 20 nm) beobachtet. Die Varianz der topographischen Erhebungen, die hier und in mehreren anderen Publikationen über dieses und weiterer Lipidsysteme beschrieben wurde [88, 43], spricht gegen die von KROL et al. geäußerte Hypothese hochgeordneter, diskoidaler Ausstülpungen von Lipiddoppelschichten, bei denen das SP-B die Randstruktur der Disken einnimmt. Eine solche Interpretation der Ergebnisse würde nahelegen, dass alle Protrusions eine ähnliche Höhe oder ein Vielfaches dieser ähnlichen Höhe aufweisen. Diese Höhe sollte zudem der Dicke einer Lipiddoppelschicht entsprechen. SP-C-haltige Protrusions, bei denen eine Ausbildung von Lipiddoppelschichten anzunehmen ist, wurden mit Höhenprofilen von 4 nm [44], 5 nm [159] oder 6 nm [172] oder einem Vielfachen des jeweiligen Wertes vermessen. Im Gegensatz dazu



**Abbildung 4.25:** Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen einer DPPC/d62DPPG/SP-B-Präparation (80:20:0,4 mol%). Der Oberflächenfilm wurde bei einem Oberflächendruck von  $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  auf Mica übertragen ( $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser).

weist das Höhenprofil der SP-B haltigen Präparationen eine statistische Höhenverteilung auf [87].

Unabhängig vom Diskussionspunkt des strukturellen Aufbaus der Protrusions bleibt für das in dieser Arbeit verfolgte Projekt festzuhalten, dass die Kompression einer DPPC/d62DPPC/SP-B-Mischung zur Ausbildung von Protrusions führt, die mit denen einer komprimierten DPPC/DPPG/SP-B-Mischung vergleichbar sind. Insofern erscheint die vergleichende Diskussion von ToF-SIMS-Oberflächenabbildungen beider Systeme legitim.

#### 4.2.7 ToF-SIMS-Untersuchungen des undeuterten ternären Systems

**Negative Sekundärionen:** Abbildung 4.26 zeigt die Oberflächenabbildungen von per LANGMUIR-BLODGETT-Transfer bei  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  und bei  $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  übertragenen Oberflächenfilmen im negativen ToF-SIMS-Modus. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu verdeutlichen, wurden je Oberflächendruck zwei Präparationen abgebildet.

Die Fragmentationen der Massen 26 Da, 33 Da und 42 Da zeigen in beiden Fällen eine netzwerkartige Struktur. Eine solche Struktur wurde bereits in der SFM für die Protrusions beobachtet (vgl. Abschn. 4.2.6). Sie entstehen in der Endphase des Kondensationsprozesses eines Lipid-Protein-Oberflächenfilms: Sie stellen somit den zuletzt kondensierten Bereich des Oberflächenfilms dar, wie dies auch in FLM-Aufnahmen ersichtlich ist (vgl. Abschn. 4.2.6) [88]. Die Signale der Massen 26 Da, 33 Da und 42 Da werden den Fragmentationen  $\text{CN}^-$ ,  $\text{SH}^-$  und  $\text{CNO}^-$  zugeordnet. Während die beiden letztgenannten im vorliegenden Fall nahezu ausschließlich vom SP-B gebildet werden, wird das erstgenannte auch vom DPPC gebildet. Die Sekundärionenausbeute wird jedoch von Fragmentationen des Proteins dominiert. Beide Oberflächenabbildungen stützen die These, dass sich das Protein bis zuletzt in den fluiden Bereichen des Oberflächenfilms aufhält und unter Kompression des Oberflächenfilms zuletzt kondensiert. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit Hilfe von fluorosphormarkiertem SP-B in der FLM erhalten [108]. Um die Diskussion der Ergebnisse zu vereinfachen, wird das von diesen Ionen aufgespannte Netzwerk im Folgenden als Proteinnetzwerk bezeichnet. Die Bereiche, die vom Netzwerk umschlossen werden, werden im Folgenden als Domänen bezeichnet.

Die Ionen der Masse 17 Da und 63 Da sind sowohl bei  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  als auch bei  $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  bevorzugt in den Domänen nachzuweisen. Das Fragmentation der Masse 63 Da wird in einem vergleichbaren, SP-C-haltigen Lipidsystem dem Fragment  $\text{PO}_2^-$  zugeordnet [15] und stellt somit ein unspezifisch auf eines der beiden Lipide zurückzuführendes Fragment dar. Wie aus den im Weiteren gezeigten Daten hervorgeht, werden diese Fragmente möglicherweise bevorzugt vom DPPG gebildet.

Auffällig ist der sich umkehrende Kontrast in der Oberflächenabbildung des Ions mit der Masse 97 Da. Ist die Signalintensität dieses Fragmentation in den Oberflächenabbildungen bei  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  noch nahezu gleich verteilt, so zeigt sich bei  $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  eine bevorzugte Desorption dieses Ions im Bereich des Proteinnetzwerkes. Dieses Ion der Masse 97 Da stellt ebenfalls ein unspezifisches Lipidfragmentation ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) dar. Vermutlich sind somit nach Bildung der Protrusions (vgl. Abschnitte 4.2.6) auch in Bereichen, in denen zuvor das Protein dominiert hat, nun in hohem Maße Lipide anzutreffen. Dieser Vorgang ist nachvollziehbar, da davon auszugehen ist, dass sich der Lipidfilm über den aus ihm ausgeschlossenen Protrusions wieder schließt.

Dafür, dass grundsätzlich dreidimensionale Aggregate in der Filmwaage-Präparation vorhanden waren und per LB-Transfer übertragen wurden, spricht ein Vergleich der Verteilung des Fragmentions der Masse bei 197 Da (Daten nicht gezeigt). Diese Masse ist die des  $\text{Au}^-$ -Ions, und die detektierten Fragmentionen stellen somit ein Signal des Substrats dar. Dieses Signal ist bei  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  nahezu gleichverteilt, nimmt aber bei  $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  in den Bereichen ab, in denen im SFM Protrusions nachgewiesen werden. In diesen Bereichen muss das Goldion unter einer um mehrere Nanometer erhöhten Schicht desorbiert werden. Diese Beobachtung zeigt die Oberflächensensitivität der ToF-SIMS-Methode: Wie bereits von HAGENHOFF et al. gezeigt werden konnte, nimmt die Ionenausbeute bei steigender Schichtdicke exponentiell ab [63]. Bereits die geringfügig höhere Überlagerung der Goldoberfläche mit Protrusions führt demnach zu einer geringeren Ausbeute des Substratsignals. Das (negative) Goldionensignal liefert somit in diesem Fall ein Indiz für die Topographie der Probe.

**Positive Sekundärionen:** Die Ergebnisse für die negativen Sekundärionen des DPPC/DPPG/SP-B-Systems können im positiven Modus bestätigt werden (vgl. Abb. 4.27).

Die Protein-spezifischen Fragmente der Massen 44 Da und 70 Da bilden sowohl bei  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  als auch bei  $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  ein Netzwerk aus, das auf den Aufenthalt des Proteins in den zuletzt fluiden Bereichen des Oberflächenfilms hindeutet.

Topographische Effekte können im positiven Modus nicht beobachtet werden, da die Goldionensignale bei einer Masse von 197 Da ( $\text{Au}^+$ ) sehr stark übersteuert sind.

Überraschend ist die Akkumulation der DPPC-spezifischen Kopfgruppenfragmente der Massen 86 Da, 104 Da, 166 Da und 184 Da im Bereich des Proteinnetzwerkes bei  $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . Wird von einer spezifischen PG/SP-B-Wechselwirkung ausgegangen, so wäre zu erwarten gewesen, dass sich die DPPC-Kopfgruppenfragmente bevorzugt in den Domänen, nicht aber im Bereich des Proteinnetzwerkes nachweisen lassen.

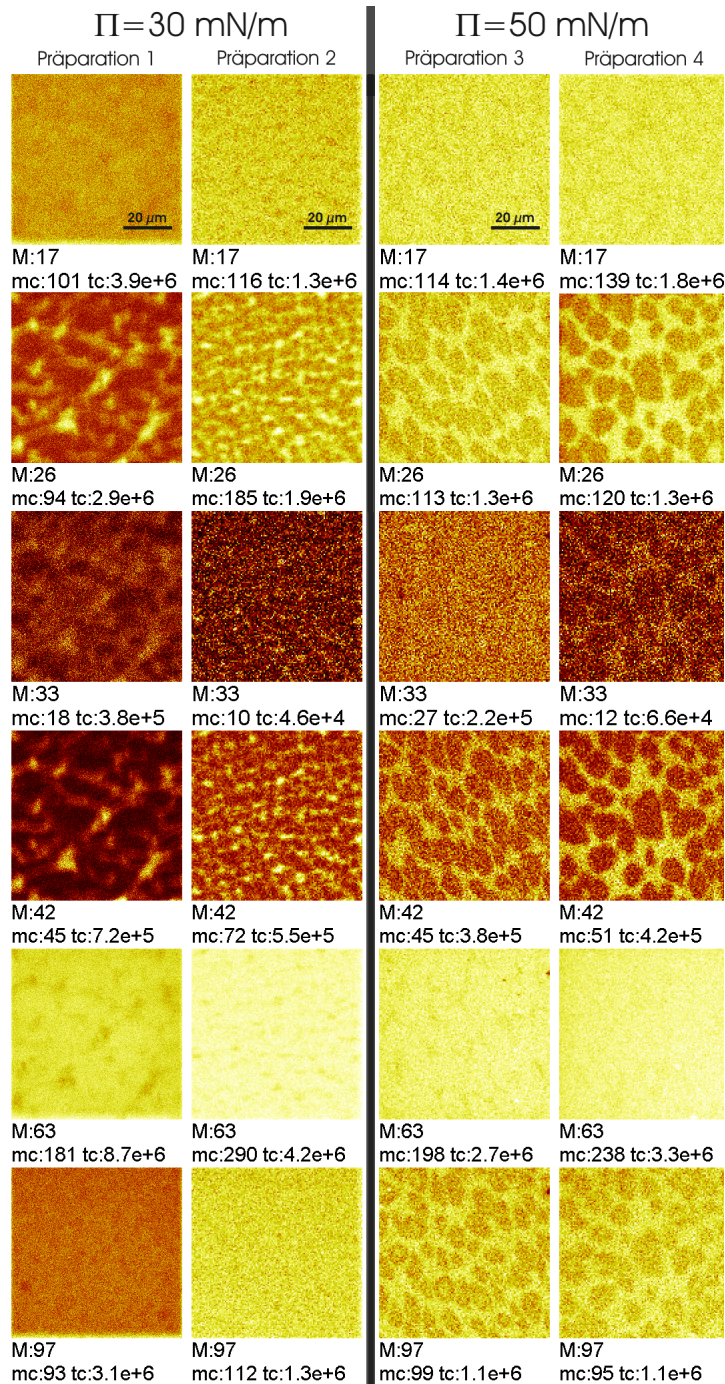
## Diskussion

Drei Aspekte bleiben aus dem zuvor Beschriebenen festzuhalten:

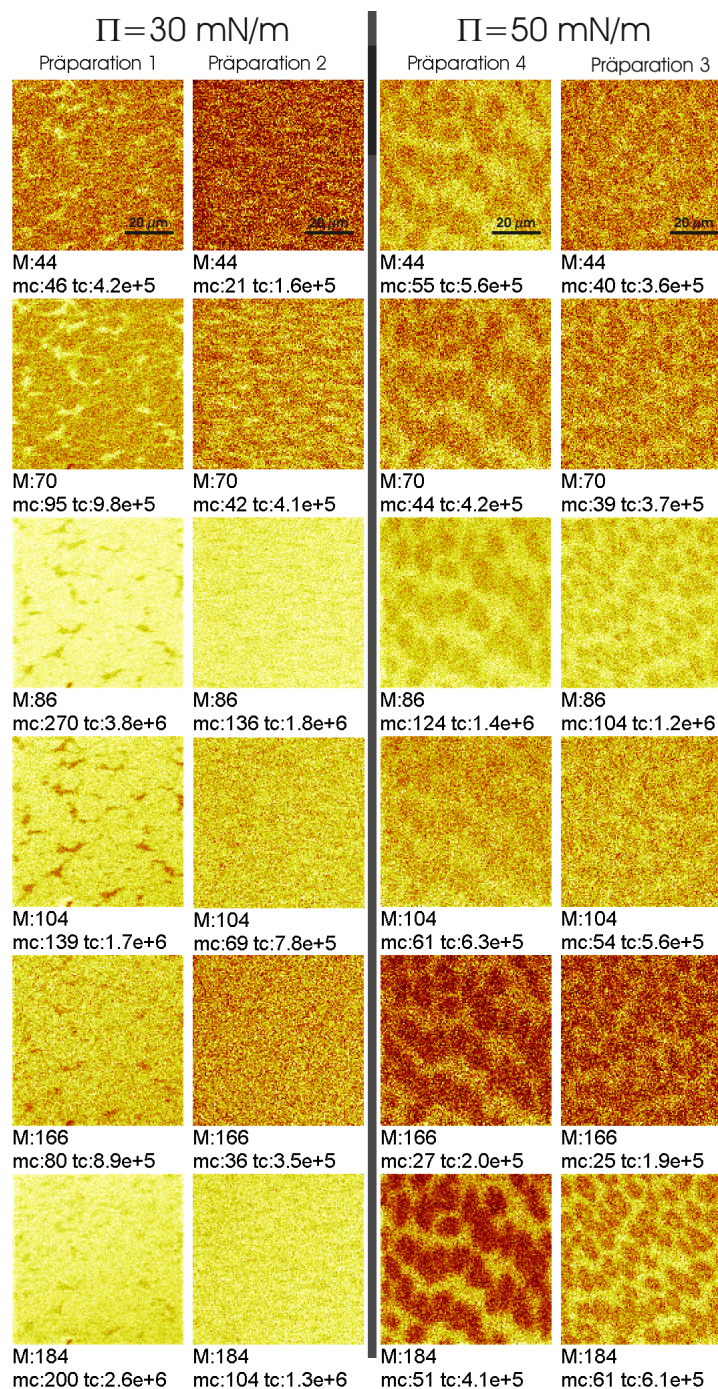
Zum einen erscheint eine Aussage über die Topographie des Films anhand der Verteilung des  $\text{Au}^-$ -Ions möglich. Diese Verteilung ermöglicht somit eine Qualitätskontrolle der LB-Überträge für die im Weiteren gezeigten Experimente.

Des Weiteren sind bei  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , nicht aber bei  $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  Bereiche nachweisbar, die fast ausschließlich proteinspezifische Ionen desorbieren. Diese Bereiche, in denen bei weiterer Kompression die Protrusions gebildet werden, sind vermutlich abgereichert in Bezug auf ihren Lipidgehalt. Dies mag als Indiz dafür gewertet werden, dass die Protrusions im Fall des SP-B weniger geordnete Lipid-Protein-Aggregate sind, sondern vielmehr einen bevorzugten Ausschluss von SP-B ohne oder mit sehr wenig Lipid darstellen.

Außerdem sind die Kopfgruppenfragmente des DPPC bei  $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  bevorzugt im Bereich des Proteinnetzwerkes zu beobachten. Dieser letzte Punkt ist ausgesprochen überraschend, da diese Fragmente bevorzugt in maximaler Entfernung zum Protein und somit in den Domänen erwartet wurden. Allerdings sind alle Ionen, bei denen eine Unterscheidung zwischen DPPC und DPPG möglich ist, Fragmentionen der DPPC-Kopfgruppe. Es wäre demnach denkbar, dass es sich bei diesen Signalen um Artefakte handelt: Da die Umgebung der DPPC-Moleküle nicht an jeder Stelle der festkörperunterstützten Membran die gleiche ist, mag eine Ionisation von Kopfgruppenfragmenten an den topographisch erhöhten Protrusions bevorzugt ablaufen.



**Abbildung 4.26:** Beobachtung des DPPC/DPPG/SP-B-Oberflächenfilms (80:20:0,4 mol%) mittels ToF-SIMS im nSIMS-Modus nach LB-Transfer von der Filmwaagensubphase ( $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser, jeweils  $n = 3$ ). Links, Mitte links:  $\Pi = 30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ; Mitte rechts, rechts:  $\Pi = 50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . Exemplarisch gezeigt sind die Oberflächenabbildungen der Ionen mit den Massen: 17 Da ( $\text{OH}^-$ ), 26 Da ( $\text{CN}^-$ ), 33 Da ( $\text{SH}^-$ ), 42 Da ( $\text{CNO}^-$ ), 63 Da ( $\text{PO}_2^-$ ) und 97 Da ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ).



**Abbildung 4.27:** Beobachtung des DPPC/DPPG/SP-B-Oberflächenfilms (80:20:0,4 mol%) mittels ToF-SIMS im pSIMS-Modus nach LB-Transfer von der Filmwaagensubphase ( $\vartheta = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser, jeweils  $n = 3$ ). Links, Mitte links:  $\Pi = 30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ; Mitte rechts, rechts:  $\Pi = 50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . Exemplarisch gezeigt sind die Oberflächenabbildungen der Ionen mit den Massen: 44 Da ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{N}^+$ ), 70 Da ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+$ ), 86 Da ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}^+$ ), 104 Da ( $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NO}^+$ ), 166 Da ( $\text{C}_5\text{H}_{13}\text{PNO}_3^+$ ) und 184 Da ( $\text{C}_5\text{H}_{15}\text{PNO}_4^+$ ).

Um eine Aussage darüber erhalten zu können, ob auch die Acylgruppenfragmente des DPPC in diesen Bereichen bevorzugt desorbieren und an welchen Stellen bevorzugt DPPG-Fragmentationen desorbieren, ist eine Deuterierung der DPPG-Fragmente sinnvoll.

#### 4.2.8 ToF-SIMS-Untersuchungen des deuterierten ternären Systems

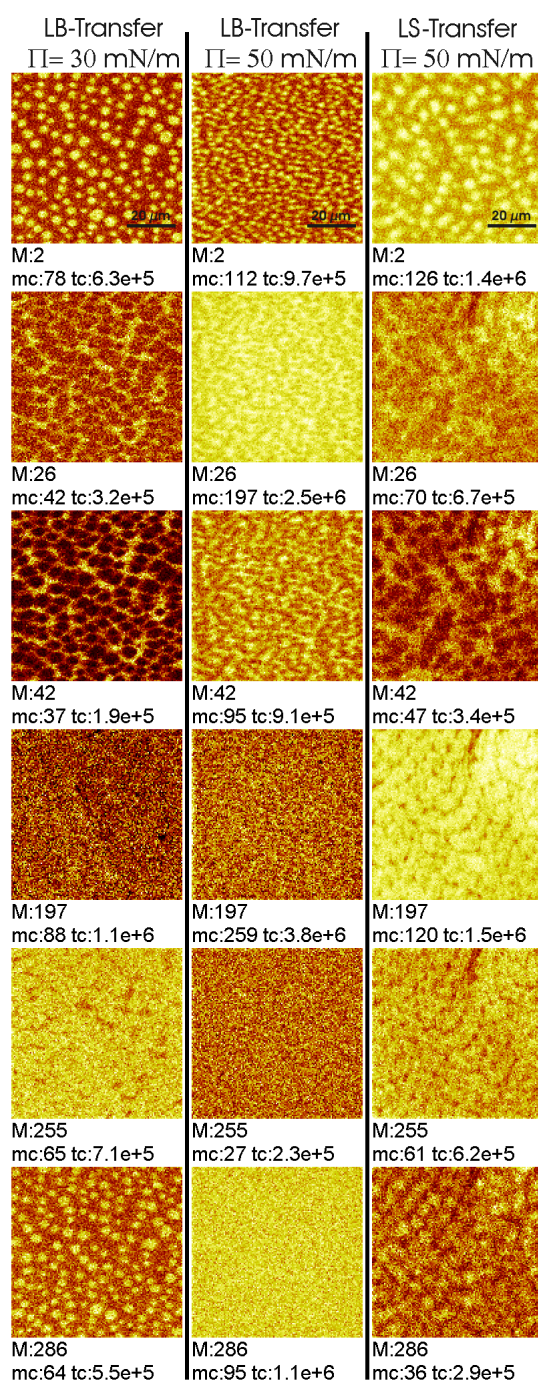
Abbildung 4.28 gibt die Oberflächenabbildungen des teilweise deuterierten Surfactant-Modellsystems wieder. In dieser Abbildung sind DPPG- und DPPC-spezifische Fragmentationen unterscheidbar. Es bestätigt sich der Eindruck, der aus dem undeuterierten System zu gewinnen ist: Das Proteinnetzwerk – beispielhaft sind die Fragmentationen der Massen 26 Da und 42 Da gezeigt – wird bei einem hohen Oberflächendruck von Fragmentationen des DPPC überlagert (Masse von 255 Da). Im Gegensatz dazu dominieren in den Domänen die Fragmentationen des deuterierten d62DPPG, wie dies in Abbildung 4.28 beispielhaft anhand der Oberflächenabbildungen der Fragmentationen mit den Massen 2 Da und 286 Da zu sehen ist. Auch im deuterierten System sind topographische Eigenschaften des Oberflächenfilms anhand des Fragmentationensignals der Masse 197 Da zu entschlüsseln.

Aus den im vorangehenden Abschnitt diskutierten Eigenschaften sowohl der ToF-SIMS als auch der verwendeten Surfactant-Modellsysteme ergibt sich folgende Überlegung: Die ToF-SIMS ist, wie aus den Ergebnissen der Oberflächenabbildung für das Au<sup>-</sup>-Ion ersichtlich, eine ausgesprochen oberflächensensitive Methode. Für LB-Oberflächenfilme wird von einer Desorption von Molekülen bis hin zu einer Tiefe von maximal 15 nm ausgegangen [89]. Das SP-B scheint während des Kompressionsvorganges aus dem Oberflächenfilm ausgeschlossen zu werden und dabei Protrusionen zu formen, die teilweise deutlich höher sind als 15 nm [88]. Sollte d62DPPG selektiv mit einer Teilmenge des SP-B aus dem Oberflächenfilm ausgeschlossen werden, so könnten dessen Fragmente unter Umständen nicht bestimmt werden, da sie möglicherweise aus den obersten Monoschichten vollständig ausgeschlossen wurden. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde ein LANGMUIR-SCHÄFER-Übertrag vorgenommen, der zu einer Präparation führt, in der die ursprünglich der Subphase zugewandte Seite zur Luftseite orientiert vorliegt. Auch in diesen, in der dritten Spalte der Abbildung 4.28 gezeigten Proben konnte eine identische Verteilung im Vergleich zum LANGMUIR-BLODGETT-Transfer nachgewiesen werden, auch wenn sich diese Übertragungsmethode insgesamt durch eine geringere Übertragungseffizienz auszeichnete.

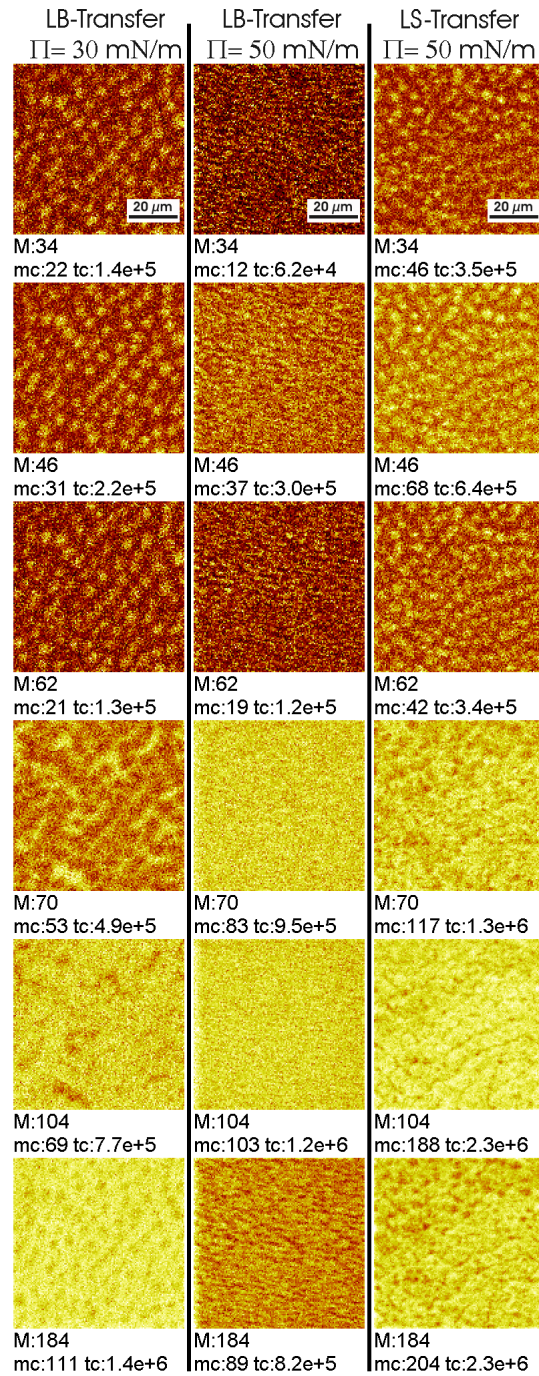
Die Unterschiede der Oberflächenabbildungen zwischen den Präparationen bei  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  und  $50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  sind vermutlich größtenteils auf Effekte der Protrusionausbildung, nicht aber auf Diffusionseffekte zurückzuführen: Schon bei  $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  wird anhand der Filmwaage-Isotherme ein vollständig kondensierter Film erwartet. Eine massive Diffusion ist in einem solchen Film nicht mehr zu erwarten (vgl. Abschnitt 3.1).

Abbildung 4.29 zeigt Oberflächenabbildungen einiger positiver Fragmentationen des DPPC/d62DPPG/SP-B-Systems. Die Ergebnisse der Messungen im nSIMS-Modus können mit diesen und den weiteren nicht gezeigten Ionenbildern bestätigt werden: Die Domänen werden von d62DPPG-Fragmentationen (34 Da, 46 Da und 62 Da) dominiert, während DPPC-Fragmentationen (104 Da und 184 Da) bei hohen Oberflächendrücken im Bereich des erwarteten Proteinnetzwerkes (70 Da) gebildet werden, in denen sie bei niedrigen Drücken nicht in diesem Maße nachzuweisen sind.

Diese Ergebnisse sind, wie schon im nSIMS-Modus, auch in der pSIMS für beide Übertragungsarten (LB- und LS-Übertrag) identisch.



**Abbildung 4.28:** Beobachtung des DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilms (80:20:0,4 mol%) mittels ToF-SIMS im nSIMS-Modus nach Transfer von der Filmwaagensubphase ( $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser jeweils  $n = 3$ ). Links:  $\Pi = 30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , LB-Transfer; Mitte:  $\Pi = 50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , LB-Transfer; rechts:  $\Pi = 50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , LS-Transfer. Exemplarisch gezeigt sind die Oberflächenabbildungen der Ionen mit den Massen: 2 Da ( $\text{D}^-$ ), 26 Da ( $\text{CN}^-$ ), 42 Da ( $\text{CNO}^-$ ), 197 Da ( $\text{Au}^-$ ), 255 Da ( $\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{O}_2^-$ ; Palmitat) und 286 Da ( $\text{C}_{16}\text{D}_{31}\text{O}_2^-$ , deuteriertes Palmitat).



**Abbildung 4.29:** Beobachtung des DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilms (80:20:0,4 mol%) mittels ToF-SIMS im pSIMS-Modus nach Transfer von der Filmwaagensubphase ( $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser, jeweils  $n = 3$ ). Links:  $\Pi = 30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , LB-Transfer; Mitte:  $\Pi = 50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , LB-Transfer; rechts:  $\Pi = 50 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ , LS-Transfer. Exemplarisch gezeigt sind die Oberflächenabbildungen der Ionen mit den Massen: 34 Da ( $\text{C}_3\text{D}_5^+$ ), 46 Da ( $\text{C}_3\text{D}_5^+$ ), 62 Da ( $\text{C}_4\text{D}_7^+$ ), 70 Da ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+$ ), 104 Da ( $\text{C}_5\text{H}_14\text{NO}^+$ ) und 184 Da ( $\text{C}_5\text{H}_15\text{PNO}_4^+$ ).

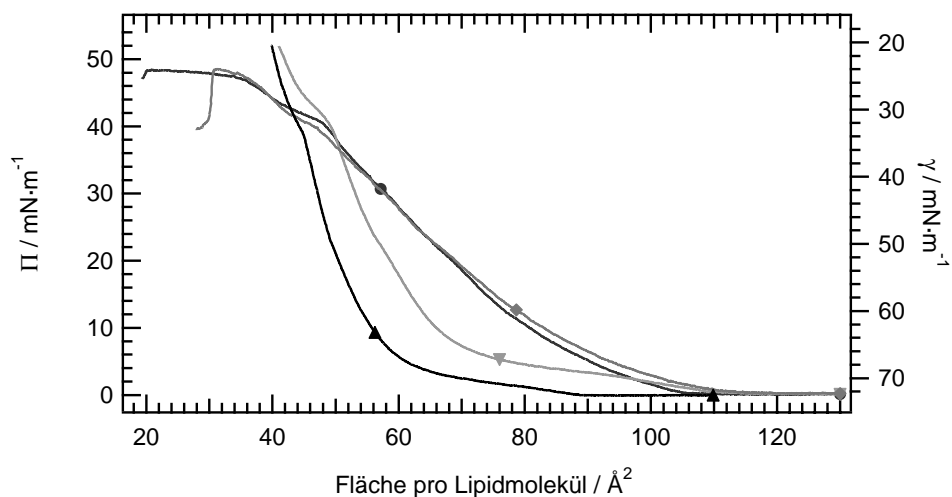


#### 4.2.9 Das deuterierte ternäre System unter variierten Rahmenbedingungen

Da die ToF-SIMS-Ergebnisse der Untersuchungen auf einer Reinstwasser-Subphase keine Wechselwirkung des SP-B mit PG zeigen konnten, stellt sich die Frage, inwieweit die Temperatur oder auch mono- und divalente Ionen einen Einfluss auf das Verhalten des Modellsystems haben. Zu diesem Zweck wurden Oberflächenfilme von einer sowohl natrium- als auch calciumhaltigen Subphase präpariert. Darüber hinaus wurden bei einer Temperatur von 37 °C Oberflächenfilme sowohl auf einer Reinstwasser- als auch auf einer natrium- und calciumhaltigen Subphase untersucht. Für alle drei in diesem Abschnitt vorgestellten Randbedingungen wurden experimentell die Filmwaageisothermen ermittelt und ToF-SIMS-Oberflächenabbildungen erstellt.

#### Das deuterierte ternäre System: Isothermen bei variierten Rahmenbedingungen

Abbildung 4.30 zeigt vier Filmwaageisothermen der DPPC/d62DPPG/SP-B-Mischung unter unterschiedlichen Rahmenbedingungen. Neben der aus Abbildung 4.23 bekannte Isotherme bei 20 °C auf Reinstwasser ist unter anderem eine Isotherme bei gleicher Temperatur auf einer natrium- und calciumhaltigen Subphase gezeigt. Wie dies bereits für das undeuterierte System gezeigt wurde, sorgt eine salzhaltige Subphase für eine Verschiebung der Isotherme zu höherer molekularer Fläche [87]. Diese Verschiebung der Isotherme zu höherer molekularer Fläche wird auf einen erhöhten Platzbedarf des DPPG zurückgeführt: Die negativ geladenen Kopfgruppen dieses Lipids werden über Calcium-Kationen verbrückt, was zu einer Aufspreizung der Acylreste des Lipids führt. Dieser Vorgang wird zudem als Auslöser für eine Entmischung der beiden Lipide angesehen [87].



**Abbildung 4.30:** Isothermen der DPPC/DPPG/SP-B-Oberflächenfilme (80:20:0,4 mol%) auf unterschiedlichen Subphasen: ▲  $\vartheta = 20\text{ °C}$ , Subphase: Reinstwasser; ▼  $\vartheta = 20\text{ °C}$ , Subphase: NaCl/CaCl<sub>2</sub>-Lösung; ●  $\vartheta = 37\text{ °C}$ , Subphase: Reinstwasser; ◆  $\vartheta = 37\text{ °C}$ , Subphase: NaCl/CaCl<sub>2</sub>-Lösung.

Bei einer Temperatur von 37 °C ist dieser fluidisierende Effekt der salzhaltigen Subphase kaum noch zu beobachten. Das ohnehin im Vergleich zu den Systemen bei 20 °C aufgrund der erhöhten Temperatur fluidere System wird durch Zugabe von Natrium-, Calcium- und Chloridionen in die Subphase nicht weiter fluidisiert.

Alle vier Systeme zeigen bei 38 mN/m das aus dem undeuterten System bekannte Plateau [88]. Auch unter diesen Bedingungen ist somit ein Ausschluss von Material aus dem Oberflächenfilm zu erwarten.

Markantester Unterschied zwischen den Systemen bei 20 °C und jenen bei 37 °C ist das langgezogene Plateau bei einem Oberflächendruck von etwa 48 mN/m, das sich bei den Präparationen bei 37 °C ausbildet. Leider ist das System bei 37 °C derartig fluide, dass ein Kollaps des Monofilms an den Rändern der Filmwaage kaum zu verhindern ist. Es war experimentell somit nicht möglich, den Endpunkt dieses Plateaus zu ermitteln. Der unstete Verlauf der Isothermen im Bereich dieses Plateaus verdeutlicht den Kollaps des Oberflächenfilms.

Grundsätzlich deckt sich die Beobachtung auf der Filmwaage mit den mit Hilfe des CBS erhaltenen Ergebnissen (vgl. Kapitel 3): Bei 20 °C ist es möglich, einen SP-Bhaltigen DPPC/(d62)DPPG-Oberflächenfilm über den Gleichgewichtsdruck hinaus zu komprimieren, bei 37 °C gelingt dies für einen solchen Oberflächenfilm nur bis zum Gleichgewichtsspreidruck. Dieses Verhalten ist demnach bei extrem langsamen Kompressionsraten, wie sie mit der Filmwaagemethodik üblich sind, gleich.

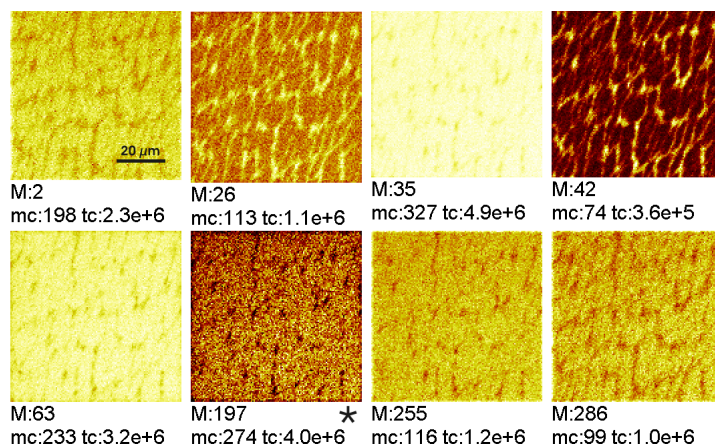
### ToF-SIMS Untersuchungen des deuterierten ternären Systems auf calciumhaltiger Subphase

Wie in Abbildung 4.31 für den nSIMS-Modus gezeigt, ändert sich das von der salzfreien Subphase bekannte Bild: Zwar zeigt sich erneut das Proteinnetzwerk (26 Da und 42 Da), jedoch sind die Fragmentationen des DPPC (255 Da) und d62DPPG (2 Da und 286 Da) annähernd gleichverteilt wie dies auch für das unspezifische Lipid-Fragmentation der Masse 63 Da zu erkennen ist. Das Postulat einer aus dem Salzgehalt der Subphase resultierenden Entmischung der beiden Lipide [87] konnte somit in der ToF-SIMS nicht bestätigt werden. Das Au<sup>-</sup>-Ion der Masse 197 Da ist erneut indikativ für die Topographie der Probe. Interessant ist, dass das Cl<sup>-</sup>-Ion (35 Da) keine Bevorzugung für die Bereiche des netto-positiv geladenen Proteins zeigt.

Auch in der positiven Polarität (vgl. Abb. 4.32) kann keine bevorzugte Desorption von Salzionen in der Umgebung des Proteins festgestellt werden. Im Gegenteil zeigen die Oberflächenabbildungen dieser Ionen eine bevorzugte Anlagerung der Natrium- und Calcium-Ionen (23 Da und 40 Da)<sup>14</sup> an den Oberflächenfilm in den Bereichen der Lipiddomänen. Kalium-Ionen (Masse 39 Da) zeigen demgegenüber eine andere, punktförmige Verteilung. Ihr Vorkommen in dieser Präparation ist möglicherweise auf eine Verunreinigung des Substrates zurückzuführen.

Es ist anzumerken, dass auch in Präparationen, die von der vermeintlich salzfreien Reinstwasser-Subphase übertragen werden, insbesondere Natriumionen nachweisbar sind (vgl. Abschnitte 4.2.7 und 4.2.8). Dieser Umstand ist weniger auf unsaubere Arbeiten als vielmehr durch den Einsatz des Natriumsalzes des DPPG als Ausgangssubstanz für das Ansetzen der Surfactant-Modellmischungen zu erklären. Auch auf der Reinstwasser-Subphase werden die Natriumionen bevorzugt in den Domänen nachgewiesen. Dies kann als weiteres Indiz für einen bevorzugten Aufenthalt des anionischen

<sup>14</sup>Es sei erneut auf die identische Masse des Calcium- und des C<sub>2</sub>H<sub>4</sub><sup>-</sup>-Ions hingewiesen, die die Interpretationen der Oberflächenabbildung des Fragmentions der Masse 40 Da erschweren.



**Abbildung 4.31:** Beobachtung des DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilms (80:20:0,4 mol%) mittels ToF-SIMS im pSIMS-Modus nach LB-Transfer von der Filmwaagensubphase ( $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ , Subphase: wässrige NaCl/CaCl<sub>2</sub>-Lösung,  $\Pi = 50\text{ mN/m}$ ,  $n = 3$ ). Exemplarisch gezeigt sind die Oberflächenabbildungen der Ionen mit den Massen: 2 Da (D<sup>-</sup>), 26 Da (CN<sup>-</sup>), 35 Da (Cl<sup>-</sup>), 42 Da (CNO<sup>-</sup>), 63 Da (PO<sub>2</sub><sup>-</sup>), 197 Da (Au<sup>-</sup>), 255 Da (C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>, Palmitat) und 286 Da (C<sub>16</sub>D<sub>31</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>, deuteriertes Palmitat).

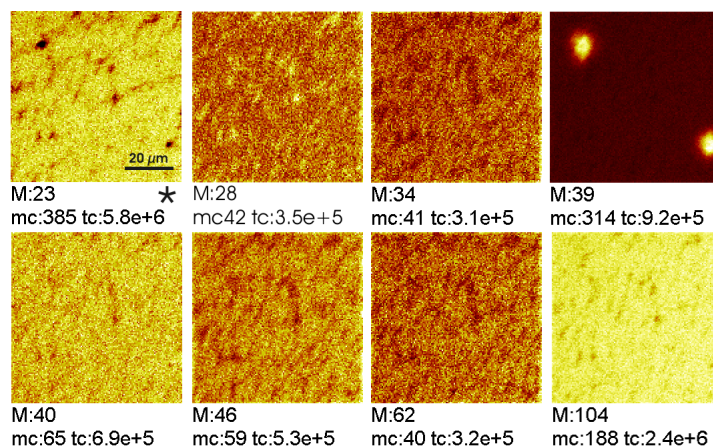
DPPG bzw. d62DPPG in diesen Bereichen des Oberflächenfilms unter diesen Bedingungen gewertet werden.

Aus den Ergebnissen auf salzhaltiger Subphase kann ein bevorzugter Aufenthalt des DPPG in diesen Bereichen nicht abstrahiert werden, da sich auch in der pSIMS die aus der nSIMS bekannte Verteilung der organischen Fragmentionen zeigt: Protein-Fragmentionen (Masse 73 Da) spannen ein Netzwerk auf, in dessen Domänen bevorzugt die DPPC- (Masse 104 Da) und DPPG-Fragmentionen (Masse 34 Da, 46 Da und 62 Da) gebildet werden und annähernd gleichverteilt nachweisbar sind.

Bei 20 °C auf einer calcium- und natriumhaltigen Subphase ist somit keine spezifische Wechselwirkung von Protein und Salzionen, aber auch nicht von Protein und Lipid nachweisbar.

#### 4.2.10 ToF-SIMS Untersuchungen des deuterierten ternären Systems bei erhöhter Subphasentemperatur

Bei einer Subphasentemperatur von 37 °C und einem Oberflächendruck von 30 mN/m zeigen die Oberflächenabbildungen sowohl von auf Reinstwasser präparierten Oberflächenfilmen (vgl. Abb. 4.33 und 4.34) als auch von solchen, die von einer salzhaltigen Subphase übertragen wurden (vgl. Abb. 4.35), kleine, kreisförmige Domänen. Solche Domänen konnten auch in den reinen Lipidoberflächenfilmen bei niedrigem Oberflächendruck nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 4.2.4). Sie sind Indiz dafür, dass der Oberflächenfilm eine Koexistenz der  $l_e$ - und  $l_c$ -Phase zeigt. Eine solche Koexistenz ist für proteinhaltige DPPC/DPPG-Präparationen bei den gezeigten Oberflächendrücken durchaus denkbar, da Proteine eine fluidisierende Wirkung auf den Oberflächenfilm ausüben. Beide Lipide weisen im Vesikel darüber hinaus eine Umwandlungstemperatur von etwa 42 °C auf [81, 31], so dass bei Proteinzusatz und einem Oberflächendruck von 30 mN/m eine Phasenkoexistenz wahrscheinlich ist.



**Abbildung 4.32:** Beobachtung des DPPC/DPPG/SP-B-Oberflächenfilms (80:20:0,4 mol%) mittels ToF-SIMS im pSIMS-Modus nach LB-Transfer von der Filmwaagensubphase ( $\vartheta = 20^\circ\text{C}$ , Subphase: wässrige NaCl/CaCl<sub>2</sub>-Lösung,  $\Pi = 50\text{ mN/m}$ ,  $n = 3$ ). Exemplarisch gezeigt sind die Oberflächenabbildungen der Ionen mit den Massen: 23 Da (Na<sup>+</sup>), 28 Da (C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>N<sup>+</sup>), 34 Da (C<sub>2</sub>D<sub>5</sub><sup>+</sup>), 39 Da (K<sup>+</sup>), 40 Da (Ca<sup>+</sup>(!)/C<sub>3</sub>H<sub>4</sub><sup>+</sup>), 46 Da (C<sub>3</sub>D<sub>5</sub><sup>+</sup>), 62 Da (C<sub>4</sub>D<sub>7</sub><sup>+</sup>), 104 Da (C<sub>5</sub>H<sub>14</sub>NO<sup>+</sup>).

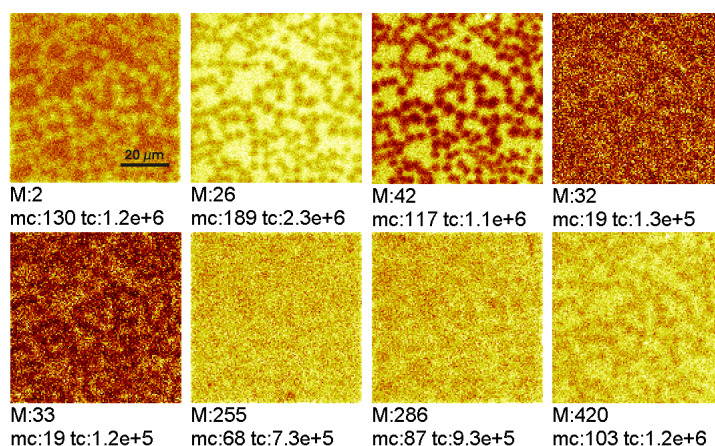
Wie bereits für die reinen Lipidpräparationen ausgeführt, sind im Zweiphasengebiet des Oberflächenfilms Aussagen über die Verteilung der Komponenten in den unterschiedlichen Bereichen des Oberflächenfilms aufgrund möglicher Matrixeffekte schwierig. Es zeigt sich jedoch, dass sich unabhängig von der Subphase Lipidfragmente und Proteinfragmente in unterschiedlichen Phasen bevorzugt nachweisen lassen. Wie aus den Ergebnissen bei  $20^\circ\text{C}$  zu erwarten war, bevorzugt dabei das Protein die  $l_e$ - und die Lipide die  $l_c$ -Phase.

### Reinstwasser-Subphase

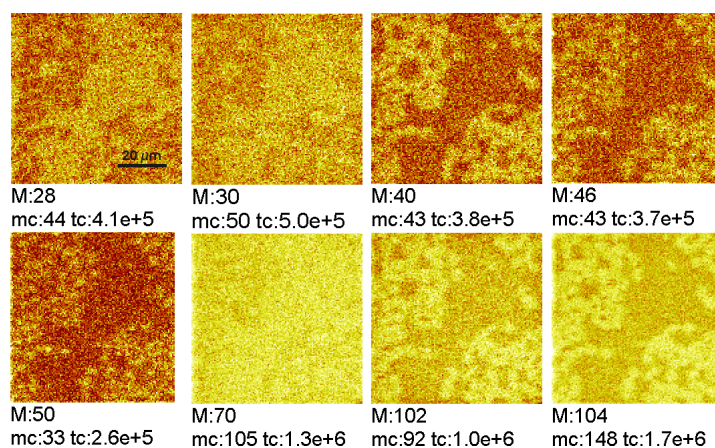
In Präparationen von einer Reinstwasser-Subphase zeigen die proteinspezifischen Fragmentationen der Massen 26 Da, 32 Da, 33 Da, 42 Da und 420 Da in der nSIMS und der Massen 28 Da, 30 Da und 70 Da in der pSIMS eine erhöhte Ausbeute in den Bereichen, die der  $l_e$ -Phase zugeordnet werden können. Demgegenüber zeigen das DPPC-spezifische Fragmentation der Masse 255 Da in der nSIMS und die Fragmentationen der Massen 102 Da und 104 Da in der pSIMS einen umgekehrten Kontrast. Dieser Kontrast ist auch für die d62DPPG-spezifischen Fragmentationen der Massen 2 Da und 286 Da in der nSIMS und 40 Da<sup>15</sup>, 46 Da und 52 Da in der pSIMS zu beobachten.

Da der Kondensationsprozess bei den gezeigten Drücken nicht abgeschlossen ist, bleibt eine Aussage über eine mögliche teilweise Entmischung der Lipide in der Endphase des Kondensationsprozesses spekulativ. Ebenso fraglich bleibt eine Aussage über das Verhalten des Oberflächenfilms in den beiden Kollapsplateaus der Isotherme: Bei solch hohen Oberflächendrücken war ein Übertrag des extrem instabilen Oberflächenfilms experimentell nicht möglich.

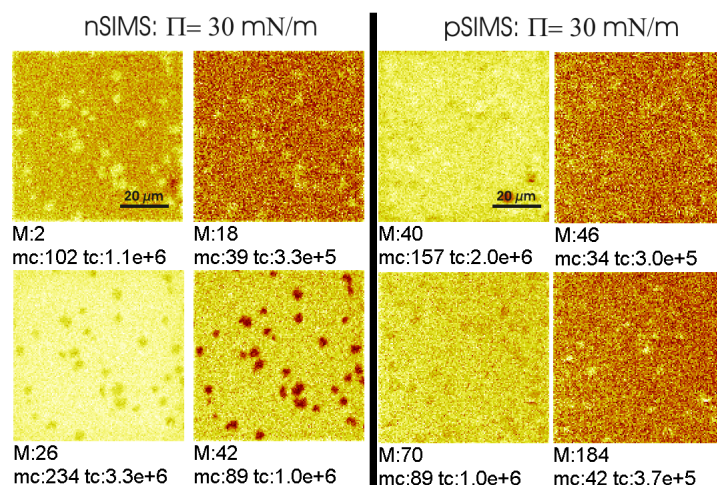
<sup>15</sup>Diese Oberflächenabbildung enthält auch eventuelle Calciumkontaminationen der Reinstwassersubphasen-Präparation.



**Abbildung 4.33:** Beobachtung des DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilms (80:20:0,4 mol%) mittels ToF-SIMS im nSIMS-Modus nach LB-Transfer von der Filmwaagensubphase ( $\vartheta = 37^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser,  $\Pi = 30\text{ mN/m}$ ,  $n = 1$ ). Exemplarisch gezeigt sind die Oberflächenabbildungen der Ionen mit den Massen: 2 Da ( $\text{D}^-$ ), 26 Da ( $\text{CN}^-$ ), 32 Da ( $\text{S}^-$ ), 33 Da ( $\text{SH}^-$ ), 42 Da ( $\text{CNO}^-$ ), 255 Da ( $\text{C}_5\text{H}_{15}\text{PNO}_4^+$ ), 286 Da ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}^+$ ) und 420 Da ( $\text{AuCN}^-$ ).



**Abbildung 4.34:** Beobachtung des DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilms (80:20:0,4 mol%) mittels ToF-SIMS im pSIMS-Modus nach LB-Transfer von der Filmwaagensubphase ( $\vartheta = 37^\circ\text{C}$ , Subphase: Reinstwasser,  $\Pi = 30\text{ mN/m}$ ,  $n = 1$ ). Exemplarisch gezeigt sind die Oberflächenabbildungen der Ionen mit den Massen: 28 Da ( $\text{CH}_2\text{N}^+$ ), 30 Da ( $\text{CH}_4\text{N}^+$ ), 40 Da ( $\text{C}_3\text{H}_4^+/\text{Ca}^{2+}$ ), 46 Da ( $\text{C}_3\text{D}_5^+$ ), 50 Da ( $\text{C}_3\text{D}_7^+$ ), 70 Da ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{PNO}_3^+$ ), 102 Da ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{NO}^+$ ) und 104 Da ( $\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NO}^+$ ).



**Abbildung 4.35:** Beobachtung des DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilms (80:20:0,4 mol%) mittels ToF-SIMS nach LB-Transfer von der Filmwaagensubphase ( $\vartheta = 37^\circ\text{C}$ , Subphase: wässrige NaCl/CaCl<sub>2</sub>-Lösung,  $\Pi = 30$  mN/m,  $n = 1$ ). Links: nSIMS-Modus (Exemplarisch gezeigt sind die Oberflächenabbildungen der Ionen mit den Massen: 2 Da ( $\text{D}^-$ ), 18 Da ( $\text{OD}^-$ ), 26 Da ( $\text{CN}^-$ ), und 42 Da ( $\text{CNO}^-$ )); rechts: pSIMS-Modus (Exemplarisch gezeigt sind die Oberflächenabbildungen der Ionen mit den Massen: 40 Da ( $\text{C}_3\text{H}_4^+$ /Calcium), 46 Da ( $\text{C}_3\text{D}_5^+$ ), 70 Da ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}^+$ ) und 184 Da ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{PNO}_4^+$ )).

### Salzhaltige Subphase

Abbildung 4.35 zeigt einige pSIMS- und nSIMS-Oberflächenabbildungen von Präparationen, die bei einer Temperatur von  $\vartheta = 37^\circ\text{C}$  und einem Oberflächendruck von  $\Pi = 30$  mN/m per LB-Transfer von einer natrium- und calciumhaltigen Subphase übertragen wurden. Es zeigen sich, wie schon bei den entsprechenden Präparationen von Reinstwasser-Subphasen, kleine punktförmige Domänen. Diese sind nur in wenigen Oberflächenabbildungen derart kontrastreich wie in den gezeigten. Erneut zeigt sich somit ein Verhalten, welches als Indiz für eine  $l_c/l_e$ -Phasenkoexistenz gewertet werden kann.

Wie bei entsprechenden Reinstwasser-Subphasen-Präparationen, so zeigt sich auch auf salzhaltiger Subphase eine Präferenz der DPPG- (pSIMS: 46 Da; nSIMS: 2 Da, 18 Da) und DPPC-spezifischen Fragmentionen (pSIMS: 184 Da) für die Domänen, im Gegensatz zu einer Präferenz der SP-B-spezifischen Fragmentionen (pSIMS: 70 Da; nSIMS: 26 Da und 42 Da) für die als  $l_e$ -Phase interpretierten Bereiche.

Die Oberflächenabbildung der Fragmentionen mit der Masse 40 Da stellt erneut eine Überlagerung der Calcium-Ionen und DPPC-Fragmentionen dar. Fragmentionen dieser Masse lassen sich bevorzugt in den Domänenbereichen nachweisen, wie dies auch bei der entsprechenden Präparation bei einer Temperatur von  $\vartheta = 20^\circ\text{C}$  der Fall ist (vgl. Abschnitt 4.2.9).

## 4.3 Diskussion

Die vorbehaltlose Betrachtung der ToF-SIMS-Ergebnisse legt folgende Interpretation nahe:

- SP-B interagiert bei 20 °C auf einer Reinstwasser-Subphase spezifisch mit DPPC, nicht aber mit DPPG.
- SP-B zeigt bei 20 °C auf calcium-, natrium- und chloridhaltiger Subphase weder eine spezifische Wechselwirkung mit einem der Lipide noch mit einem der anorganischen Ionen.
- Das deuteriumhaltige DPPC/d62DPPG/SP-B-System (80:20:0,4 mol%) befindet sich bei 37 °C mindestens bis zu einem Oberflächendruck von 30 mN/m im  $l_e/l_c$  Phasenkoexistenzgebiet, unabhängig davon, ob die Subphase salzhaltig ist.

Während die  $l_e/l_c$ -Phasenkoexistenz im System DPPC/d62DPPG/SP-B (80:20:0,4 mol%) bei 37 °C bis zu einem Oberflächendruck von 30 mN/m wenig verwundert, sind die erkannten Lipid/Protein-Wechselwirkungen ausgesprochen überraschend. Somit stellt sich die Frage nach möglichen Artefakten, die die Interpretation der Ergebnisse verfälscht haben könnten. Als Ursache solcher Artefakte auszuschließen ist dabei die massenspektrometrisch nachgewiesene Qualität der eingesetzten Substanzen (vgl. Abschnitte 2.2.3 und 4.1) sowie die Durchführung der verwendeten Überträge: Diese Standardverfahren [16, 17, 88, 172, 70] zeigten in der SFM die erwartete Topographie der Probe [88] und in der ToF-SIMS die erwartete Protein-Fragmentionen-Verteilung [17]. Als Ursache von Artefakten scheidet zudem die Deuterierung des DPPG in einigen Präparationen aus, da auch die Präparationen mit undeuteriertem Lipid die Hypothese einer spezifischen DPPC/SP-B-Wechselwirkung auf einer Reinstwasser-Subphase stützen.

Wie in Abschnitt 4.1.5 und Abschnitt 4.2.4 beschrieben, ist die verwendete ToF-SIMS-Methodik nicht frei von Artefakten. Es ist insofern zu prüfen, ob ein solches Artefakt zu einer Fehlinterpretation der Substanzverteilung in einer Oberflächenabbildung führen könnte. Das einzige ToF-SIMS-Artefakt, welches zu einer solchen Fehlinterpretation führen könnte, ist eine Kontrastumkehr der Oberflächenabbildungen in Folge eines Matrixeffekts.

### 4.3.1 Matrixeffekte der ToF-SIMS?

Wie in Abschnitt 4.2.4 beschrieben, ist es insbesondere in Präparationen nicht vollständig kondensierter Oberflächenfilme möglich, dass einzelne Ionenbilder einen Kontrast aufweisen, der ihrer vermuteten lateralen Verteilung entgegengesetzt ist. Solche Umkehrungen des Kontrastes wurden bislang jedoch immer nur bei jeweils wenigen Ionenbildern einer Präparation beobachtet [16]. In den im Rahmen dieser Arbeit sowohl für das DPPC/DPPG/SP-B- (80:20:0,4 mol%) als auch für das DPPC/d62DPPG/SP-B-System (80:20:0,4 mol%) ermittelten Ergebnissen zeigen hingegen sämtliche Ionenbilder, die den Fragmenten einer der Substanzen zuzuordnen sind, einen identischen Kontrast. Hierbei ist allerdings anzumerken, dass eine Umkehr des Kontrastes sämtlicher Ionenbilder, die einer Substanz zuzuordnen sind, vermutlich nicht auffallen würde. Die etablierte PG/SP-B-Wechselwirkungshypothese würde nur dann durch die gezeigten Daten gestützt, wenn die Oberflächenabbildungen sowohl sämtliche Sekundäranionen als auch sämtliche Sekundärkationen beider Lipide eine Kon-

trastumkehr zeigen würden, während keine Oberflächenabbildung von Sekundäranionen und -kationen des Proteins diese Kontrastumkehr zeigt. Diese ausgesprochen „selektive“ Kontrastumkehr sämtlicher Lipid-Fragmentationen erscheint unwahrscheinlich. Wird eine solche Möglichkeit dennoch in Betracht gezogen, so stellt sich die Frage nach der Ursache der möglicherweise vorliegenden Matrixeffekte:

Die Kontrastumkehr wird immer durch das Vorliegen einer unterschiedlichen Nahumgebung für Substanzen in verschiedenen Bereichen des Oberflächenfilms hervorgerufen [15]. Eine Möglichkeit, eine Kontrastumkehr zu erklären, könnte somit die Annahme sein, dass der Oberflächenfilm bei einem Oberflächendruck von 50 mN/m noch nicht vollständig kondensiert ist. In diesem Zustand hätten die Lipide in unterschiedlichen Phasen eine jeweils andere Nahumgebung. Dieser Ansatz ist aus zwei Gründen nicht stichhaltig: Zum einen verbleibt das grundsätzliche Problem, dass für alle Fragmente beider Lipide eine Kontrastumkehr vorliegen muss, ein Umstand, dem sowohl die ToF-SIMS-Ergebnisse der Überträge der nicht vollständig kondensierten, reinen Lipidsysteme bei 2 mN/m widersprechen (vgl. Abschnitt 4.2.4) als auch jene der DPPC/d62DPPG/SP-B-Präparationen bei 37 °C, welche ebenfalls eine  $l_c/l_e$ -Phasenkoexistenz aufweisen (vgl. Abschnitt 4.2.10). Zum anderen deutet der Verlauf der Isotherme auf eine vollständige Kondensation des Oberflächenfilms hin (vgl. Abschnitt 4.2.3).

Ein weiterer Ansatz, eine Kontrastumkehr zu erklären, ist die Annahme, dass DPPG-Moleküle in der Nähe des SP-B eine andere Nahumgebung haben als innerhalb der Domänen. Diese Annahme ist sicherlich zutreffend, gilt allerdings ebenso für das DPPC. In der Literatur wird davon ausgegangen, dass das Protein zeitgleich mit 50–70 Lipiden wechselwirkt [150]. Bei dem in den Modellsystemen gewählten Proteingehalt von 0,4 mol% heißt das, dass 20–28% aller Lipide in ihrem Verhalten durch das Protein beeinflusst werden. Die Annahme einer spezifischen SP-B/PG-Wechselwirkung würde voraussetzen, dass alle bzw. ein wesentlicher Prozentsatz dieser beeinflussten Lipide eine PG-Kopfgruppe tragen. Bei einer solchen Wechselwirkung sollten somit viele oder sogar alle d62DPPG-Moleküle des gewählten Modellsystems mit dem Protein wechselwirken. Dies aber sollte in der ToF-SIMS abzubilden sein. Es ist schwierig vorstellbar, dass d62DPPG im Proteinnetzwerk in hoher Konzentration vorliegt, aber hier in keinem seiner Fragmente bevorzugt nachzuweisen ist, während für DPPC das Gegenteil eintritt. Vielleicht noch unwahrscheinlicher ist die Annahme, dass DPPG in den Domänen nur in ausgesprochen geringen Mengen vorkommt, in diesen Bereichen aber eine höhere Ionenausbeute in der ToF-SIMS erzielt als eine bei weitem überwiegende Domänen-Hauptkomponente DPPC.

Das Vorliegen eines Matrixeffektes ist aufgrund der aufgeführten Argumente somit extrem unwahrscheinlich. Hingegen ist es naheliegend, davon auszugehen, dass die laterale Verteilung der Lipide und des Proteins der lateralen Verteilung ihrer Fragmentationen in der Oberflächenabbildung entspricht.

### 4.3.2 Lipid-Bindungstasche des Proteins?

Die einzige Möglichkeit, eine spezifische PG/SP-B-Wechselwirkung mit den gezeigten Daten zu erklären, wäre die Annahme der Bindung des Lipids in einer Bindungstasche des Proteins. In einem solchen Fall läge eine spezifische PG/SP-B-Wechselwirkung vor, die möglicherweise mit der lateralen Verteilung der Fragmentationen in Einklang zu bringen ist.

Auch diese Annahme erscheint ausgesprochen unwahrscheinlich: Zum einen wird das Vorhandensein einer solchen Bindungstasche zwar für das dem SP-B teilweise



homologe Saposin-B [1], nicht aber für das SP-B diskutiert [184]. Außerdem sollte die von CRUZ et al. erkannte Wechselwirkung des Proteins mit den Kopfgruppen der Lipide [33], die somit die einzige Bindungsstelle einer solchen Bindungstasche ausmachen würde, eine Fragmentierung der Lipid-Acyلكetten kaum beeinflussen. Es ist somit auszuschließen, dass das Protein die deuterierten Acylgruppen des d62DPPC umschließt und somit eine Desorption von Acylgruppen-Fragmenten verhindert. Mit diesem Ansatz ist somit nicht zu erklären, warum in dem Oberflächenfilm in der Umgebung des Proteins kaum Fragmentationen des d62DPPC nachweisbar sind.

Es lässt sich somit keine Möglichkeit finden, die ToF-SIMS Oberflächenabbildungen der DPPC/DPPG/SP-B- bzw. der DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilme mit der Hypothese einer spezifischen DPPG/SP-B-Wechselwirkung in Einklang zu bringen. Demgegenüber erscheint es wahrscheinlicher, dass auf einer Reinstwasser-Subphase eine spezifische DPPC/SP-B-Wechselwirkung vorherrscht.

### 4.3.3 Art der Protein-DPPC-Wechselwirkung

Sollte SP-B spezifisch mit DPPC wechselwirken, so ist zu fragen, welcher Art diese Wechselwirkung ist. Spezifische Lipid/Protein-Wechselwirkungen können durch ionische Wechselwirkungen [68], aber auch durch Interaktionen der  $\pi$ -Elektronen der cyclischen Tryptophan-Seitenkette mit den Lipidkopfgruppen hervorgerufen werden [182]. Zudem kann insbesondere bei Transmembranproteinen die Kettenlänge der diese umgebenden Lipide einen Einfluss auf die Spezifität der Proteine haben [100].

Die gezeigten Daten widersprechen einer auf unterschiedlicher Acylkettenlänge beruhenden Wechselwirkung des SP-B mit DPPC, da das alternativ für eine Wechselwirkung zur Verfügung stehende DPPG eine identische Acylkettenlänge aufweist.

Gegen die Annahme einer ionischer Wechselwirkung spricht, dass das netto-positiv geladene SP-B nicht mit dem negativ geladenen DPPG, sondern mit dem netto-neutralen DPPC wechselwirkt. Völlig auszuschließen ist eine solche ionische Wechselwirkung jedoch nicht. Die Beeinflussung der Protein-Spezifität durch anorganische Salze mag als Indiz für die Beeinflussung möglicher ionischer SP-B/DPPC-Wechselwirkungen angesehen werden. Das geänderte Verhalten könnte allerdings auch auf Konformationsänderungen des Proteins zurückzuführen sein.

Die Annahme einer Tryptophan-induzierten Wechselwirkung wird durch die relative Position des SP-B zum Zentrum einer Lipiddoppelschicht nur bedingt gestützt: Die Injektion von methanolischer SP-B-Lösung in eine Vesikeldispersion führt zu einer Anlagerung des Proteins an die Vesikel. Dabei sind die beiden Tryptophan-Seitenketten des SP-B-Dimers 10–13 Å vom Zentrum der Lipiddoppelschicht entfernt angeordnet [33]. Dies stimmt lediglich näherungsweise mit einer für die Lipid-Tryptophan-Wechselwirkung postulierten Entfernung von 15–17 Å der Tryptophan-Seitenketten vom Zentrum der Lipiddoppelschicht überein [182].

Aussagen über die Art einer möglichen DPPC/SP-B-Wechselwirkung anhand der in dieser Arbeit gezeigten Daten bleiben somit spekulativ.



## Kapitel 5

# Vesikelabsorption innerhalb eines DPPC/POPC-Systems

Eine der wenigen Eigenschaften, die bislang ausschließlich dem SP-B zugeordnet werden, ist von VELDHUIZEN et al. experimentell ermittelt worden [169]: Sie untersuchten im CBS das Absorptionsverhalten von Lipid-Vesikeln an vorgeformte Lipid-Protein-Oberflächenfilme unter zyklischer Kompression und Expansion. In ihrem experimentellen Ansatz wurden Oberflächenfilme aus DPPC/POPC/POPG (50:30:20 mol%) als reines Lipidsystem oder mit jeweils einem der hydrophoben Surfactant-Proteine gespreitet. In die Subphase dieser Systeme wurden reine Lipid-Vesikel der gleichen Lipid-Zusammensetzung injiziert. Während die Lipid- und die Lipid/SP-C-Oberflächenfilme in diesem experimentellen Ansatz nicht in der Lage sind, maximalen Oberflächendrücken standzuhalten, ist dies den SP-B enthaltenden Oberflächenfilmen möglich<sup>1</sup>. VELDHUIZEN et al. interpretieren dies als Nachweis der SP-B induzierten DPPC-Anreicherung des Oberflächenfilms.

Folgt man VELDHUIZENS et al. Auffassung und bezieht in die Überlegung ein, dass SP-B nach vorherrschender Lehrmeinung selektiv mit PG wechselwirken soll (vgl. Abschnitt 1.10), so dürfte ein System, das dem VELDHUIZENS et al. vergleichbar ist, aber kein PG enthält, nicht in der Lage sein, Oberflächenfilme auszubilden, die maximalen Oberflächendrücken standhalten.

Dieser experimentelle Ansatz wird im vorliegenden Kapitel verfolgt. Hierzu wurden reine POPG-Oberflächenfilme gespreitet, um auszuschließen, dass bereits ursprünglich im Oberflächenfilm enthaltenes DPPC zur Stabilität des Filmes beitragen kann<sup>2</sup>.

## 5.1 Methoden

### 5.1.1 Vesikelpräparation

Es wurden kleine unilamellare Vesikel (small unilamellar vesicle, SUV) nach der Ultraschallmethode hergestellt [168]. Dazu wurden die Lösungen der Lipide DPPC und

---

<sup>1</sup>Interessanterweise ist SP-B hierzu nicht in der Lage, wenn sowohl Vesikel als auch Oberflächenfilm zu weniger als 50% aus DPPC bestehen.

<sup>2</sup>VELDHUIZEN et al. zeigten allerdings, dass Oberflächenfilme, die einen DPPC-Anteil von 50% aufweisen, ohne Subphasenvesikel instabil sind.

POPC im molaren Verhältnis von 1:1 gemischt und das organische Lösemittel (Chloroform/Methanol 1:1 v/v) im Stickstoffstrom bei 55 °C verblasen. Die getrockneten Lipidfilme wurden im Wasserbad bei etwa 55 °C mit Wasser bis zu einer Lipidkonzentration von 7,5 mol/L dispergiert. Die Dispergierung wurde mittels starken Vortexens beschleunigt.

Die Dispersion wurde mit einer Ultraschallsonde (Soniprep 150, MSE inc., NL) 3-mal für 20 Sekunden bei einer Amplitude von 2  $\mu\text{m}$  beschallt. Die so erhaltenen SUVs wurden unmittelbar verwendet.

### 5.1.2 CBS-Messungen

Die CBS-Messungen wurden im Wesentlichen wie in Abschnitt 3.2 beschrieben durchgeführt: Es wurde ein reiner POPC- bzw. ein POPC/SP-C (100:3 mol%) oder ein POPC/SP-B-Oberflächenfilm (100:0,75 mol%) präpariert. Die Subphase wurde gespült und der Oberflächenfilm äquilibriert. Dieser wurde allerdings nicht unmittelbar komprimiert, sondern es wurden zunächst 100  $\mu\text{L}$  der SUV-haltigen Dispersion mit Hilfe einer Hamilton-Spritze in die Probenkammer eingeführt, so dass eine Konzentration von 1  $\mu\text{mol}$  Lipid pro Milliliter Subphase vorlag. Das System wurde erneut für 30 Minuten unter Rühren äquilibriert und dann entsprechend der in Abschnitt 3.2 beschriebenen Methodik komprimiert.

Im Anschluss an die ersten fünf Kompressions-/Expansionsmessungen wurde das System innerhalb von 30 Minuten mit dem 20-fachen Subphasenvolumen gespült und für weitere 30 Minuten unter kontinuierlichem Rühren äquilibriert. Im Anschluss daran erfolgten fünf weitere Kompressions/Expansions-Zyklen.

## 5.2 Ergebnisse

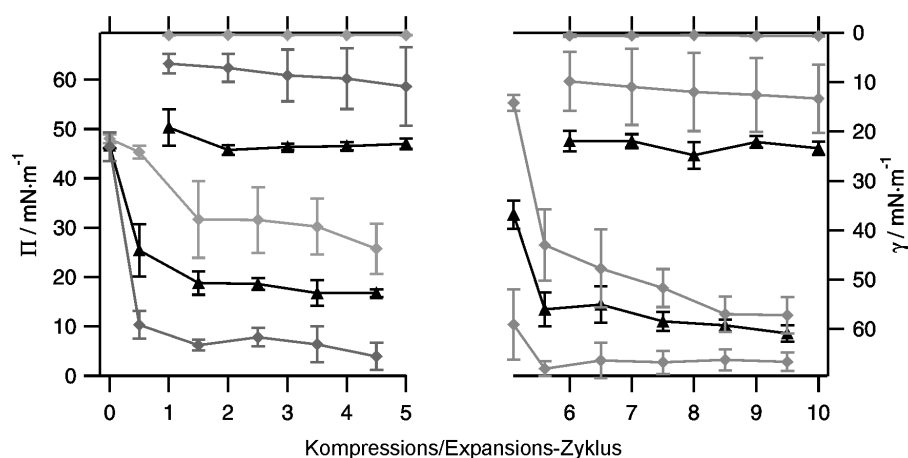
Abbildung 5.1 zeigt die Ergebnisse der Kompressions-Expansions-Vorgänge der Lipid- und Lipid/Protein-Systeme: Während der Lipidfilm bis auf Werte oberhalb des Gleichgewichtsspreitdrucks komprimierbar ist, aber nicht einen maximalen Oberflächendruck erreicht, ist der SP-B-haltige Oberflächenfilm hierzu in der Lage. Der SP-C enthaltende Oberflächenfilm erreicht hingegen nur den Gleichgewichtsspreitdruck von etwa 50  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . Dieses Verhalten zeigt sich für sämtliche Oberflächenfilme über sämtliche Kompressionszyklen.

Der maximale Oberflächendruck liegt für den SP-B enthaltenden Oberflächendruck niedriger als für den SP-C-haltigen. Das reine Lipidsystem zeigt den geringsten maximalen Oberflächendruck.

## 5.3 Diskussion

Das Ergebnis zeigt, dass porcines SP-B in der Lage ist, in einem rein PC-haltigen Lipidsystem die Ausbildung eines Oberflächenfilmes zu katalysieren, der maximalen Oberflächendrücken standhält.

In Kapitel 3 wurde bereits gezeigt, dass ein reiner POPC-Oberflächenfilm bei 37 °C nur bis zum Gleichgewichtsspreitdruck von 50  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  stabil ist. Es wurde nicht gezeigt, ob ein SP-B/POPC-Oberflächenfilm unter diesen Bedingungen stabil ist, jedoch zeigen die Ergebnisse aus Kapitel 3, dass die Zugabe von SP-B zu einem Lipidfilm diesen eher destabilisiert.



**Abbildung 5.1:** Kompression von unterschiedlichen POPC-haltigen Oberflächenfilmen bei 37 °C (♦ POPC ▲ POPC/SP-C (100:3 mol %), ◆ POPC/SP-B (100:0,75 mol %)). Die Zyklen 1-5 wurden innerhalb von einer Minute bei Anwesenheit von DPPC/POPC-Vesikeln (1:1 mol %) durchgeführt. Der Wert bei 5,1 gibt den Wert des Oberflächendrucks nach Spülen der Subphase mit dem 20-fachen Subphasenvolumen an. Die Zyklen 5,5 bis 10 wurden daran anschließend innerhalb von einer Minute auf vesikelfreier Subphase durchgeführt.

Wird von der in Kapitel 1 dargestellten und in Kapitel 3 mit Ergebnissen untermauerten Theorie ausgegangen, dass unter den verwendeten Bedingungen nur ein stark DPPC angereichertes System in der Lage ist, stabile Oberflächenfilme bei maximalem Oberflächendruck auszubilden, so können aus diesem Experiment drei Schlussfolgerungen gezogen werden: Zum einen ist der gezeigte SP-B enthaltende Oberflächenfilm nach Kompression stark DPPC angereichert, während dies der reine Lipidfilm sowie der SP-C enthaltende Oberflächenfilm nicht ist. Somit ist SP-B – so die zweite Schlussfolgerung – in der Lage, innerhalb eines rein PC-haltigen Lipidsystems eine solche Anreicherung zu katalysieren. Hierzu ist drittens kein Calcium erforderlich.

Dies aber widerspricht – neben den in Kapitel 4 vorgestellten ToF-SIMS-Daten – sowohl einer spezifischen Wechselwirkung von SP-B mit PG als auch einer dafür benötigten Anwesenheit von Calcium, wie sie in den in Abschnitt 1.11 erläuterten Ausgangshypothesen postuliert wurde.

Inwieweit das SP-B spezifisch mit einem der beiden verwendeten PC-Moleküle wechselwirkt, um eine solche Anreicherung zu gewährleisten, kann aus den gezeigten Ergebnissen nicht ersehen werden. Jedoch liegt, wie in der zusammenfassenden Diskussion zu zeigen ist (vgl. Kapitel 6), die Vermutung nahe, dass SP-B spezifisch mit DPPC wechselwirkt.

Die gezeigten Ergebnisse für die PG-freien Systeme entsprechen nicht nur in Bezug auf den maximalen sondern auch in Bezug auf den minimalen Oberflächendruck denen des PG-haltigen Systems VELDUIZENS et al.. Dieser interpretiert diese Ergebnisse, indem er den proteinhaltigen Systemen die Eigenschaft zuweist, in höherem Maße Lipide in den Oberflächenfilm zu insertieren, die bei Expansion des Oberflächenfilmes

zur Ausbildung eines höheren Oberflächendrucks beitragen [169]. Diese Interpretation deckt sich mit den Ergebnissen von Filmwaage-Absorptions-Experimenten [116].

Die Zyklen, die nach Spülung der Subphase durchgeführt wurden, zeigen, dass die beobachteten Eigenschaften der Oberflächenfilme nicht vom Vorliegen der Vesikel in der Subphase abhängen.

# Kapitel 6

## Zusammenfassende Diskussion

Im Folgenden wird zunächst ein Überblick über die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse gegeben. Diesem schließt sich eine Diskussion an, in der die gezeigten Ergebnisse mit Literaturdaten verglichen werden und der Versuch unternommen wird, eine Theorie über mögliche spezifische Wechselwirkungen des Surfactant Protein B mit einer Lipidspezies aufzustellen.

### 6.1 Überblick über die gezeigten Ergebnisse

Nachdem die Wichtigkeit des Surfactant Protein B für ein funktionsfähiges System der Alveolen und somit der gesamten Säugerylunge dargestellt wurde (vgl. Kapitel 1), wurde die Qualität des aufgereinigten Proteins aufgezeigt (vgl. Kapitel 2).

#### **Qualität des verwendeten Proteins**

Das verwendete Protein wurde durch EDMAN-Sequenzierung der ersten zehn N-terminalen Aminosäuren mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit nachgewiesen. Darüber hinaus weist es eine mit den Literaturwerten in guter Näherung übereinstimmende Masse auf, wie mit Hilfe der Elektrospray-Massenspektrometrie ermittelt werden konnte.

Indirekt konnten zudem durch die Übereinstimmung des chromatographischen Elutionsprofils mit Literaturdaten und durch den Nachweis für das Vorliegen des Proteins als Homodimer in der SDS-PAGE Indizien für die Identität des Proteins gesammelt werden.

Die Konzentration des aufgrund des amphipathischen Proteincharakters nicht vom Protein zu trennenden Lipidanteils war gering. Die Konzentrationsbestimmung des Proteins gelang in ausreichendem, wenn auch optimierbaren Maße.

#### **Indizien für eine erforderliche DPPC-Anreicherung in der Monoschicht**

Mit Hilfe der Captive Bubble Surfactometry wurden Indizien gesammelt, die darauf hindeuten, dass für die Ausbildung eines stabilen Oberflächenfilms in der Lunge eine Anreicherung dieses Oberflächenfilmes mit DPPC oder länger-kettigen doppelt

gesättigten Phosphatidylcholinen erforderlich ist (vgl. Kapitel 3). Zwar gelingt die Ausbildung solch stabiler Oberflächenfilme bei extrem hohen Kompressionsraten von 112%/s auch mit DPPC-freien Oberflächenfilmen [27], bei den in dieser Arbeit erreichbaren hohen Kompressionsraten von 90%/s ist dies jedoch bereits nicht mehr möglich.

Physiologisch sind extrem hohe Kompressionsraten eher unwahrscheinlich, so dass die gezeigten Daten für einen erforderlichen DPPC-Anreicherungsprozess im Oberflächenfilm der Lunge sprechen. Beweisbar ist dies derzeit allerdings nicht. Hierzu wäre eine Quantifizierung der Oberflächenfilmkomponenten erforderlich. Ein Verfahren, mit dem dies gelingen könnte, wird in Kapitel 7.1 vorgestellt.

### **Spezifische Wechselwirkungen des Surfactant Protein B mit einer Lipidkomponente**

Mit Hilfe der ToF-SIMS gelang es nachzuweisen, dass SP-B sich in einem DPPC/DPPG-Lipidsystem bei 20 °C auf calciumfreier Subphase bevorzugt in DPPC-reichen Regionen des Oberflächenfilmes aufhält und somit vermutlich mit diesem Lipid interagiert. Dieser Nachweis steht in Widerspruch zu der Theorie einer spezifischen SP-B/Phosphatidylglycerol-Interaktion [68].

Die SP-B/DPPC-Interaktion kann mit Hilfe der ToF-SIMS nicht nur unter Einsatz des deuterierten Lipids d62DPPG verfolgt werden sondern ist auch beim Einsatz unmarkierter Lipide ersichtlich. Auf calciumhaltiger Subphase ändert sich bei gleicher Temperatur das Verhalten des deuterierten Systems. Keines der Lipide kann bevorzugt in der Umgebung des Proteins nachgewiesen werden.

Untersuchungen bei höheren Temperaturen sind in Bezug auf bevorzugte Interaktionspartner des Proteins aufgrund der Fluidisierung des Systems nicht aussagekräftig, so dass nicht ersichtlich wird, inwieweit sich das Proteinverhalten mit der Temperatur ändert.

### **Ausbildung stabiler Oberflächenfilme durch das Surfactant Protein B**

Eine der wenigen ausschließlich dem Surfactant Protein B zuzuordnenden Effekte ist die Katalyse der Ausbildung von stabilen Oberflächenfilmen in Adsorptionsexperimenten. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten belegen, dass für die Ausbildung solcher Filme weder Phosphatidylglycerol noch Calcium erforderlich sind (vgl. Kapitel 3). Dies wird als Indiz dafür gewertet, dass SP-B nicht spezifisch mit PG sondern vielmehr mit (DP)PC interagiert, und dass für diese Interaktion kein Calcium erforderlich ist.

## **6.2 Überprüfung verschiedener möglicher Surfactant Protein B/Lipid-Wechselwirkungen**

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten widersprechen der bisher zumeist geäußerten Auffassung, dass SP-B bevorzugt oder gar spezifisch mit Phosphatidylglycerol interagiert. Aus ihnen lässt sich vielmehr die Theorie einer spezifischen SP-B/DPPC-Interaktion ableiten.

Die Aufstellung beliebiger SP-B/Lipidwechselwirkungen ist zwar legitim, doch müssen sich solche Theorien anhand von experimentellen Beobachtungen überprüfen lassen. Dabei gilt: „Erweist sich ein abgeleiteter Beobachtungssatz als falsch, so ist



der Schlu[ss] auf die Falschheit der Theorie [...] logisch gültig. Stimmt dagegen ein abgeleiteter Beobachtungssatz mit der Erfahrung überein, so gilt zwar kein logischer Schlu[ss] auf die Wahrheit der Theorie, aber die Theorie hat sich bei dem Test bis auf [W]eiteres bewährt“ [154].

### 6.2.1 Hypothesen

Generell kann man unterschiedliche Hypothesen einer möglichen SP-B/Lipid-Wechselwirkung aufstellen:

- Unspezifische Wechselwirkungen: Das Protein wechselwirkt mit Lipiden, ohne dass dabei eine Bevorzugung einer Lipidkopfgruppe vorliegt.
- Spezifische Wechselwirkungen mit Phosphatidylglycerol (PG).
- Spezifische Wechselwirkungen mit Dipalmitoyl-phosphatidylcholin (DPPC).
- Spezifische Wechselwirkungen mit einem beliebigen anderen Surfactant-Lipid.

In der Literatur wurden bislang lediglich die ersten beiden Hypothesen diskutiert.

Die Aufstellung dieser Hypothesen setzt voraus, dass das Protein überhaupt mit Lipiden wechselwirkt, ein Umstand, auf den alle in Abschnitt 1.10 diskutierten Literaturergebnisse hindeuten, und der deshalb hier als gegeben betrachtet wird.

### 6.2.2 Beobachtungen zur Spezifität der Wechselwirkung

Die Hypothesen werden auf verschiedene, in der Literatur und in dieser Arbeit mit der Spezifität des Proteins verknüpfte Beobachtungen untersucht.

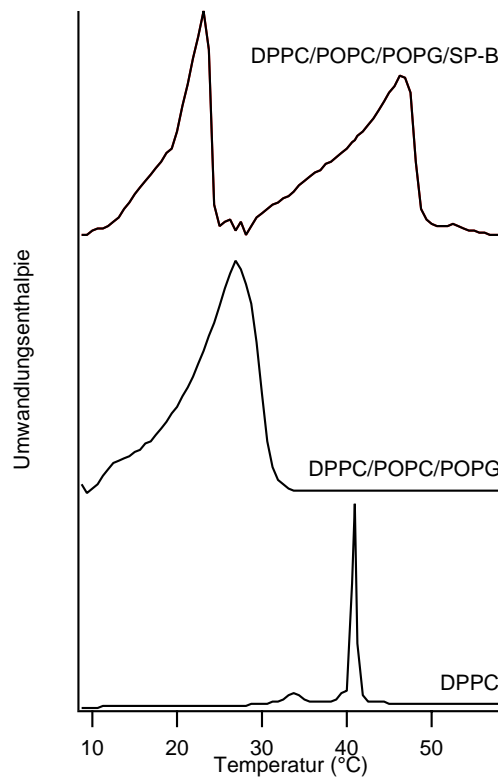
#### Ladung des Proteins

Ein Argument, das häufig für eine SP-B/PG-Wechselwirkung herangezogen wird, ist die positive Ladung des Proteins, bei gleichzeitiger negativer Ladung des PG [68]. Diese Argumentation geht von einem ionischen Charakter der SP-B/Lipid-Wechselwirkung aus, einer Grundannahme, die, wie in Abschnitt 4.3.3 diskutiert, nicht notwendigerweise zutreffen muss. Darüberhinaus ist auch im Fall einer ionischen SP-B/Lipid-Wechselwirkung PG nicht der einzig mögliche Wechselwirkungspartner, da die Betrachtung der Nettoladung nicht die lokale Ladungsverteilung in dem mit dem Lipid wechselwirkenden Teil des Proteins berücksichtigt.

Zudem lässt sich beispielsweise mit der phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase D der Pflanze *Arabidopsis* ein Protein finden [141], bei dem trotz positiver Nettoladung (+12) eine spezifische Wechselwirkung mit einem netto-neutralen Lipid zu beobachten ist. Die Nettoladung des Proteins kann somit nicht als Beweis für spezifische oder unspezifische Wechselwirkungen von Proteinen mit Lipiden herangezogen werden.

### 6.2.3 Bevorzugter Aufenthalt des Proteins in fluiden Bereichen einer Lipidmonoschicht

Der Umstand, dass sich SP-B bevorzugt in den fluiden Bereichen von Oberflächenfilmen von Surfactant-Modellsystemen aufhält, wird als Argument dafür benutzt, dass



**Abbildung 6.1:** DIEMELS DSC-Untersuchungen an SP-B/Lipid-Mischungen [44]. Während die Lipidmischung (DPPC/POPC/POPG, 50:30:20 mol%) lediglich ein Phasenumwandlungsmaximum zeigt, sind bei Zugabe von SP-B (0.75 mol%) zu dieser Mischung zwei Phasenumwandlungsmaxima detektierbar. Dies spricht für eine proteininduzierte Entmischung der Lipide. Die Phasenumwandlungstemperatur des zweiten Maximums der proteinhaltigen Mischung korreliert mit der des reinen DPPC ( $T_M=42\text{ }^\circ\text{C}$ ), das somit vermutlich teilweise von POPC ( $T_M < 0\text{ }^\circ\text{C}$ ) und POPG ( $T_M < 0\text{ }^\circ\text{C}$ ) getrennt vorliegt.

das Protein mit den fluideren Komponenten dieser Systeme wechselwirke [108]. In solchen Experimenten wird zumeist DPPC in Kombination mit POPG bzw. POPC, aber auch DPPG verwendet, und davon ausgegangen, dass die nicht-DPPC-Komponenten zuletzt kondensieren.

Zumindest im DPPC/DPPG-System zeigen DSC-Messungen, dass eine nahezu ideale Mischbarkeit beider Komponenten im binären System vorliegt [51]. In diesem Fall kann nicht von einer bevorzugten Kondensation des DPPC ausgegangen werden.

Teilweise ungesättigte binäre Lipid-Systeme, wie das DPPC/DOPG-System, zeigen demgegenüber keine ideale Mischbarkeit [180], und es ist somit davon auszugehen, dass eine der Lipid-Komponenten – vermutlich DPPC – vor der anderen kondensiert. Während für binäre Lipidsysteme eine Reihe von DSC-Untersuchungen vorliegen, aus denen auf das Verhalten einer Modellmembran während des Kondensationsprozesses geschlossen werden kann, liegen nur wenige Ergebnisse für eine SP-B-haltige Lipidmischung vor. Während SHIFFER et al. die hydrophoben Surfactant-Proteine mit lediglich einem Lipid mischten [150], experimentierten DIEMEL et al. [44] mit

ternären Lipidmischungen in Gegenwart von hydrophobem Surfactant Protein (vgl. Abb. 6.1). Sie konnten zeigen, dass ein DPPC/POPC/POPG-Lipidsystem (50:30:20 mol%) ohne Protein ein einzelnes Phasenumwandlungsmaximum zeigt, das sich über den Temperaturbereich von 10–32 °C erstreckt. In Gegenwart von 0,75 mol% SP-B zeigen sich hingegen zwei Phasenumwandlungsmaxima: Das eine liegt bei etwa 20 °C, während das andere bei etwa 45 °C detektiert wird. DIEMEL interpretiert die Daten als Entmischung des ursprünglich eher homogenen Gemisches unter Proteineinfluss. Zumindest eine der Komponenten wird also durch das Protein von den anderen separiert. Das einzige der verwendeten Lipide, das eine Phasenumwandlungstemperatur, die höher als 40 °C liegt, aufweist, ist DPPC (vgl. Kapitel 3). Der zweite von DIEMEL beobachtete Peak ist somit am leichtesten mit einer DPPC-Abtrennung von den übrigen Lipiden zu erklären. Eine solche Abtrennung ist nur mit einer Wechselwirkung des Proteins mit diesem oder aber mit beiden (!) anderen verwendeten Lipiden zu erklären.

Bei der Betrachtung von DIEMELs Messergebnissen fällt zudem auf, dass insbesondere das bei etwa 45 °C zu beobachtende Phasenumwandlungsmaximum der proteinhaltigen Lipidmischung eine deutliche Signalverbreiterung aufweist. Derartige Signalverbreiterungen sind in der Regel dann zu beobachten, wenn zwei oder mehrere Komponenten an dieser Phasenumwandlung des Lipidfilms beteiligt sind [69]. Die Umwandlungstemperatur spricht somit für eine Phasenumwandlung von DPPC, während die Signalverbreiterung auf eine gemeinsame Phasenumwandlung von DPPC mit einer der weiteren Komponenten deutet. In dem von DIEMEL beobachteten System kann diese Komponente jedoch weder POPC noch POPG sein, da eine solche Dotierung der DPPC-Phase mit einer Minimierung der Phasenumwandlungstemperatur einher gehen sollte. Im Gegensatz dazu sind DIEMELs Messergebnisse gut mit der Hypothese einer Anreicherung der DPPC-Phase mit SP-B in Einklang zu bringen.

#### 6.2.4 Absorptionskatalyse durch Phosphatidylglycerol und Calcium

SP-B ist in der Lage, die Absorption von Lipiden aus Vesikeln in den Oberflächenfilm zu katalysieren. In Gegenwart von Calcium und PG erfolgt diese Katalyse erheblich schneller als bei Abwesenheit dieser Komponenten [115]. Diese Beobachtung wird dahingehend interpretiert, dass Calcium und PG mit SP-B wechselwirken, um den Vorgang der Katalyse zu beschleunigen [123].

Die Absorptionskatalyse ist eine allgemeine Eigenschaft lytischer, amphipathischer Peptide. Auch das andere amphipathische Peptid des Surfactant, das SP-C, induziert in Gegenwart von Calcium und PG eine schnellere Insertion von Vesikeln in den Oberflächenfilm [115, 138]. In beiden Fällen muss dies allerdings nicht notwendigerweise mit einer spezifischen Wechselwirkung der Proteine mit diesen Lipiden, sondern kann vielmehr mit der Eigenschaft von PG-haltigen Vesikeln, in Gegenwart von Calcium miteinander und mit dem Oberflächenfilm zu agglomerieren, erklärt werden [115, 78]. Das Calcium-Ion verbrückt bei diesem Vorgang unterschiedliche negativ geladene PG-Moleküle und führt somit die Agglomeration der Lipidmembranen herbei [115, 138].

Eine Beschleunigung der Lipidinsertionsgeschwindigkeit in den Oberflächenfilm muss somit nicht notwendigerweise mit einer spezifischen SP-B/PG-Wechselwirkung erklärt werden. Sie kann vielmehr auch als Anreicherung von (beliebigem) Lipid-Substrat in der Umgebung des „Absorptions-Katalysators“ SP-B gewertet werden. Der beobachtete Effekt kann somit mit jeder der erwähnten Hypothesen erklärt werden.

### 6.2.5 Beobachtungen in der Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie

In den Beobachtungen in der Elektronen-Spin-Resonanz Spektroskopie (ESR) konnten PEREZ-GIL et al. zeigen, dass SP-B mit verschiedenen Lipiden in unterschiedlichem Maße wechselwirkt [124]. Sowohl in calciumfreiem als auch in calciumhaltigem Medium wies er nach, dass SP-B bei einer Proteinkonzentration im Vesikel von 20 mol% bevorzugt mit nitroxyl-markiertem PG wechselwirkt. Schließt man Artefakte aufgrund von Protein-Konzentration oder Lipid-Markierung aus, so ist dieses Ergebnis nur mit einer spezifischen PG-Wechselwirkung, nicht aber mit den drei anderen erwähnten Hypothesen zu vereinen.

### 6.2.6 Mangelnder Phosphatidylglycerol-Gehalt im Surfactant von Reptilien, Vögeln und dem Surfactant der Eustachischen Röhre

Wie in den Abschnitten 1.8 und 1.10 aufgeführt, enthält der Surfactant der Reptilien, der Vögel und auch jener der porcinen Eustachischen Röhre kein Phosphatidylglycerol, im Gegensatz dazu aber SP-B. Eine spezifische Wechselwirkung dieses Proteins mit einem Lipid, das in den Protein enthaltenden Sekreten nicht vorkommt (also PG), erscheint unwahrscheinlich, aber nicht vollkommen ausgeschlossen.

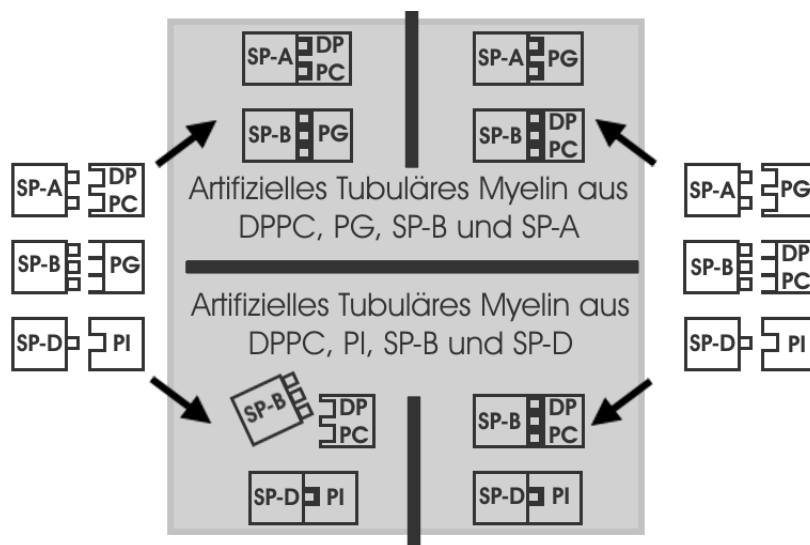
### 6.2.7 Mangelnde Ausbildung stabiler Oberflächenfilme im Surfactant von Reptilien und Vögeln

Im Gegensatz zu den in Abschnitt 6.2.6 aufgeführten Ergebnissen steht, dass der Surfactant der Nicht-Säuger trotz SP-B-Vorkommens und hohem DPPC-Gehalt nicht in der Lage ist, in Absorptionsexperimenten stabile Oberflächenfilme bei hohem Oberflächendruck auszubilden. Sollte SP-B spezifisch mit DPPC wechselwirken, so sollte diese Absorptionskatalyse trotz des Fehlens von PG in dieser Matrix möglich sein.

Ein solcher Unterschied zwischen Säuger-Surfactant und Nicht-Säuger-Surfactant ist gut mit einem Fehlen von PG bei gleichzeitiger Annahme einer spezifischen SP-B/PG-Wechselwirkung zu erklären. Andererseits konnte zumindest für den Australischen Lungenfisch gezeigt werden, dass dessen SP-B eine andere molekulare Masse aufweist [132]. Für andere Nicht-Säugetiere sind derartige Ergebnisse nicht erhältlich. Möglicherweise liegt bei den Nicht-Säugetieren, in deren Lungen der Surfactant lediglich eine Anti-Adhäsions-Funktion hat, eine andere Isoform des SP-B vor.

### 6.2.8 Wechselwirkungen im Tubulären Myelin

In der Regel wird von einer Protein-Lipid-Wechselwirkung, wie auf der linken Seite der Abbildung 6.2 dargestellt, ausgegangen. Konsequenter Weise kann man mit Hilfe von DPPC, PG, SP-B, SP-A und geringen Mengen Calcium eine dem TM ähnliche artifizielle Struktur bilden (vgl. Abschnitt 1.6.1). Bei der TM-Ausbildung *in vivo* ist jede Einzelkomponente von Bedeutung: Im Surfactant der Eustachischen Röhre und vermutlich auch in dem der Mucosa fehlt die Komponente PG, in SP-A Knock-Out-Mäusen fehlt die Komponente SP-A. In keinem dieser Systeme ist TM nachweisbar. Künstliches TM mit einer erweiterten Quadratlänge ist nach dem Austausch der Komponenten SP-A und PG durch SP-D und PI zu erhalten (vgl. Abschnitt 1.6.1) [131].



**Abbildung 6.2:** Mögliche Lipid-Wechselwirkungen von SP-A, SP-B und SP-D in artifiziellem Tubulärem Myelin. Links: SP-A  $\rightarrow$  DPPC, SP-B  $\rightarrow$  PG, SP-D  $\rightarrow$  PI. Rechts: SP-A  $\rightarrow$  PG, SP-B  $\rightarrow$  DPPC, SP-D  $\rightarrow$  PI.

Dieser letzte Aspekt widerspricht einer Wechselwirkung von SP-B mit PG und einer Wechselwirkung von SP-A mit DPPC. Nach dieser Wechselwirkungshypothese muss ein Austausch von SP-A gegen SP-D zwingend den Austausch von DPPC gegen PI erfordern, um künstliches, SP-D-haltiges TM zu erzeugen. Muss aber, wie im vorliegenden Fall, bei einem Austausch von SP-A das PG ersetzt werden, so spricht dies für eine SP-A/PG- und somit für eine SP-B/PC-Wechselwirkung, wie dies auf der rechten Seite der Abbildung 6.2 dargestellt ist<sup>1</sup>.

### 6.2.9 Ergebnisse dieser Arbeit

Die in Kapitel 4) aufgezeigten ToF-SIMS-Ergebnisse können, wie dort diskutiert, vermutlich nur mit einer SP-B/DPPC-Wechselwirkung bei Abwesenheit von Calcium in Einklang gebracht werden.

Die Ergebnisse der Vesikelabsorption (vgl. Kapitel 5) können demgegenüber sowohl mit einer spezifischen SP-B/DPPC- als auch mit einer spezifischen Wechselwirkung von SP-B mit einem ungesättigten PC erklärt werden. Demgegenüber erscheint eine unspezifische Lipidwechselwirkung des Proteins unwahrscheinlich, eine spezifische Wechselwirkung des Proteins mit PG ausgeschlossen.

<sup>1</sup>Es ist nicht Gegenstand dieser Arbeit, mögliche Wechselwirkungspartner des SP-A zu identifizieren. Es sei aber auf zwei Aspekte hingewiesen: Einerseits wechselwirkt SP-A mit den hydroxylgruppenreichen Galaktosiden [124], zum anderen lagert es sich bevorzugt an die kondensierten Bereiche von DPPC/DPPG-Präparationen an, wenn es in die Subphase solcher Strukturen injiziert wird [121]. Das SP-A wechselwirkt somit vermutlich mit dem Lipid des binären Systems, mit dem das SP-B nicht wechselwirkt.

### 6.2.10 Zusammenfassung

Tabelle 6.1 gibt die Ergebnisse der Diskussion zusammenfassend wieder. Obwohl nicht jedem der aufgeführten Diskussionspunkte das gleiche Gewicht zufällt und auch die Wertungen zur Vereinbarkeit der Ergebnisse mit der jeweiligen Theorie immer ein subjektives Moment enthalten, wird ersichtlich, dass mit keiner der Theorien alle Ergebnisse erklärbar sind. Obwohl jede der Theorien in unterschiedlichen Punkten falsifiziert werden kann, muss – mangels weiterer kombinatorischer Möglichkeiten – notwendigerweise eine dieser Theorien zutreffen.

**Tabelle 6.1:** Vereinbarkeit von Ergebnissen mit unterschiedlichen Wechselwirkungshypothesen des SP-B. + markiert die Übereinstimmung der Ergebnisse mit der entsprechenden Hypothese. 0 indiziert Ergebnisse, die mit diesen Ergebnissen nicht ohne weiteres erklärbar sind. Mit - indizierte Ergebnisse deuten auf eine Unvereinbarkeit der Ergebnisse mit der entsprechenden Theorie hin.

Untersuchung	Unspezifität	PG	DPPC	a. Lipid
Ladung des Proteins	+	+	+	+
DSC-Untersuchungen	-	-	+	0
Absorptionskatalyse mit PG	+	+	+	+
ESR-Untersuchungen	-	+	-	-
PG-Vorkommen im				
Nicht-Säugetier-Surfactant	+	0	+	+
Absorptionskatalyse im				
Nicht-Säugetier-Surfactant	0	+	0	0
TM-Wechselwirkungen	-	0	+	-
ToF-SIMS Untersuchungen	-	-	+	-
CBS-Untersuchungen	-	-	+	0

Insbesondere die Gegenüberstellung der ESR-Daten mit den hier gezeigten ToF-SIMS-Daten zeigt, dass zumindest eine der beiden Methoden zu einem Ergebnis führt, das falsch interpretiert wird. Mögliche Ursachen einer solchen Fehlinterpretation wurden sowohl für die ToF-SIMS als auch für die ESR benannt.

Es bietet sich an, die Ergebnisse dieser Arbeit als Indiz für eine spezifische SP-B/DPPC-Wechselwirkung unter calciumarmen Bedingungen zu interpretieren. Die in Tabelle 6.1 aufgelisteten Befunde deuten an, dass mit einer solchen Interpretation zwar nicht alle, aber zumindest ähnlich viele Literaturergebnisse wie durch eine SP-B/PG-Interaktion erklärbar sind. Somit erscheint diese Interpretation der gezeigten Daten legitim.

## 6.3 Physiologische Relevanz der Ergebnisse

Geht man davon aus, dass auf einer Reinstwasser-Subphase in den untersuchten proteinhaltigen Modellsystemen eine spezifische DPPC/SP-B-Wechselwirkung vorherrscht, so stellt sich die Frage, welche physiologische Relevanz dieses Ergebnis hat. Wie zu Beginn dieser Arbeit beschrieben (vgl. Abschn. 1.7.2) enthält der experimentelle Ansatz der Untersuchung eines Modellsystems immer die Gefahr, physiologisch relevante Aspekte des Systems nicht zu berücksichtigen.

Beispielsweise stimmt die chemische Zusammensetzung der Hypophase der Alveole vermutlich nicht mit jener der Reinstwasser-Subphase der Filmwaage und des CBS überein. Ist die Annahme einer salzfreien oder zumindest salzarmen physiologischen (Nah-)Umgebung des SP-B somit überhaupt sinnvoll?

In den Lamellar Bodies der Typ II Pneumocyten wurde eine hohe Calciumkonzentration nachgewiesen (vgl. Abschnitt 6.2.3) [137]. Es ist somit nicht anzunehmen, dass die Nahumgebung des Proteins in diesem Surfactant-Aggregat salzfrei ist. In der Hypophase der Alveole erscheint es demgegenüber ausgesprochen naheliegend, dass zumindest eine im Vergleich zum Lamellar Body geringere Natrium- und Calciumkonzentration vorliegt: So geht etwa das von PALANIYAR et al. vorgestellte Modell der Konformationsänderung des SP-A bei Sekretion aus dem Lamellar Body in die Hypophase davon aus, dass die Hypophase arm an Calcium ist (vgl. Abschn.1.9.1) [121]. Zudem weisen die Autoren darauf hin, dass die physiologische Nahumgebung der Surfactant Proteine etwa im Tubulären Myelin nicht bekannt ist und diese Nahumgebung nicht notwendigerweise einen isotonischen Salzgehalt aufweist. Es ist ausgesprochen bemerkenswert, dass sowohl SP-A als auch SP-B ein stark kationenkonzentrationsabhängiges Verhalten zeigen. Für SP-C konnte hingegen eine solche Abhängigkeit in der ToF-SIMS nicht beobachtet werden [15].

Ein weiterer gravierender Unterschied der in dieser Arbeit verwendeten Modellsysteme gegenüber dem physiologischen Zustand ist die Modellierung des komplexen Surfactant-Gemischs mit nur drei seiner Bestandteile. Ist ein proteininduzierter Entmischungsprozess im komplexen System des Surfactant vorstellbar?

Diese Frage ist ohne weitergehende Untersuchungen nicht zu beantworten. Allerdings geben zumindest die in Abschnitt 6.2.3 beschriebenen DSC-Untersuchungen DIEMELS einen Hinweis darauf, dass auch in quarternären Systemen eine Entmischung stattfindet. Auch in einem DPPC/POPC/POPG/Cholesterol/SP-B-Gemisch<sup>2</sup> lassen sich zwei Phasenumwandlungsmaxima nachweisen und somit Indizien für einen Entmischungsprozess gewinnen [44]. Da in diesem System alle Hauptkomponenten des Surfactant vertreten sind (vgl. Abschn. 1.8) erscheint die Annahme einer generellen Entmischung von DPPC- und SP-B-haltigen Protein/Lipidsystemen – und somit auch die des pulmonalen Surfactants – unter calciumarmen Bedingungen naheliegend. Eine solche Annahme einer calciumabhängigen spezifischen SP-B/DPPC-Wechselwirkung fügt sich zudem exzellent in ein bestehendes Modell für das Verhalten von SP-A bei der Sekretion im pulmonalen Surfactant ein.

## 6.4 Modell einer calciumabhängigen spezifischen SP-B/DPPC-Wechselwirkung innerhalb des pulmonalen Surfactant

Wie in Abschnitt 1.9.1 angedeutet, stellten PALANIYAR et al. folgendes Modell für das Verhalten von SP-A während der Sekretion aus den Typ II Pneumocyten vor [121]: Der hohe Calciumgehalt der Lamellar Bodies und der vergleichsweise niedrige Calciumgehalt des Alveolarraumes führen dazu, dass sich das SP-A-Molekül bei der Sekretion analog zu einem welkenden Blumenstrauß verhält. Der Winkel der Kinke in der kollagenartigen Domäne des Proteins verringert sich, die Erkennungsdomänen des Proteins

<sup>2</sup>DPPC/POPC/POPG (50:30:20 mol% versetzt mit 10 mol% Cholesterol und 0,75 mol% SP-B auf calciumfreiem Puffer.

werden weiter voneinander entfernt. Somit ist es dem ursprünglich eher linearen Molekül möglich, die Ecken des Tubulären Myelins mit seiner nun pilzförmigen Struktur auszuformen und deren Lipidstrukturen zu stützen.

Für das SP-B legen die gezeigten Daten nahe, dass es beim gleichen Prozess, bedingt durch den verminderten Calciumgehalt, eine Spezifität für DPPC entwickelt. Die in Abschnitt 6.2.8 erläuterten Erkenntnisse zur Ausbildung von artifiziellem TM legen demgegenüber nahe, dass SP-A in diesem Prozess bevorzugt mit PG wechselwirken könnte. Beide Proteine würden somit einen Entmischungsvorgang initiieren, der selektive Insertion von DPPC in den Oberflächenfilm ermöglichen könnte. Diese selektive Insertion könnte von SP-B katalysiert werden, da bereits von ROSS et al. gezeigt werden konnte, dass auch reine DPPC-Vesikel von SP-B in einen Oberflächenfilm inseriert werden [138].

Neben den bereits in diesem Kapitel vorgestellten Daten spricht für einen solchen Ablauf, dass in den Eckstrukturen des TM eine hexagonale Phase<sup>3</sup> zu erwarten ist. Eine solche Phase wird jedoch bevorzugt von konischen Lipiden, nicht aber in diesem Maße von zylindrischem DPPC ausgebildet. Ein bevorzugtes Vorkommen des DPPC in den Eckstrukturen des TM ist somit unwahrscheinlich.

## 6.5 Zusammenfassung

Im vorliegenden Kapitel wurde dem bestehenden Modell einer spezifischen SP-B/PG-Wechselwirkung das Modell einer spezifischen SP-B/DPPC-Wechselwirkung gegenübergestellt. Wie jedes neue Modell, aber auch wie das allgemein anerkannte alte Modell einer spezifischen SP-B/PG-Interaktion, so ist auch dieser Ansatz nicht frei von Widersprüchen. Dennoch konnten im Rahmen dieser Arbeit Ergebnisse gewonnen werden, die die Aufstellung dieser neuen Interaktionstheorie legitim erscheinen lassen.

Ob diese Theorie das Potenzial besitzt, sich in ihrer Akzeptanz gegenüber dem konkurrierenden Modell durchzusetzen, wird nicht zuletzt davon abhängen, ob eine der beiden Theorien durch weitere Experimente, wie sie beispielhaft im folgenden Kapitel vorgestellt werden, falsifiziert werden kann.

Unabhängig davon, ob sich eine Theorie der spezifischen SP-B/DPPC-Wechselwirkung durchsetzt, sollte ihre Aufstellung belebend auf die derzeitige Surfactant-Forschung wirken, denn: „Die Auswahl unter konkurrierenden Alternativmodellen zum gleichen Sachbereich im Hinblick auf größere Wahrheitsähnlichkeit ist [...] das Prinzip des wissenschaftlichen Fortschritts“ [154], und der Nachweis einer größeren Wahrheitsähnlichkeit des althergebrachten Modells gegenüber dem hier neu vorgestellten muss zunächst erbracht werden.

---

<sup>3</sup>Eine hexagonale Phase bezeichnet den Aggregatzustand eines Lipids, bei dem sich die Lipidmoleküle in Form einer inversen Micelle anordnen. Dieser Zustand wird beispielsweise innerhalb des sogenannten lyotropen Polymorphismus durchlaufen. Sie stellt im artefiziellen System einen Aggregatzustand bei geringer Wasserkonzentration dar [126].



# Kapitel 7

## Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen vier zentrale Fragen auf:

- Ist für die Ausbildung eines stabilen Oberflächenfilms bei hohem Oberflächendruck und einer Temperatur von 37 °C eine DPPC-Anreicherung notwendig?
- Sind die gezeigten ToF-SIMS-Ergebnisse Artefakte?
- Mit welchem Lipid wechselwirkt SP-B spezifisch?
- Mit welchen Lipiden wechselwirken die hydrophilen Surfactant-Proteine?

Diese Fragen können möglicherweise mit den in diesem Kapitel vorgestellten experimentellen Ansätzen überprüft werden.

### 7.1 Nachweis einer SP-B induzierten DPPC-Anreicherung des Oberflächenfilms im Captive Bubble Surfactometer

Wesentliche Voraussetzung für die Gültigkeit sowohl eines SP-B/PG- als auch eines SP-B/DPPC-Interaktionsmodells ist die Annahme, dass ein stabiler hochkomprimierter Oberflächenfilm des Surfactant oder seiner Modellsysteme stark DPPC angereichert sein muss. Der Nachweis einer solchen Anreicherung *in vivo* oder auch *in vitro* steht allerdings aus [128].

Ein experimenteller Ansatz, der die Möglichkeit eröffnet, einen solchen Nachweis zu erbringen, kann aus dem in Kapitel 5 vorgestellten Versuchsaufbau abgeleitet werden. In diesem Ansatz zeigte ausschließlich der SP-B-enthaltende Film einen maximalen Oberflächendruck, ein Umstand, der als Indiz für eine DPPC-Anreicherung gewertet wurde. Im Folgenden wird eine Möglichkeit vorgestellt, einen solchen Oberflächenfilm zu isolieren und einen quantitativen Nachweis seiner Lipidkomponenten herbeizuführen.

In Vorversuchen zu diesem experimentellen Ansatz konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass CBS-Oberflächenfilme während des Spülvorgangs aus dem CBS isoliert werden können. Hierzu wird mittels einer stufendigen Mikroliter-Spritze eine Vertiefung in die Agarose-Decke der CBS-Probenkammer gestochen. Die Luftblase kann daraufhin in dieser vorgefertigten Vertiefung immobilisiert werden. Dieser

Vorgang ist mit dem Platzieren eines Golfballs auf einem „Tee“ vor dem Abschlag vergleichbar, wobei die Situation im CBS um  $180^\circ$  gedreht vorliegt. Wird der Spülvorgang kontinuierlich fortgesetzt, so gelingt es, mit der Hamilton-Spritze die Luftblase vollständig aufzusaugen. Bei Beginn dieses Vorgangs werden zunächst große Teile des Oberflächenfilms in das Volumen der Spritze aufgenommen, was an einer abrupten Formänderung der Luftblase zu Beginn des Saugvorganges zu erkennen ist.

Das in die Hamilton-Spritze aufgenommene Material kann durch mehrfaches Spülen mit organischem Lösemittel aus dieser in ein Glasgefäß überführt werden. Das Lösemittel wird im Stickstoffstrom verblasen, der getrocknete Film in  $100\ \mu\text{L}$  Chloroform/Methanol/Wasser (45:45:10 v/v/v) aufgenommen und in die Nanospray-Kapillare eines Tandem-Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometers überführt.

Mit dieser Technik gelingt der Nachweis der beiden Lipide des Oberflächenfilms im ESI-MS. Der Gehalt beider Lipide in der Präparation kann am Verhältnis ihrer Massenpeaks abgelesen werden, wenn zuvor eine Kalibration mit Lipidlösungen bekannter Konzentration durchgeführt wurde.

Nach Validierung dieses Verfahrens anhand bekannter Oberflächenfilm-Konzentrationen könnte mit diesem Verfahren und den in Kapitel 5 gezeigten Ansätzen dann eine DPPC-Anreicherung des Oberflächenfilms gezeigt werden. Dies gelänge dann, wenn in der vorgesprenkten SP-B/POPC-Präparation, nicht aber in der reinen POPC- oder in der SP-C/POPC-Präparation nach Zugabe von DPPC/POPC-Vesikeln, Kompression der Luftblase und Spülen der Subphase ein DPPC-Anteil von über 50% im Oberflächenfilm nachweisbar sein sollte.

## 7.2 Evaluierung der ToF-SIMS-Ergebnisse

In Kapitel 4 wurde darauf hingewiesen, dass anhand der in dieser Arbeit vorgestellten ToF-SIMS-Ergebnisse eine spezifische SP-B/PG-Wechselwirkung zwar unwahrscheinlich, aber nicht vollständig auszuschließen ist. Auszuschließen ist diese möglicherweise, wenn in diesen Experimenten ein anderes Lipidverhältnis gewählt würde. So sollte etwa die Verwendung eines Systems aus DPPC/d62DPPG/SP-B (99,6:0,4:0,4 mol%) und der Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit denen des Systems DPPC/d62DPPG/SP-B (0,4:99,6:0,4 mol%) endgültige Sicherheit darüber bringen, ob jedes Protein-Molekül eventuell spezifisch mit nur einem Lipidmolekül wechselwirkt.

## 7.3 Evaluierung der ESR-Methode mittels ToF-SIMS

Wie in Kapitel 6 aufgeführt, widersprechen sich die Ergebnisse von ToF-SIMS und ESR in Bezug auf den ermittelten Wechselwirkungspartner des SP-B. Neben weiteren Messungen zur Evaluierung der ToF-SIMS-Messungen wie sie in Abschnitt 7.2 dargestellt wurden, ist es mit Hilfe der ToF-SIMS möglich, die Verteilung von ESR-Sonden in einer Monoschicht zu ermitteln, um somit auf mögliche Artefakte der ESR-Methodik aufmerksam zu werden.

Die Ergebnisse einer solchen Evaluierung sind jedoch mit Vorsicht zu interpretieren: Da sich beide Techniken in ihren Ergebnissen widersprechen und somit mindestens eine der beiden Techniken ein falsch interpretiertes Ergebniss liefert, ist die Bewertung der einen mit der anderen Methodik nicht zwingend zielführend.

## 7.4 ToF-SIMS mit anderen Proteinen

Ausgehend von den in Abschnitt 6.2.8 ausgeführten Überlegungen zur Ausbildung des Tubulären Myelins *in vivo* und *in vitro* würde es sich anbieten, die Wechselwirkungen des SP-A mit den in dieser Arbeit verwendeten DPPC/DPPG- bzw. DPPC/d62DPPG-Modellsystemen zu überprüfen.

Ebenso liegt es nahe, die Hypothese einer SP-D/Phosphatidylinositol-Wechselwirkung in einem vergleichbaren DPPC/PI/SP-D-Modellsystem zu überprüfen.

Im Fall dieser beiden hydrophilen Surfactantproteine bietet sich eine Proteininjektion unter den vorgeformten Lipid-Oberflächenfilm an [140].

Der Ansatz einer Subphaseninjektion ist auch mit methanolischer SP-B-Lösung denkbar und stellt eine weitere Überprüfungsmöglichkeit der in dieser Arbeit vorgestellten Daten dar: Es konnte gezeigt werden, dass die Insertionstiefe von SP-B in eine Modellmembran präparationsabhängig ist [33].

## 7.5 Analyse der SP-B-Lipid-Wechselwirkungen mit anderen Techniken

Um Aussagen über spezifische Wechselwirkungen zwischen SP-B und einem der Surfactant-Lipide erhalten zu können, ist die Einführung einer weiteren Methodik wünschenswert, die solche Wechselwirkungen aufzeigen kann.

Hierzu bietet sich beispielsweise die Quarz-Mikrowaage-Technik an. Bei diesem Verfahren kann unter anderem die Absorption von Material an einen Schwingquarz beobachtet werden [70]. Die Präparation eines solchen Schwingquarzes mit einer DPPC- bzw. DPPG- Monoschicht ermöglicht es, nach Injektion von methanolischer SP-B-Lösung einen Absorptionsvorgang des Proteins zu verfolgen. Dieser sollte bei einer bevorzugten Wechselwirkung mit einem der Lipide im calciumfreien Medium zu einer schnelleren Absorption des Proteins an eine dieser Präparationen führen.

Nicht auszuschließen ist zudem, dass entsprechende Wechselwirkungen auch absorptionschromatographisch ermittelt werden können. Dies erfordert allerdings die aufwendige Immobilisierung eines der Wechselwirkungspartner als stationäre Phase sowie die Lösung des anderen Wechselwirkungspartners in der mobilen Phase.

## 7.6 Zusammenfassung

In der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion wird für das pulmonale Surfactant ein Protein/Lipid-Wechselwirkungsmodell akzeptiert, das nur durch wenige Daten gestützt wird. Für das Surfactant Protein B lassen sich die Argumente, die ausschließlich für die allgemein anerkannte SP-B/Phosphatidylglycerol-Wechselwirkungshypothese sprechen, auf eine einzelne Publikation zurückführen [124]. Es erscheint daher wünschenswert, eine wie auch immer geartete Wechselwirkungshypothese des SP-B – aber auch die Wechselwirkungshypothesen der anderen Surfactant Proteine – mit weiteren Ergebnissen, wie sie in dieser Arbeit beispielhaft vorgestellt wurden, abzusichern: Erst die zweifelsfreie Identifikation des mit dem SP-B wechselwirkenden Lipids ermöglicht Aussagen über den Wirkungsmechanismus dieses Proteins.

# Anhang A

## Materialien

### A.1 Chemikalien der CBS-Experimente in Abweichung von Tabelle A.4

<b>Chemikalie</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Aceton	Labsan (Dublin, Irland)
CaCl <sub>2</sub>	J.T. Baker Chemicals B.V. (Deventer, NL)
Chloroform	Labsan (Dublin, Irland)
EDTA	J.T. Baker Chemicals B.V. (Deventer, NL)
HEPES	Merck (Darmstadt, D)
Methanol	Labsan (Dublin, Irland)
Seakem ME Agarose BMA	Seakem Inc. (Rockland, ME, USA)
Tris	Biomedicals Inc. (Aurora, Ohio, USA)

### A.2 Materialien der Aufreinigung und der CBS- Experimente in Abweichung von Tabelle A.3

<b>Material</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Photometer: Beckman DU-62	Beckman Instruments (Palo Alto, Ca, USA)
Mikrowelle: Sharp R-220A	Sharp (Houten, NL)
Vortex Genie	Wilten & Co (Etten, NL)
Zentrifuge: Sigma 4-15	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Ultraschallgerät: Soniprep 150	MSE Scientific Instruments (Sussex, GB)
Fluoreszenzspektrometer: LS 2b	Perkin Elmer (Wellesley, Ma, USA)

### A.3 Materialien der Aufreinigung und der ToF-SIMS-Experimente

Material	Bezugsquelle
Thermostat F3	Haake (Karlsruhe, D)
Reinstwasseranlage	Milli Pore (Billerica, Ma, USA bzw. Eschborn, D)
Waage	Sartorius (Göttingen, D)
Zentrifuge,	Beckman Instruments
Zentrifugengefäße	(Palo Alto, Ca, USA)
SR 25 Chromatographie-Säule	Amersham Biosciences (Freiburg, D)
Injektionsspritze	Henke-Sass Wolf (Tuttlingen, D)
Kanüle Sterican	Braun (Melsungen, D)
Durchflussphotometer:	Amersham Biosciences (Freiburg, D)
LKB Unicord SII	
Probensammler: Frac 200	Amersham Biosciences (Freiburg, D)
Gelelektrophorese Apperatur	Bio-Rad (Hercules, Ca, USA)
Bio-Rad PowerPac2000	
Photometer UV-1601 PC	Shimadzu (Kyoto, Japan)
pH-Meter Knick 761 Calimatic	Knick (Berlin, D)
Fluoreszenzspektrometer	Perkin Elmer (Wellesley, Ma, USA)
Wilhelmy-Filmwaage	Riegler & Kirstein (Mainz, D)
Wilhelmy-Bändchen-Filmwaage	Nima (Coventry, GB)
Mikroliterspritzen	Hamilton (Bonaduz, CH)
Fluoreszenzlichtmikroskop	Olympus (Hamburg, D)
STM5-MJS	
CCD-Kamera C4742-95	Hamamatsu Photonics (Hersching, D)
SFM: Bioscope	Digital Instruments
mit Nanoscope IIIA Controller	(Santa Barbara, Ca, USA)
Cantilever	Digital Instruments (Santa Barbara, Ca, USA)
Aufdampfanlage E 306	Edwards (Crawley, GB)
Plasmareiniger PDC 32G-2	Harrick (Ossening, NY, USA)
CBS-Gerät	Selbstbau Arbeitskreis PÜTZ (Innsbruck, A)
Küvette	Hellma (Mühlheim, D)
Einmalküvetten Plastikbrand PMMA	Brand (Wertheim, D)
ToF-SIMS IV	Iontof (Münster, D)
Filterpapier	Sartorius (Göttingen, D)

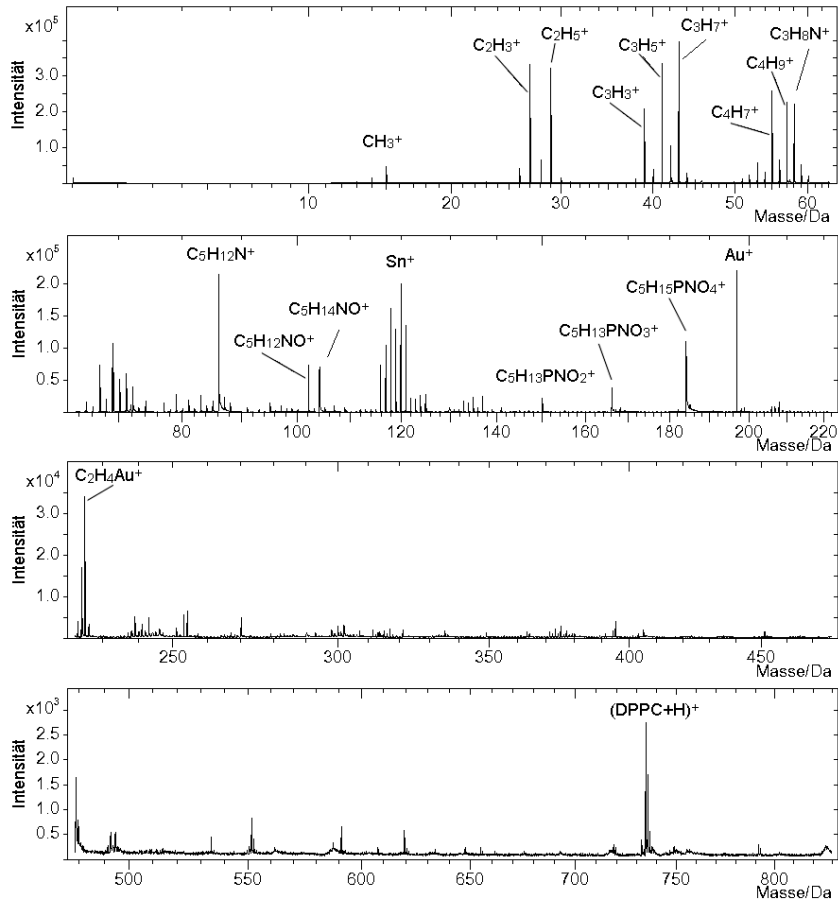
## A.4 Chemikalien der Aufreinigung und der ToF-SIMS-Experimente

Chemikalie	Bezugsquelle
Aceton	Roth (Karlsruhe, D)
Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Ammonium(VII)molybdat	Fluka (Neu-Ulm, D)
APS	Merck (Darmstadt, D)
Argon	Westfalen AG (Münster, D)
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Bodypy	Molecular Probes (Eugene, Or, USA)
Butanol	Roth (Karlsruhe, D)
CaCl <sub>2</sub>	Merck (Darmstadt, D)
Chloroform	Roth (Karlsruhe, D)
Chrom	Bal Tec (Balzers, Fl, USA)
EDTA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Fluorescamin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Glasträger	Rettberg (Göttingen, D)
Glycerol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Gold	Degussa (Hanau, D)
HEPES	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
HCl	Merck (Darmstadt, D)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Lipide (außer Bodipy)	Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, Al, USA)
Methanol	Roth (Karlsruhe, D)
Mucosol	Merck (Darmstadt, D)
Mica-Träger	Provac (Liechtenstein)
NaCl	Merck (Darmstadt, D)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck (Darmstadt, D)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck (Darmstadt, D)
NaOH	Merck (Darmstadt, D)
Perchlorsäure	Merck (Darmstadt, D)
Polypeptide Marker	Bio-Rad (Hercules, Ca, USA)
Schweinelungen	Westfleisch e.G. (Coesfeld, D)
SDS	Merck (Darmstadt, D)
Sephadex LH 60	Amersham Biosciences (Freiburg, D)
Stickstoff	Westfalen AG (Münster, D)
TEMED	Merck (Darmstadt, D)
Tesafilm	Beiersdorf (Hamburg, D)
Tris	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)

**Anhang B**

**ToF-SIMS Massenspektren**

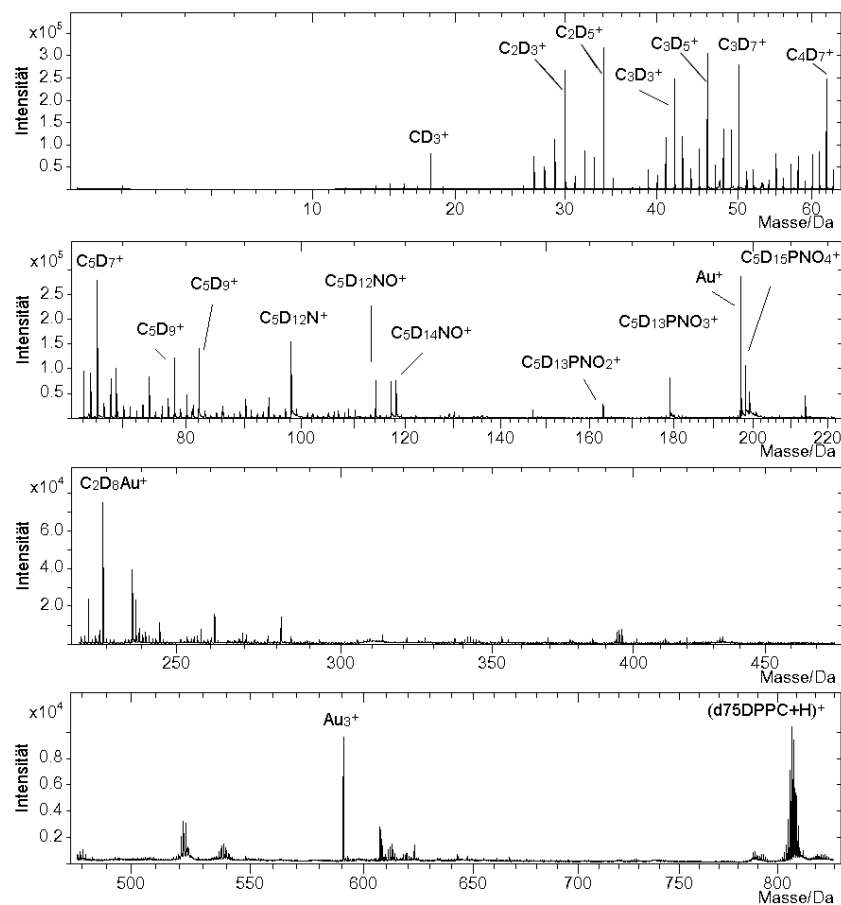
## Massenspektrum des DPPC im pSIMS-Modus



**Abbildung B.1:** Das Massenspektrum des DPPC im pSIMS-Modus entspricht dem von BOURDOS gezeigten [15]. Es wird dominiert von Kohlenwasserstoff-Fragmentationen und stickstoffhaltigen Kopfgruppen-Fragmentationen des DPPC. Darüber hinaus sind substratspezifische, goldhaltige Sekundärionen identifizierbar. Die Massenpeaks bei 115–121 Da zeigen das Isotopenmuster des Elements Zinn. Sie sind die Folge von Verunreinigungen während des Aufdampfprozesses, bei dem die Goldoberfläche erzeugt wurde. Derartige Verunreinigungen etwa mit den Elementen Silber, Chrom und Kupfer wurden auch von BOURDOS [15] beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wurden sie ausgesprochen selten beobachtet.

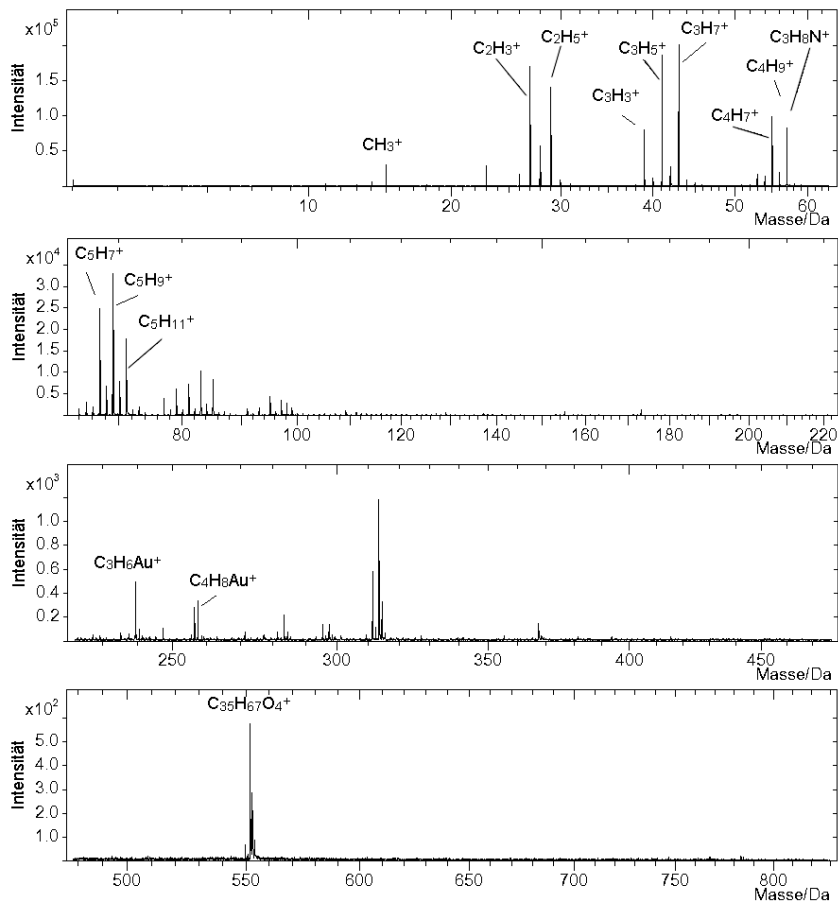


## Massenspektrum des d75DPPC im pSIMS-Modus



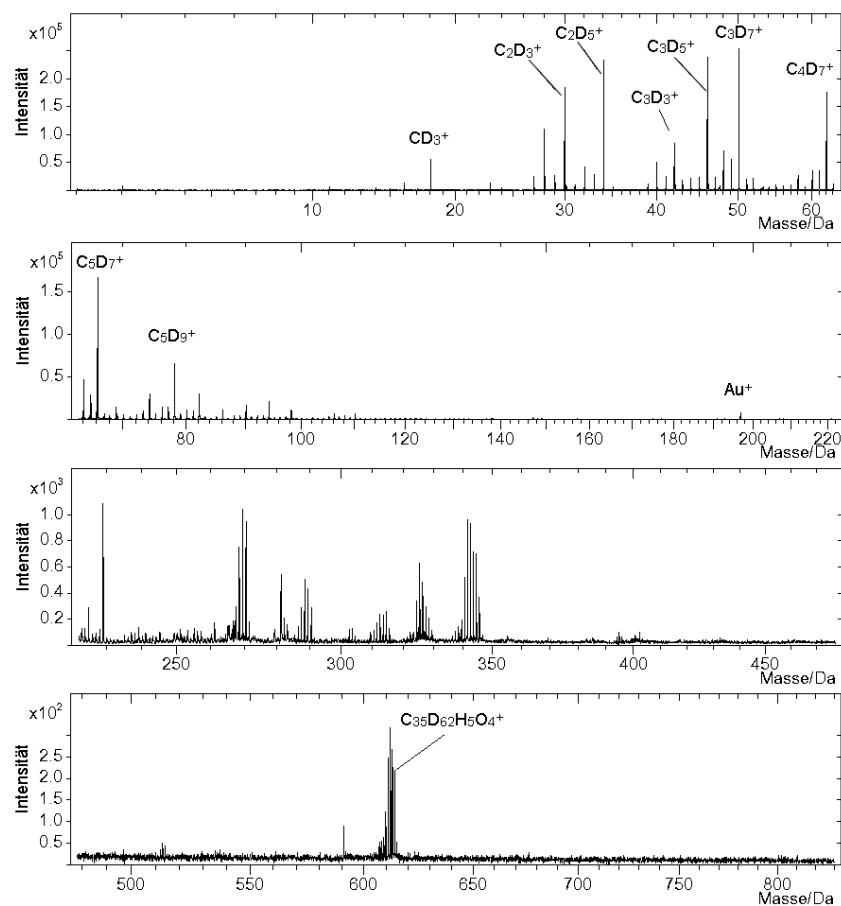
**Abbildung B.2:** Massenspektrum des d75DPPC im pSIMS-Modus. Bei nahezu identischer Fragmentierung des d75DPPC im Vergleich zum DPPC (vgl. Abb. B.1) ist aufgrund der Deuterierung des d75DPPC bei diesem Lipid die Verschiebung der Signale zu höheren Massen zu erkennen. Das Signal bei 810 Da, welches dem Molekülmolekülion des DPPC zuzuordnen ist, zeigt zudem, dass kein nennenswerter H → D Austausch stattgefunden hat.

### Massenspektrum des DPPG im pSIMS-Modus



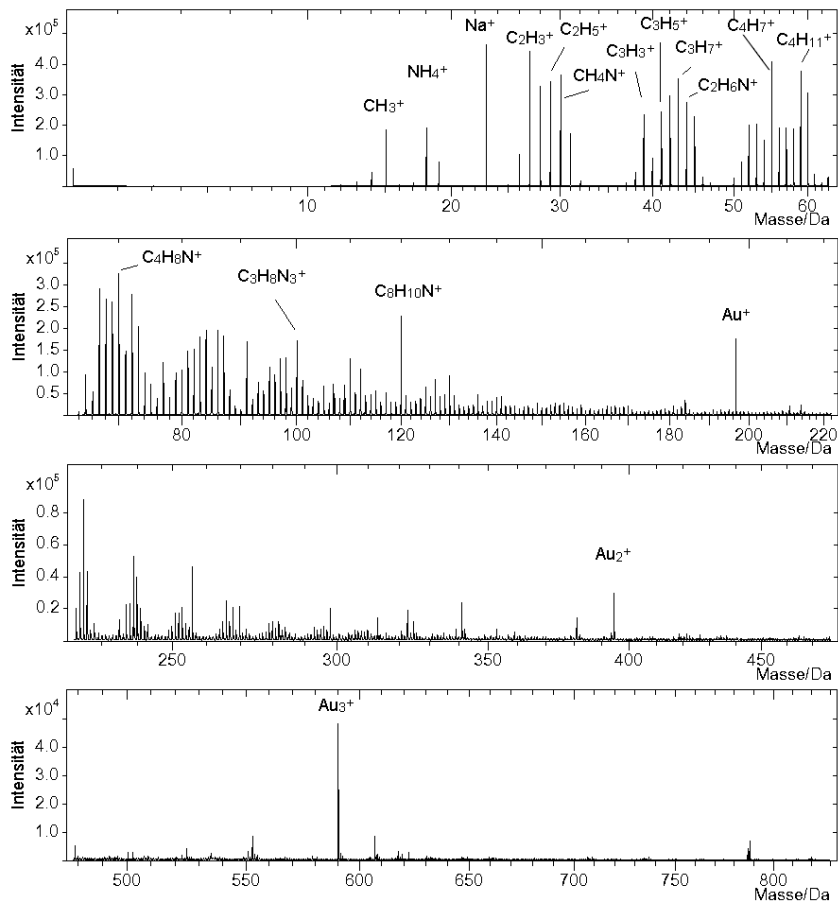
**Abbildung B.3:** Das Massenspektrum des DPPG im pSIMS-Modus entspricht dem von BOURDOS [15] gezeigten. Wie bereits von ihm festgestellt wurde, fehlen in diesem Spektrum kopfgruppenspezifische Sekundärionen. Insofern ist das Massenspektrum des DPPC (vgl. Abb. B.1) von dem hier gezeigten lediglich durch die stickstoffhaltigen Sekundärionen des DPPC zu unterscheiden. Zu beachten ist, dass das Fragment der Masse 551 Da, welches aus dem Glycerolrückgrat in Verbindung mit den beiden Acylgruppen besteht, in beiden Spektren mit vergleichbarer Intensität nachweisbar ist. Unterschiede in der visuellen Wahrnehmung sind auf die unterschiedliche Skalierung der Massenspektren in Bezug auf die Intensität zurückzuführen.

### Massenspektrum des d62DPPG im pSIMS-Modus



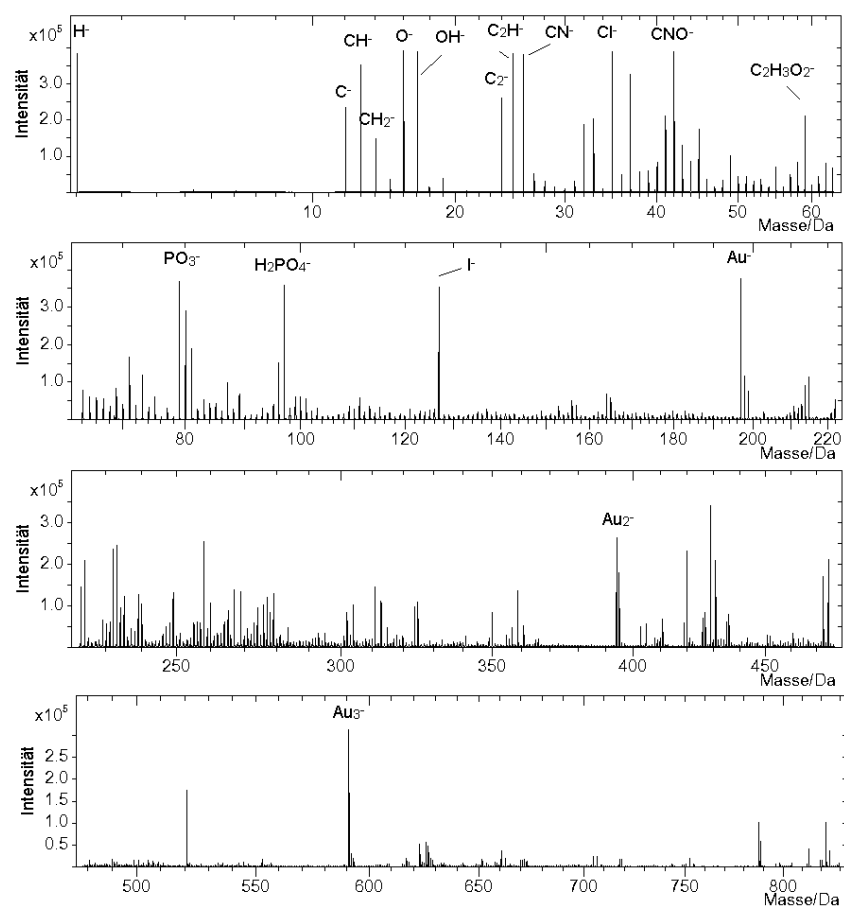
**Abbildung B.4:** Massenspektrum des d62DPPG im pSIMS-Modus. Ein Vergleich dieses Massenspektrums mit dem pSIMS-Massenspektrum des DPPG (vgl. Abb. B.3) zeigt die Verschiebung der Fragmentationen zu höheren Massen aufgrund der Deuterierung des Moleküls auf. Das gezeigte Spektrum ist von dem pSIMS-Spektrum des d75DPPC (vgl. Abb. B.2) nur aufgrund der Kopfgruppenfragmente zu unterscheiden.

## Massenspektrum des SP-B im pSIMS-Modus



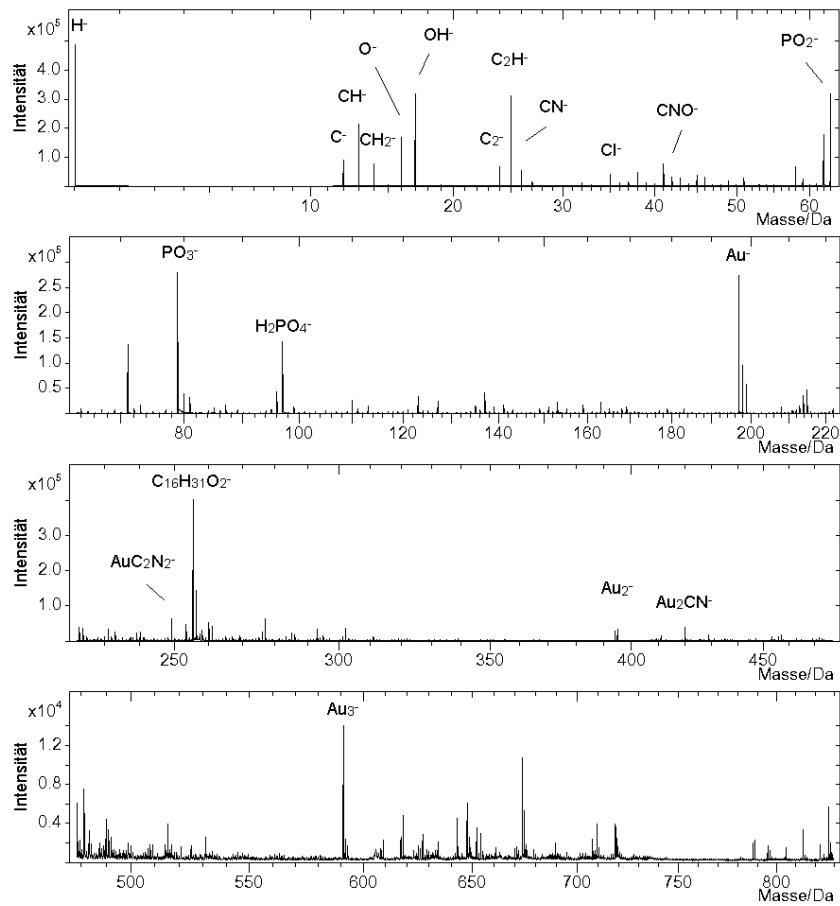
**Abbildung B.5:** Massenspektrum des SP-B im pSIMS-Modus. In diesem Massenspektrum kann das proteinspezifische Fragmentierungsmuster in der ToF-SIMS erkannt werden: Die Peptidbindung wird unter Aufnahme eines Wasserstoffatoms und unter Abgabe des Kohlenstoff und des Sauerstoffatoms der Amidbindung aufgespalten, so dass das jeweilige Aminosäurefragment freigesetzt wird [15]. Somit ist beispielsweise das Fragment der Masse 120 Da der Aminosäure Tryptophan zuzuordnen.

## Massenspektrum des SP-B im nSIMS-Modus



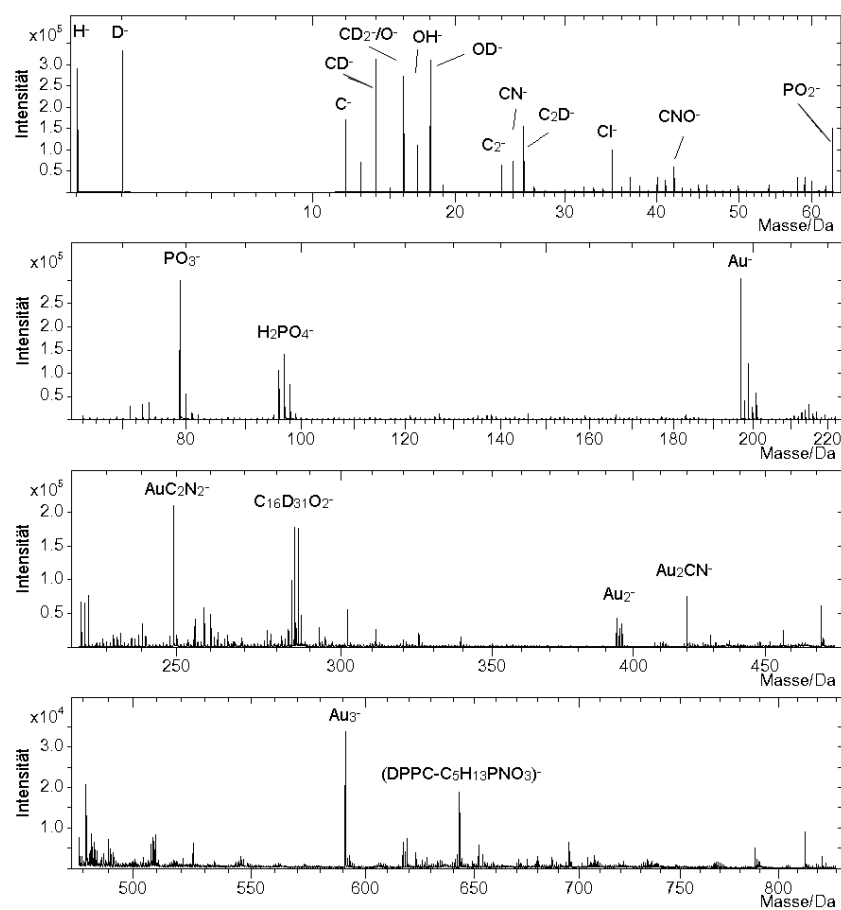
**Abbildung B.6:** Massenspektrum des SP-B im nSIMS-Modus. In diesem Massenspektrum sind neben den stickstoff- und sauerstoffreichen Fragmentationen des Proteins auch die in Kapitel 2 identifizierte Phospholipid-Verunreinigungen der Präparation zu erkennen. Die hier detektierten Chlorid- und Iodid-Anionen werden in ternären Mischungen bevorzugt in Assoziation mit PG vorgefunden, wie dies in Kapitel 4 gezeigt wird.

### Massenspektrum des DPPC im nSIMS-Modus



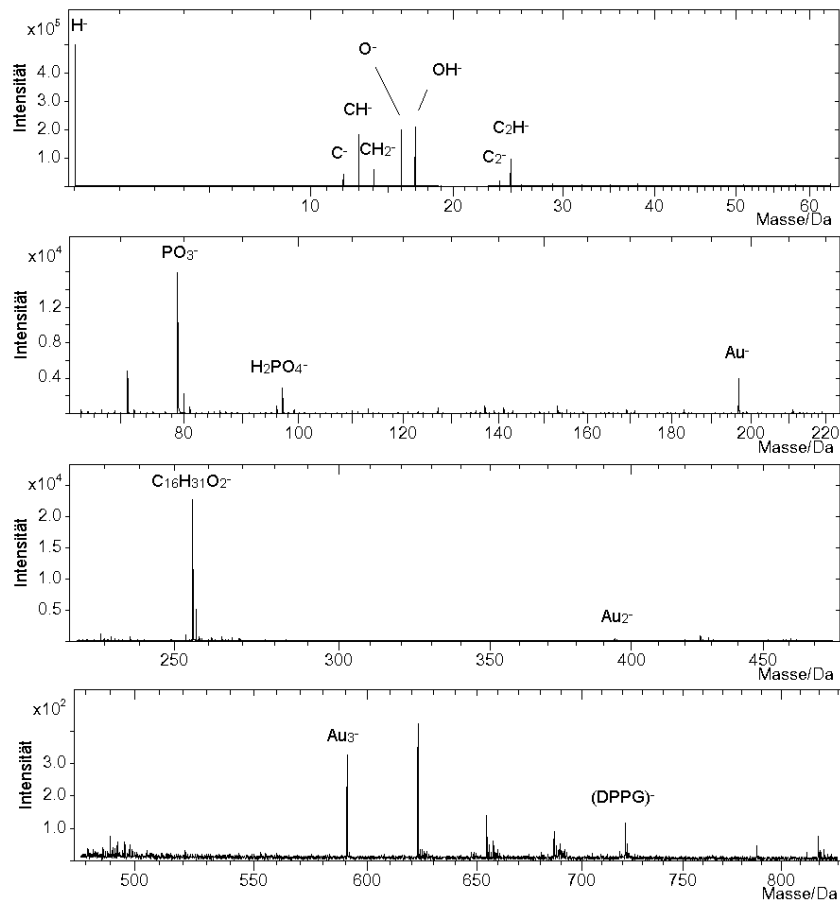
**Abbildung B.7:** Massenspektrum des DPPC im nSIMS-Modus. Das Spektrum entspricht dem von BOURDOS gezeigten [15]. Der Massenpeak bei 255 Da ist das Palmitat-Anion, welches aus der Abspaltung der Acylgruppe des DPPC resultiert.

### Massenspektrum des d75DPPC im nSIMS-Modus



**Abbildung B.8:** Massenspektrum des d75DPPC im nSIMS-Modus. Die Deuterierung dieses Lipids kann anschaulich an der Verschiebung des Signals von der Masse 255 Da zur Masse 286 Da im Vergleich zum nSIMS-Massenspektrum des DPPC gesehen werden. Das Fragmentation der Masse 286 Da wird für deuteriertes Palmitat erwartet.

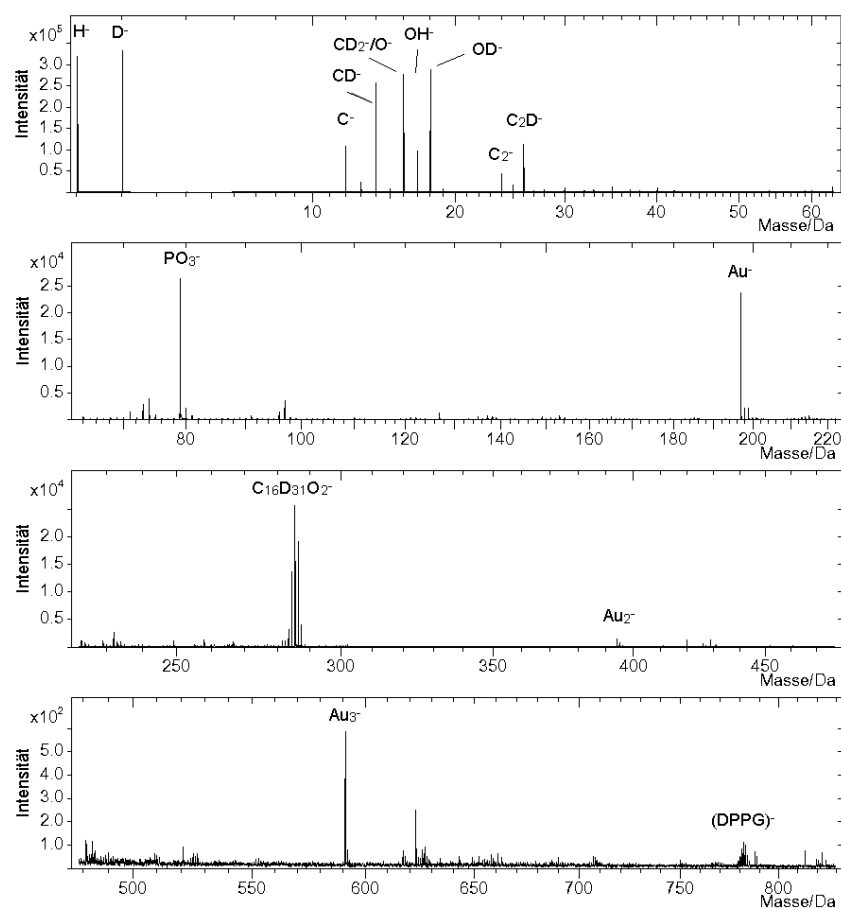
## Massenspektrum des DPPG im nSIMS-Modus



**Abbildung B.9:** Massenspektrum des DPPG im nSIMS-Modus. Wie schon im Vergleich der pSIMS-Massenspektren von DPPC und DPPG gezeigt (vgl. Abb. B.1 und B.3), so sind die beiden Lipide auch in der nSIMS nur anhand der stickstoffhaltigen Sekundärionen zu unterscheiden (vgl. Abb B.7).



### Massenspektrum des d62DPPG im nSIMS-Modus



**Abbildung B.10:** Massenspektrum des d62DPPG im nSIMS-Modus. Wie schon im Vergleich der pSIMS-Massenspektren von d75DPPC und d62DPPG gezeigt (vgl. Abb. B.2 und B.4), so sind die beiden Lipide auch in der nSIMS nur anhand der stickstoffhaltigen Sekundärionen zu unterscheiden (vgl. Abb B.7). Zudem zeigt sich erneut die Verschiebung der höchsten Signalintensitäten zu höheren molekularen Massen im Vergleich zum nSIMS-Massenspektrum des DPPG (vgl. Abb B.9), wie sie mit der Deuterierung des Lipides erklärt werden kann.

## Anhang C

# Kontraste unterschiedlicher Sekundärionen

**Tabelle C.1:** Kontraste der Domänen der DPPC/DPPG-Oberflächenfilme (80:20 mol%) in der pSIMS. +: höhere Ionenausbeute in den Domänen; -: niedrigere Ionenausbeute in den Domänen; 0: kein Kontrast; Ü: übersteuertes Signal.

Ursprungsmolekl	Masse	Summenformel	2 mN/m	30 mN/m
DPPC	58	$C_3H_8N^+$	+	-
	59	$C_3H_9N^+$	K	-
	60	$C_3H_{10}N^+$	+	-
	72	$C_4H_{10}N^+$	+	-
	86	$C_5H_{12}N^+$	+	-
	88	$C_5H_{14}N^+$	+	-
	102	$C_5H_{12}NO^+$	+	-
	104	$C_5H_{14}NO^+$	+	-
	166	$C_5H_{13}PNO_3^+$	K	-
	184	$C_5H_{15}PNO_4^+$	+	-
	735	$(DPPC)^+$	-	K
Calcium	40	$Ca^+$	+	+

**Tabelle C.2:** Kontraste der Domänen der DPPC/DPPG-Oberflächenfilme (80:20 mol%) in der nSIMS. +: höhere Ionenausbeute in den Domänen; -: niedrigere Ionenausbeute in den Domänen; K: kein Kontrast; Ü: übersteuertes Signal.

Ursprungsmolekl	Masse	Summenformel	2 mN/m	30 mN/m
DPPC	26	CN <sup>-</sup>	-	-
	42	CNO <sup>-</sup>	-	-
	183	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> PNO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	-	-
unspezifisch	1	H <sup>-</sup>	+	+
	13	CH <sup>-</sup>	+	+
	16	O <sup>-</sup>	-	+
	17	OH <sup>-</sup>	K	+
	25	C <sub>2</sub> H <sup>-</sup>	K	+
	63	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+	-
	97	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	K	-
	255	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	K	-
Substrat	197	Au <sup>-</sup>	-	K
	394	Au <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-	K
Substrat + DPPC	249	AuC <sub>2</sub> N <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-	-
	420	Au <sub>2</sub> CN <sup>-</sup>	-	-
unbekannt	123		K	-
	143		-	-
	153		+	+
	159		+	-
	177		K	-
	199		K	+
	215		K	+
	221		K	-
	224		-	-
	261		K	+
	277		+	+
339		-	-	
Kontamination	35	Cl <sup>-</sup>	-	-

**Tabelle C.3:** Kontraste der Domänen der DPPC/d62DPPG-Oberflächenfilme (80:20 mol%) in der pSIMS. +: höhere Ionenausbeute in den Domänen; -: niedrigere Ionenausbeute in den Domänen; 0: kein Kontrast; Ü: übersteuertes Signal.

Ursprungsmolekül	Masse	Summenformel	2 mN/m	30 mN/m
DPPC	27	$C_2H_3^+$	-	-
	29	$C_2H_5^+$	-	-
	58	$C_3H_8N^+$	K	-
	86	$C_5H_{12}N^+$	-	-
	88	$C_5H_{14}N^+$	-	-
	166	$C_5H_{13}PNO_3^+$	K	-
	184	$C_5H_{15}PNO_4^+$	+	-
d62DPPG	30	$C_2D_3^+$	K	+
	34	$C_2D_5^+$	+	+
	46	$C_3D_5^+$	+	+
	48	$C_3D_6^+$	+	+
	50	$C_3D_7^+$	+	+
	62	$C_4D_7^+$	+	+
	66	$C_4D_9^+$	K	+
Substrat	197	$Au^+$	-	K
unbekannt	49		+	+

**Tabelle C.4:** Kontraste der Domänen der DPPC/d62DPPG-Oberflächenfilme (80:20 mol%) in der nSIMS. +: höhere Ionenausbeute in den Domänen; -: niedrigere Ionenausbeute in den Domänen; 0: kein Kontrast; Ü: übersteuertes Signal.

Ursprungsmolekül	Masse	Summenformel	2 mN/m	30 mN/m
DPPC	1	H <sup>-</sup>	-	Ü
	26	CN <sup>-</sup>	-	-
	42	CNO <sup>-</sup>	-	K
	183	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> PNO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	-	K
	255	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-	K
d62DPPG	2	D <sup>-</sup>	+	+
	14	CD <sup>-</sup>	+	+
	17	OH <sup>-</sup>	+	+
	18	OD <sup>-</sup>	+	+
unspezifisch	16	O <sup>-</sup> K	-	-
	63	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+	+
	97	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	-	-
unbekannt	159		+	-
	177		K	-
	224		-	K
	277		+	+
Substrat	197	Au <sup>-</sup>	-	K
	394	Au <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-	K
Substrat und DPPC	249	AuC <sub>2</sub> N <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-	K
	420	Au <sub>2</sub> CN <sup>-</sup>	-	-
Kontamination	35	Cl <sup>-</sup>	+	+

**Tabelle C.5:** Kontraste der Domänen der d75DPPC/DPPG-Oberflächenfilme (80:20 mol%) in der pSIMS. +: höhere Ionenausbeute in den Domänen; -: niedrigere Ionenausbeute in den Domänen; 0: kein Kontrast; Ü: übersteuertes Signal.

Ursprungsmolekül	Masse	Summenformel	2 mN/m	30 mN/m
d75DPPC	18	$CD_3^+$	K	-
	30	$C_2D_3^+$	K	-
	34	$C_2D_5^+$	K	-
	46	$C_3D_5^+$	K	-
	50	$C_3D_7^+$	K	-
	62	$C_4D_7^+$	-	-
	66	$C_4D_9^+$	-	-
	68	$C_3D_9^+$	-	-
	98	$C_5D_{12}N^+$	K	-
	118	$C_5D_{14}NO^+$	K	-
	179	$C_5D_{13}PNO_3^+$	-	-
199	$C_5D_{15}PNO_4^+$	K	-	
DPPG	27	$C_2H_3^+$	K	+
	29	$C_2H_5^+$	K	+
	41	$C_3H_5^+$	K	+
	43	$C_3H_7^+$	K	+
unbekannt	55		K	+
	57		-	+
	71		-	+
	163		-	-
	198		-	-
	239		-	-
Substrat	197	$Au^+$	-	K
Kontamination	39	$K^+$	-	+

**Tabelle C.6:** Kontraste der Domänen der d75DPPC/DPPG-Oberflächenfilme (80:20 mol%) in der nSIMS. +: höhere Ionenausbeute in den Domänen; -: niedrigere Ionenausbeute in den Domänen; 0: kein Kontrast, Ü: übersteuertes Signal.

Ursprungsmolekül	Masse	Summenformel	2 mN/m	30 mN/m
d75DPPC	2	D <sup>-</sup>	+	-
	14	CD <sup>-</sup>	+	-
	18	OD <sup>-</sup>	K	-
	26	CN <sup>-</sup>	-	-
	42	CNO <sup>-</sup>	-	-
	74	C <sub>3</sub> D <sub>3</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup>	K	-
	286	C <sub>16</sub> D <sub>31</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	K	-
DPPG	1	H <sup>-</sup>	K	+
	13	CH <sup>-</sup>	K	+
	17	OH <sup>-</sup>	K	+
	25	C <sub>2</sub> H <sup>-</sup>	-	+
	71	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> <sup>-</sup>	K	+
	255	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	K	+
unspezifisch	16	O <sup>-</sup>	K	-
unbekannt	58		K	-
	62		K	+
	98		K	-
	153		K	+
	198		K	+
	325		-	-
Substrat	197	Au <sup>-</sup>	-	K
Substrat und DPPC	420	Au <sub>2</sub> CN <sup>-</sup>	-	-
Kontamination	35	Cl <sup>-</sup>	K	-
	137	I <sup>-</sup>	K	+

**Tabelle C.7:** Kontraste der Domänen der DPPC/DPPG/SP-B-Oberflächenfilme (80:20:0,4 mol%) in der pSIMS. +: höhere Ionenausbeute in den Domänen; -: niedrigere Ionenausbeute in den Domänen; 0: kein Kontrast; Ü: übersteuertes Signal.

Ursprungsmolekül	Masse	Summenformel	30 mN/m	50 mN/m
DPPC	58	$C_3H_8N^+$	+	-
	59	$C_3H_9N^+$	K	-
	86	$C_5H_{12}N^+$	+	-
	87	$C_5H_{13}N^+$	+	-
	102	$C_5H_{12}NO^+$	+	-
	104	$C_5H_{14}NO^+$	+	-
	166	$C_5H_{13}PNO_3^+$	+	-
	184	$C_5H_{15}PNO_4^+$	+	-
	735	$(DPPC)^+$	+	-
	SP-B	18	$NH_4^+$	-
28		$CH_2N^+$	-	-
30		$CH_4N^+$	-	-
44		$C_2H_6N^+$	-	-
70		$C_4H_8N^+$	-	-
72		$C_4H_{10}N^+$	-	-
110		$C_5H_8N_3^+/C_7H_{12}N^+$	-	-
112		$C_5H_{10}N_3^+/C_7H_{14}N^+$	-	-
120		$C_8H_{10}N^+$	-	-
unspezifisch		27	$C_2H_3^+$	+
	29	$C_2H_5^+$	+	K
	41	$C_3H_5^+$	+	K
unbekannt	45		-	-
	68		-	-
	73		-	-
	75		-	K
	84		-	-
	96		-	-
	97		-	-
	98		-	-
	113		-	-
	133		-	-
147		-	-	
Kontamination	23	$Na^+$	+	+
	39	$K^+$	+	+
	40	$Ca^+$	+	+



**Tabelle C.8:** Kontraste der Domänen der DPPC/DPPG/SP-B-Oberflächenfilme (80:20:0,4 mol%) in der nSIMS. +: höhere Ionenausbeute in den Domänen; -: niedrigere Ionenausbeute in den Domänen; 0: kein Kontrast; Ü: übersteuertes Signal.

Ursprungsmolekül	Masse	Summenformel	30 mN/m	50 mN/m
SP-B	26	CN <sup>-</sup>	-	-
	32	S <sup>-</sup>	-	-
	42	CNO <sup>-</sup>	-	-
unspezifisch Lipid	63	PO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+	+
	79	PO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	+	+
	97	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	K	-
unbekannt	75		-	-
	60		-	-
	80		K	-
	81		K	-
	123		K	-
	153		+	+
	159		K	-
	213		+	+
	223		-	-
	224		-	-
	277		+	+
	623		-	-
821		-	-	
1018		-	-	
Substrat und SP-B	420	Au <sub>2</sub> CN <sup>-</sup>	-	-
	426	Au <sub>2</sub> CO <sup>-</sup>	-	-
Kontamination	137	I <sup>-</sup>	-	-

**Tabelle C.9:** Kontraste der Domänen der DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilme (80:20:0,4 mol%) in der pSIMS. +: höhere Ionenausbeute in den Domänen; -: niedrigere Ionenausbeute in den Domänen; 0: kein Kontrast; Ü: übersteuertes Signal.

Ursprungsmolekül	Masse	Summenformel	30 mN/m	50 mN/m
DPPC	86	$C_5H_{12}N^+$	+	-
	102	$C_5H_{12}NO^+$	+	-
	104	$C_5H_{14}NO^+$	+	-
	150	$C_5H_{13}PNO_2^+$	+	-
	166	$C_5H_{13}PNO_3^+$	+	-
	184	$C_5H_{15}PNO_4^+$	+	-
d62DPPG	34	$C_2D_5^+$	+	+
	46	$C_3D_5^+$	+	+
	50	$C_3D_7^+$	+	+
	62	$C_4D_7^+$	+	+
	66	$C_4D_9^+$	+	+
SP-B	28	$CH_2N^+$	-	-
	44	$C_2H_6N^+$	-	-
	70	$C_4H_8N^+$	-	-
	110	$C_5H_8N_3^+/C_7H_{12}N^+$	-	-
	112	$C_5H_{10}N_3^+/C_7H_{14}N^+$	-	-
	120	$C_8H_{10}N^+$	-	K
unbekannt	68		-	-
	69		-	-
	73		-	-
	84		-	-
	147		-	K

**Tabelle C.10:** Kontraste der Domänen der DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilme (80:20:0,4 mol%) in der nSIMS. +: höhere Ionenausbeute in den Domänen; -: niedrigere Ionenausbeute in den Domänen; 0: kein Kontrast; Ü: übersteuertes Signal.

Ursprungsmolekül	Masse	Summenformel	30 mN/m	50 mN/m
DPPC	255	$C_{16}H_{31}O_2^-$	+	-
	97	$H_2PO_4^-$	K	-
d62DPPG	2	$D^-$	+	+
	14	$CD^-$	+	+
	18	$OD^-$	+	+
	286	$C_{16}D_{31}O_2^-$	+	+
SP-B	26	$CN^-$	-	-
	32	$S^-$	-	-
	33	$SH^-$	-	-
	42	$CNO^-$	-	-
unspezifisch Lipid	63	$PO_2^-$	+	Ü
	79	$PO_3^-$	+	Ü
unspezifisch	1	$H^-$	-	Ü
	16	$O^-$	-	Ü
unbekannt	89		-	K
	159		K	-
	224		K	-
	618		-	-
	766		+	K
Substrat + SP-B	249	$AuC_2N_2^-$	-	-
	420	$Au_2CN^-$	-	-
Kontamination	35	$Cl^-$	-	-
	137	$I^-$	+	K

**Tabelle C.11:** Kontraste der Domänen der DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilme (80:20:0,4 mol%) in der pSIMS auf Ca subphase. +: höhere Ionenausbeute in den Domänen; -: niedrigere Ionenausbeute in den Domänen; 0: kein Kontrast; Ü: übersteuertes Signal.

Ursprungsmolekül	Masse	Summenformel	50 mN/m
SP-B	28	$\text{CH}_2\text{N}^+$	-
d62DPPG	34	$\text{C}_2\text{D}_5^+$	+
	46	$\text{C}_3\text{D}_5^+$	+
	50	$\text{C}_3\text{D}_7^+$	+
	62	$\text{C}_4\text{D}_7^+$	+
	66	$\text{C}_4\text{D}_9^+$	+
DPPC	58	$\text{C}_3\text{H}_8\text{N}^+$	+
	59	$\text{C}_3\text{H}_9\text{N}^+$	+
	86	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}^+$	+
	88	$\text{C}_5\text{H}_{14}\text{N}^+$	+
	102	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{NO}^+$	+
	104	$\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NO}^+$	+
	125	$\text{C}_2\text{H}_6\text{PO}_4^+$	+
	166	$\text{C}_5\text{H}_{13}\text{PNO}_3^+$	+
184	$\text{C}_5\text{H}_{13}\text{PNO}_4^+$	+	
unbekannt	41		+
	42		+
	43		+
	81		+
anorganische Kationen	23	$\text{Na}^+$	+
	40	$\text{Ca}^+$	+

**Tabelle C.12:** Kontraste der Domänen der DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilme (80:20:0,4 mol%) in der nSIMS auf Ca subphase. +: höhere Ionenausbeute in den Domänen; -: niedrigere Ionenausbeute in den Domänen; 0: kein Kontrast; Ü: übersteuertes Signal.

Ursprungsmolekül	Masse	Summenformel	50 mN/m
DPPC	255	$C_{16}H_{31}O_2^-$	+
d62DPPG	2	$D^-$	+
	14	$CD^-$	+
	18	$OD^-$	+
	286	$C_{16}D_{31}O_2^-$	+
SP-B	26	$CN^-$	-
	32	$S^-$	-
	33	$SH^-$	-
	42	$CNO^-$	-
unspezifisch Lipid	63	$PO_2^-$	+
unspezifisch	16	$O^-$	+
unbekannt	37		+
	60		-
	61		-
	71		+
	75		-
	81		+
	91		-
	93		+
	95		+
	127		+
	224		-
	232		+
	233		+
	234		+
	235		+
	267		+
	269		+
	271		+
	311		+
Substrat + SP-B	$Au_2CN^-$	420	-
anorganische Anionen	35	$Cl^-$	+
	137	$I^-$	+



# Anhang D

## Abbildungsverzeichnis

1.1	Bronchialbaum der Lunge . . . . .	2
1.2	Alveolenstruktur . . . . .	3
1.3	Epithel der Alveole . . . . .	4
1.4	Schematische Darstellung der Oberflächenspannung . . . . .	6
1.5	Lipidstruktur . . . . .	9
1.6	Lamellar Body und Tubuläres Myelin . . . . .	13
1.7	Oberflächenfilm der Alveole . . . . .	15
1.8	Lipidzusammensetzung des Surfactant . . . . .	17
1.9	Darstellung des SP-A und SP-D . . . . .	20
1.10	Modellierte Struktur des SP-B . . . . .	22
1.11	SP-B/Lipid-Wechselwirkungen . . . . .	26
2.1	Gelfiltrationschromatographische Aufreinigung des hydrophoben Extrakts . . . . .	33
2.2	SDS-Gel der aufgereinigten Surfactant Proteine . . . . .	35
2.3	ESI-MS-Spektrum der SP-C Aufreinigungen . . . . .	36
2.4	ESI-MS-Spektrum der SP-B Aufreinigungen . . . . .	36
2.5	Fluorescamin Test . . . . .	39
2.6	Isothermen reiner Protein-Monoschichten. . . . .	42
3.1	Abhängigkeit der Luftblasengeometrie vom Oberflächendruck in der CBS . . . . .	46
3.2	Schematischer Aufbau eines Captive Bubble Surfactometers . . . . .	48
3.3	DPPC/PG/SP-B-Oberflächenfilme (80:20:0,4 mol %) auf calciumfreier Subphase bei 37 °C . . . . .	55
3.4	DPPC/PG/SP-B-Oberflächenfilme (80:20:0,4 mol %) auf calciumhalti- ger Subphase bei 37 °C . . . . .	56
3.5	DPPC/PG/SP-B-Oberflächenfilme (80:20:0,4 mol %) calciumfreier Sub- phase bei 20 °C . . . . .	56
3.6	DPPC/PG/SP-B-Oberflächenfilme (80:20:0,4 mol %) auf calciumhalti- ger Subphase bei 20 °C . . . . .	57
3.7	DPPC/PG/SP-C-Oberflächenfilme (80:20:3 mol %) auf calciumhaltiger Subphase bei 37 °C . . . . .	57

4.1	Verschiedene kopfgruppen- und acylgruppendeuterierte Lipide, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden . . . . .	63
4.2	Experimenteller Aufbau der Fluoreszenzlichtmikroskopie . . . . .	65
4.3	LANGMUIR-SCHÄFER- und LANGMUIR-BLODGETT-Übertrag. . . . .	65
4.4	Blattfeder eines Rasterkraftmikroskops. . . . .	67
4.5	Schematische Darstellung eines Flugzeit-Sekundärionenmassenspektrometers. . . . .	68
4.6	Aufbau eines Time-of-Flight-Analysators . . . . .	70
4.7	Beispiel für eine ToF-SIMS Oberflächenabbildung . . . . .	73
4.8	Artefakte der ToF-SIMS-Oberflächenabbildungen . . . . .	74
4.9	Bearbeitung einer ToF-SIMS-Oberflächenabbildung. . . . .	76
4.10	Vergleich der nSIMS Massenspektren innerhalb der ersten 20 Da. . . . .	77
4.11	Vergleich der Isothermen von DPPC-Isotopomeren. . . . .	79
4.12	Fluoreszenzmikroskopischer Vergleich von DPPC-Isotopomeren. . . . .	80
4.13	Vergleich der Isothermen von DPPG-Isotopomeren . . . . .	81
4.14	Vergleich der Isothermen von DPPC/DPPG-Mischungen. . . . .	83
4.15	Fluoreszenzmikroskopischer Vergleich von DPPC/DPPG-Mischungen. . . . .	84
4.16	Beobachtung des DPPC/DPPG-Kondensationsprozesses im nSIMS-Modus. . . . .	86
4.17	Beobachtung des DPPC/DPPG-Kondensationsprozesses im pSIMS-Modus. . . . .	87
4.18	Beobachtung des DPPC/d62DPPG-Oberflächenfilms im pSIMS-Modus. . . . .	89
4.19	Beobachtung des DPPC/d62DPPG-Kondensationsprozesses im nSIMS-Modus. . . . .	90
4.20	Beobachtung des d75DPPC/DPPG-Kondensationsprozesses im pSIMS-Modus. . . . .	92
4.21	Beobachtung des d75DPPC/DPPG-Kondensationsprozesses im nSIMS-Modus. . . . .	93
4.22	Vergleich der Isothermen von DPPG/SP-B-Mischungen . . . . .	96
4.23	Vergleich der Isothermen von DPPC/DPPG/SP-B-Mischungen . . . . .	97
4.24	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer DPPC/DPPG/SP-B- sowie einer DPPC/d62DPPG/SP-B-Präparation . . . . .	98
4.25	Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen einer DPPC/d62DPPG/SP-B-Präparation . . . . .	99
4.26	Beobachtung des DPPC/DPPG/SP-B-Oberflächenfilms im nSIMS-Modus. . . . .	102
4.27	Beobachtung des DPPC/DPPG/SP-B-Oberflächenfilms im pSIMS-Modus. . . . .	103
4.28	Beobachtung des DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilms im nSIMS-Modus. . . . .	105
4.29	Beobachtung des DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilms im pSIMS-Modus. . . . .	106
4.30	Isothermen der DPPC/DPPG/SP-B-Oberflächenfilme auf unterschiedlichen Subphasen . . . . .	107
4.31	Beobachtung des DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilms im nSIMS-Modus auf salzhaltiger Subphase. . . . .	109



4.32	Beobachtung des DPPC/DPPG/SP-B-Oberflächenfilms im pSIMS-Modus. . . . .	110
4.33	Beobachtung des DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilms im nSIMS-Modus bei $\vartheta = 37^\circ\text{C}$ . . . . .	111
4.34	Beobachtung des DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilms im pSIMS-Modus bei $\vartheta = 37^\circ\text{C}$ . . . . .	111
4.35	Beobachtung des DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilms ( $\vartheta = 37^\circ\text{C}$ ; NaCl/CaCl <sub>2</sub> -haltige Subphase). . . . .	112
5.1	Kompression von unterschiedlichen POPC-haltigen Oberflächenfilmen in Gegenwart von Vesikeln . . . . .	119
6.1	DIEMELs DSC-Untersuchungen an SP-B/Lipid-Mischungen . . . . .	124
6.2	Mögliche Lipid-Wechselwirkungen von SP-A, SP-B und SP-D in artifiziellem Tubulärem Myelin. . . . .	127
B.1	Massenspektrum des DPPC im pSIMS-Modus . . . . .	138
B.2	Massenspektrum des d75DPPC im pSIMS-Modus . . . . .	139
B.3	Massenspektrum des DPPG im pSIMS-Modus . . . . .	140
B.4	Massenspektrum des d62DPPG im pSIMS-Modus . . . . .	141
B.5	Massenspektrum des SP-B im pSIMS-Modus . . . . .	142
B.6	Massenspektrum des SP-B im nSIMS-Modus . . . . .	143
B.7	Massenspektrum des DPPC im nSIMS-Modus . . . . .	144
B.8	Massenspektrum des d75DPPC im nSIMS-Modus . . . . .	145
B.9	Massenspektrum des DPPG im nSIMS-Modus . . . . .	146
B.10	Massenspektrum des d62DPPG im nSIMS-Modus . . . . .	147

# Anhang E

## Tabellenverzeichnis

2.1	Aus den ESI-MS-Massenspektren rekonstruierte Masse der Protein-Bestandteile der aufgefangenen Fraktionen . . . . .	35
2.2	Molekulare Massen porciner SP-C-Aufreinigungen in der Literatur . .	37
2.3	Molekulare Massen porciner SP-B-Aufreinigungen in der Literatur . .	37
3.1	Stabilität reiner Lipidmonoschichten unter isothermer Kompression . .	52
3.2	Isotherme Kompression von reinen DPPG und POPG Oberflächenfilmen bei verschiedenen Temperaturen . . . . .	52
4.1	Einstellungen des ToF-SIMS-Gerätes bei Oberflächenabbildungen. . .	73
6.1	Vereinbarkeit von Ergebnissen mit unterschiedlichen Wechselwirkungshypothesen des SP-B . . . . .	128
C.1	Kontraste der Domänen der DPPC/DPPG-Oberflächenfilme in der pSIMS . . . . .	148
C.2	Kontraste der Domänen der DPPC/DPPG-Oberflächenfilme in der nSIMS . . . . .	149
C.3	Kontraste der Domänen der DPPC/d62DPPG-Oberflächenfilme in der pSIMS . . . . .	150
C.4	Kontraste der Domänen der DPPC/d62DPPG-Oberflächenfilme in der nSIMS . . . . .	151
C.5	Kontraste der Domänen der d75DPPC/DPPG-Oberflächenfilme in der pSIMS . . . . .	152
C.6	Kontraste der Domänen der d75DPPC/DPPG-Oberflächenfilme in der nSIMS . . . . .	153
C.7	Kontraste der Domänen der DPPC/DPPG/SP-B-Oberflächenfilme in der pSIMS . . . . .	154
C.8	Kontraste der Domänen der DPPC/DPPG/SP-B-Oberflächenfilme in der nSIMS . . . . .	155
C.9	Kontraste der Domänen der DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilme in der pSIMS . . . . .	156
C.10	Kontraste der Domänen der DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilme in der nSIMS . . . . .	157

C.11 Kontraste der Domänen der DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilme in der pSIMS auf Ca subphase . . . . .	158
C.12 Kontraste der Domänen der DPPC/d62DPPG/SP-B-Oberflächenfilme in der nSIMS auf Ca subphase . . . . .	159

# Literaturverzeichnis

- [1] Ahn, V. E.; Faull, K. F.; Whitelegge, J. P.; Fluharty, A. L. und Prive, G. G. (2003): Crystal Structure of Saposin B Reveals a Dimeric Shell for Lipid Binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 38–43.
- [2] Albrecht, O.; Gruler, H. und Sackmann, E. (1978): Polymorphism of Phospholipid Monolayers. *J. Phys.* **39**, 301–313.
- [3] Anderson, D. H.; Sawaya, M. R.; Cascio, D.; Ernst, W.; Modlin, R.; Krensky, A. und Eisenberg, D. (2003): Granulysin Crystal Structure and a Structure-derived Lytic Mechanism. *J. Mol. Biol.* **325**, 355–365.
- [4] Aruga, S.; Kataoka, R. und Mitaku, S. (1985): Interaction Between Calcium and Dipalmitoylphosphatidylcholine Membranes. I. Transition Anomalies of Ultrasonic Properties. *Biophys. Chem.* **21**, 265–275.
- [5] Bachofen, H. und Schürch, S. (2001): Alveolar Surface Forces and Lung Architecture. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* **129**, 183–193.
- [6] Baldyga, D. und Dluhy, R. (1998): On the Use of Deuterated Phospholipids for Infrared Spectroscopic Studies of Monomolecular Films: A Thermodynamic Analysis of Single and Binary Component Phospholipid Monolayers. *Chem. Phys. Lipids* **96**, 81–97.
- [7] Beck, D. C.; Ikegami, M.; Na, C. L.; Zaltash, S.; Johansson, J.; Whitsett, J. A. und Weaver, T. E. (2000): The Role of Homodimers in Surfactant Protein B Function In Vivo. *J. Biol. Chem.* **275**, 3365–3370.
- [8] Benninghoff, A. und Drenkhahn, D. (2003): Anatomie. Band 1: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban und Fischer Verlag, München und Jena.
- [9] Benninghoven, A. (1994): Chemical Analysis of Inorganic and Organic Surfaces and Thin Films Using Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**, 1023–1043.
- [10] Bernhard, W.; Gebert, A.; Vieten, G.; Rau, G. A.; Hohlfeld, J. M.; Postle, A. D. und Freihorst, J. (2001): Pulmonary Surfactant in Birds: Coping With Surface Tension in a Tubular Lung. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **281**, R327–R337.
- [11] Bligh, E. G. und Dyer, W. J. (1959): A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Med. Sci.* **37**, 911–917.

- [12] Böhlen, P.; Stein, S.; Dairman, W. und Udenfriend, S. (1973): Fluorometric Assay of Proteins in the Nanogram Range. *Arch. Biochem. Biophys.* **155**, 213–220.
- [13] Botas, C.; Poulain, F.; Akiyama, J.; Brown, C. und Allen, L. (1998): Altered Surfactant Homeostasis and Alveolar Type II Cell Morphology in Mice Lacking Surfactant Protein D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11869–11874.
- [14] Bourbon, J. R. und Chailley-Heu, B. (2001): Surfactant Proteins in the Digestive Tract, Mesentery, and Other Organs: Evolutionary Significance. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* **129**, 151–161.
- [15] Bourdos, N. (2001): Ortsaufgelöste massenspektrometrische Analyse von Lipid-Protein-Monoschichten als Modell des alveolaren Surfactant. Dissertation, Universität Münster.
- [16] Bourdos, N.; Kollmer, F.; Benninghoven, A.; Ross, M.; Sieber, M. und Galla, H. J. (2000): Analysis of Lung Surfactant Model Systems With Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry. *Biophys. J.* **79**, 357–369.
- [17] Bourdos, N.; Kollmer, F.; Benninghoven, A.; Sieber, M. und Galla, H. J. (2000): Imaging of Domain Structures in a One-Component Lipid Monolayer by Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry. *Langmuir* **16**, 1481–1484.
- [18] Boutilier, R. G. (1990): Vertebrate Gas Exchange: From Environment to Cell. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- [19] Braunitzer, G.; Schrank, B.; Stangl, A. und Scheithauer, U. (1978): [Hemoglobins, XXI: Sequence Analysis of Porcine Hemoglobin (author's transl)]. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **359**, 137–146.
- [20] Brouwers, J. F.; Gadella, B. M.; van Golde, L. M. und Tielens, A. G. (1998): Quantitative Analysis of Phosphatidylcholine Molecular Species Using HPLC and Light Scattering Detection. *J. Lipid Res.* **39**, 344–353.
- [21] Bunger, H. H.; Kaufner, L. und Pison, U. (2000): Quantitative Analysis of Hydrophobic Pulmonary Surfactant Proteins by High-Performance Liquid Chromatography with Light-Scattering Detection. *J. Chromatogr. A* **870**, 363–369.
- [22] Chang, R. und Poulain, F. (1998): Analysis of Binding and Membrane Destabilization of Phospholipid Membranes by Surfactant Apoprotein B. *Biochim. Biophys. Acta* **1371**, 254–264.
- [23] Clark, J.; Wert, S.; Bachurski, C.; Stahlman, M.; Stripp, B.; Weaver, T. E. und Whitsett, J. (1995): Targeted Disruption of the Surfactant Protein B Gene Disrupts Surfactant Homeostasis, Causing Respiratory Failure in Newborn Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7794–7798.
- [24] Clements, J. A. (1957): Surface Tension of Lung Extracts. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **95**, 170–172.
- [25] Codd, J. R.; Schuerch, S.; Daniels, C. B. und Orgeig, S. (2002): Topor-associated Fluctuations in Surfactant Activity in Gould's Wattled Bat. *Biochim. Biophys. Acta* **1580**, 57–66.

- [26] Condon, J. C.; Jeyasuria, P.; Faust, J. M. und Mendelson, C. R. (2004): Surfactant Protein Secreted by the Maturing Mouse Fetal Lung Acts as a Hormone That Signals the Initiation of Parturition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 4978–4983.
- [27] Crane, J. M. und Hall, S. B. (2001): Rapid Compression Transforms Interfacial Monolayers of Pulmonary Surfactant. *Biophys. J.* **80**, 1863–1872.
- [28] Crane, J. M.; Pütz, G. und Hall, S. B. (1999): Persistence of Phase Coexistence in Disaturated Phosphatidylcholine Monolayers at High Surface Pressure. *Biophys. J.* **77**, 3134–3143.
- [29] Creuwels, L.; van Golde, L. M. und Haagsman, H. P. (1996): Surfactant Protein B: Effects on Lipid Domain Formation and Intermembrane Lipid Flow. *Biochim. Biophys. Acta* **1285**, 1–8.
- [30] Crouch, E. C. (2000): Surfactant Protein-D and Pulmonary Host Defense. *Respir. Res.* **1**, 93–108.
- [31] Crowe, J. H.; Hoekstra, F. A.; Nguyen, K. H. und Crowe, L. M. (1996): Is Vitrification Involved in Depression of the Phase Transition Temperature in Dry Phospholipids? *Biochim. Biophys. Acta* **1280**, 187–196.
- [32] Cruz, A.; Casals, C.; Keough, K. M. W. und Perez-Gil, J. (1997): Different Modes of Interaction of Pulmonary Surfactant Protein SP-B in Phosphatidylcholine Bilayers. *Biochem. J.* **327**, 133–138.
- [33] Cruz, A.; Casals, C.; Plasencia, I.; Marsh, D. und Perez-Gil, J. (1998): Depth Profiles of Pulmonary Surfactant Protein B in Phosphatidylcholine Bilayers, Studied by Fluorescence and Electron Spin Resonance Spectroscopy. *Biochemistry* **37**, 9488–9496.
- [34] Curstedt, T.; Johansson, J.; Barros-Soderling, J.; Robertson, B.; Nilsson, G.; Westberg, M. und Jornvall, H. (1988): Low-Molecular-Mass Surfactant Protein Type 1. The Primary Structure of a Hydrophobic 8-kDa Polypeptide With Eight Half-Cysteine Residues. *Eur. J. Biochem.* **172**, 521–525.
- [35] Curstedt, T.; Johansson, J.; Persson, P.; Eklund, A.; Robertson, B.; Löwenadler, B. und Jörnvall, H. (1990): Hydrophobic Surfactant-Associated Polypeptides: SP-C is a Lipopeptide with two Palmitoylated Cysteine Residues, whereas SP-B Lacks Covalently Linked Fatty Acyl Groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2984–2989.
- [36] Curstedt, T.; Jornvall, H.; Robertson, B.; Bergman, T. und Berggren, P. (1987): Two Hydrophobic Low-Molecular-Mass Protein Fractions of Pulmonary Surfactant. *Eur. J. Biochem.* **168**, 255–262.
- [37] Daniels, C. B.; Lopatko, O. V. und Orgeig, S. (1998): Evolution of Surface Activity Related Functions of Vertebrate Pulmonary Surfactant. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **25**, 716–721.
- [38] Daniels, C. B.; Orgeig, S.; Smits, A. W. und Miller, J. D. (1996): The Influence of Temperature, Phylogeny, and Lung Structure on the Lipid Composition of Reptilian Pulmonary Surfactant. *Exp. Lung Res.* **22**, 267–281.

- [39] Davis, P. J.; Fleming, B. D.; Coolbear, K. P. und Keough, K. M. W. (1981): Gel to liquid-crystalline transition temperatures of water dispersions of two pairs of positional isomers of unsaturated mixed-acid phosphatidylcholines. *Biochemistry* **20**, 3633–3636.
- [40] Deetjen, P. und Speckmann, E.-J. (1994): Physiologie. Urban und Schwarzenberg, Schwarzenberg.
- [41] DeSchryver-Kecsckemeti, K.; Eliakim, R.; Carroll, S.; Stenson, W. F.; Moxley, M. A. und Alpers, D. H. (1989): Intestinal Surfactant-like Material. A Novel Secretory Product of the Rat Enterocyte. *J. Clin. Invest.* **84**, 1355–1361.
- [42] Diemel, R. V.; Bader, D.; Walch, M.; Hotter, B.; van Golde, L. M.; Amann, A.; Haagsman, H. P. und Pütz, G. (2001): Functional Tests for the Characterization of Surfactant Protein B (SP-B) and a Fluorescent SP-B Analog. *Arch. Biochem. Biophys.* **385**, 338–347.
- [43] Diemel, R. V.; Snel, M. M.; Waring, A. J.; Walther, F. J.; van Golde, L. M.; Pütz, G.; Haagsman, H. P. und Batenburg, J. J. (2002): Multilayer Formation upon Compression of Surfactant Monolayers Depends on Protein Concentration as well as Lipid Composition. An Atomic Force Microscopy Study. *J. Biol. Chem.* **277**, 21179–21188.
- [44] Diemel, R. V.; Snel, M. M. E.; van Golde, L. M. G.; Pütz, G.; Haagsman, H. P. und Batenburg, J. J. (2002): Effects of Cholesterol on Surface Activity and Surface Topography of Spread Surfactant Films. *Biochemistry* **41**, 15007–15016.
- [45] Dixon, G.; Black, S.; Butler, C. und Jain, A. (1982): . *Anal. Biochem.* **121**, 55–61.
- [46] Edwards, Y. S. (2001): Stretch Stimulation: Its Effects on Alveolar Type II Cell Function in the Lung. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* **129**, 245–60.
- [47] Eliakim, R.; DeSchryver-Kecsckemeti, K.; Noguee, L.; Stenson, W. F. und Alpers, D. H. (1989): Isolation and Characterization of a Small Intestinal Surfactant-like Particle Containing Alkaline Phosphatase and Other Digestive Enzymes. *J. Biol. Chem.* **264**, 20614–20619.
- [48] Enhorning, G. (1977): Pulsating Bubble Technique for Evaluating Pulmonary Surfactant. *J. Appl. Physiol.* **43**, 198–203.
- [49] Folch, J.; Lees, M. und Stanley, G. H. S. (1957): A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509.
- [50] Frerking, I.; Gunther, A.; Seeger, W. und Pison, U. (2001): Pulmonary Surfactant: Functions, Abnormalities and Therapeutic Options. *Intensive Care Med.* **27**, 1699–1717.
- [51] Garidel, P.; Johann, C.; Mennike, L. und Blume, A. (1997): The Mixing Behaviour of Pseudobinary Phosphatidylcholine-Phosphatidylglycerol as a Function of pH and Chain Length. *Eur. Biophys.* **26**, 447–459.

- [52] Gerlach, H. (2001): Therapie des ARDS. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **126**, 1173–1177.
- [53] Glasser, S. W.; Burhans, M.; Korfhagen, T.; Na, C.; Sly, P.; Ross, G.; Ikegami, M. und Whitsett, J. A. (2003): Pneumonitis and Emphysema in SP-C Gene Targeted Mice. *J. Biol. Chem.* **278**, 14291–14298.
- [54] Glasser, S. W.; Detmer, E. A.; Ikegami, M.; Na, C. L.; Stahlman, M. T. und Whitsett, J. A. (2003): Pneumonitis and Emphysema in SP-C Gene Targeted Mice. *J. Biol. Chem.* **278**, 14291–14298.
- [55] Gnanaratnem, J. und Finer, N. N. (2000): Neonatal Acute Respiratory Failure. *Curr. Opin. Pediatr.* **12**, 227–232.
- [56] Goerke, J. (1998): Pulmonary Surfactant: Functions and Molecular Composition. *Biochim. Biophys. Acta* **1408**, 79–89.
- [57] Goerke, J. und Gonzales, J. (1981): Temperature Dependence of Dipalmitoyl Phosphatidylcholine Monolayer Stability. *J. Appl. Physiol.* **51**(5), 1108–1114.
- [58] Griffiths, W. J.; Gustafsson, M.; Yang, Y.; Curstedt, T.; Sjoval, J. und Johansson, J. (1998): Analysis of Variant Forms of Porcine Surfactant Polypeptide-C by Nano-electrospray Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **12**, 1104–1114.
- [59] Guard-Friar, D.; Chen, C. H. und Engle, A. S. (1985): Deuterium Isotope Effect on the Stability of Molecules: Phospholipids. *J. Phys. Chem.* **89**, 1810–1813.
- [60] Gustafsson, M.; Curstedt, T.; Jornvall, H. und Johansson, J. (1997): Reverse-Phase HPLC of the Hydrophobic Pulmonary Surfactant Proteins: Detection of a Surfactant Protein C Isoform Containing Nepsilon-Palmitoyl-Lysine. *Biochem. J.* **326** ( Pt 3), 799–806.
- [61] Haagsman, H. P. und Diemel, R. V. (2001): Surfactant-associated Proteins: Functions and Structural Variation. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* **129**, 91–108.
- [62] Haagsman, H. P.; Hawgood, S.; Sargeant, T.; Buckley, D.; White, R. T.; Drickamer, K. und Benson, B. J. (1987): The Major Lung Surfactant Protein, SP 28-36, is a Calcium-Dependent, Carbohydrate-binding Protein. *J. Biol. Chem.* **262**, 13877–13880.
- [63] Hagenhoff, B. (1993): Sekundärionenmassenspektrometrie molekularer Oberflächenstrukturen. Dissertation, Universität Münster.
- [64] Hagenhoff, B. (2000): High Resolution Surface Analysis by ToF-SIMS. *Mikrochim. Acta* **132**, 259–271.
- [65] Hagenhoff, B. und Rading, D. (1998): Ion Beam Techniques: Surface Mass Spectrometry. In Riviere, J. und Myhra, S. (Hg.) *Handbook of Surface and Interface Analysis.*, Marcel Dekker Inc., New York. 209–253.
- [66] Harbottle, R. R.; Nag, K.; McIntyre, N. S.; Possmayer, F. und Petersen, N. O. (2003): Molecular Organization Revealed by Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry of a Clinically Used Extracted Pulmonary Surfactant. *Langmuir* **19**, 3698–3704.



- [67] Hawco, H. W.; Davis, P. J. und Keough, K. M. W. (1981): Lipid Fluidity in Lung Surfactant: Monolayers of Saturated and Unsaturated Lecithins. *J. Appl. Physiol.* **51**, 509–515.
- [68] Hawgood, S.; Derrick, M. und Poulain, F. (1998): Structure and Properties of Surfactant Protein B. *Biochim. Biophys. Acta* **1408**, 150–160.
- [69] Heerklotz, H. (2004): The Microcalorimetry of Lipid Membranes. *J. Phys.: Condens. Matter* **16**, R441–R467.
- [70] Hinz, A. (2003): Insights into Viral Membrane Penetration. Schöling Verlag, Münster.
- [71] Holleman, A. F. und Wiberg, E. (1995): Lehrbuch der anorganischen Chemie. de Gruyter, Berlin.
- [72] Ikegami, M. und Jobe, A. (1998): Surface Protein Metabolism in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **1408**, 218–225.
- [73] Iontof GmbH (2002): Product Information ToF-SIMS IV. Iontof GmbH, Münster.
- [74] Iontof GmbH (2004): Homepage. Online im Internet: [www.iontof.de](http://www.iontof.de).
- [75] Johansson, J. (1998): Structure and Properties of Surfactant Protein C. *Biochim. Biophys. Acta* **1408**, 161–172.
- [76] Johansson, J.; Curstedt, T. und Jornvall, H. (1991): Surfactant Protein B: Disulfide Bridges, Structural Properties, and Kringle Similarities. *Biochemistry* **30**, 6917–6921.
- [77] Johansson, J.; Szyperski, T.; Curstedt, T. und Wuthrich, K. (1994): The NMR Structure of the Pulmonary Surfactant-Associated Polypeptide SP-C in an A polar Solvent Contains a Valyl-rich alpha-Helix. *Biochemistry* **33**, 6015–6023.
- [78] Kataoka, R.; Aruga, S.; Mitaku, S.; Kinoshita, K. und Ikegami, A. (1985): Interaction between Ca<sup>2+</sup> and Dipalmitoylphosphatidylcholine Membranes. II. Fluorescence Anisotropy Study. *Biophys. chem.* **21**, 277–284.
- [79] Kersting, R. (2002): Sekundionen-Massenspektrometrie an molekularen Schichten auf Polymer substraten. Dissertation, Universität Münster.
- [80] Klein, S. (2003): Wie der Geist den Körper heilt. *Geo Magazin* **10**, 28–43.
- [81] Klump, H. H.; Gaber, B. P.; Petcolas, W. L. und Yager, P. (1981): Thermodynamic Properties of Mixtures of Deuterated and Undeuterated Dipalmitoyl phosphatidylcholines (Differential Scanning Calorimetry/Lipid Bilayers/Membranes). *Thermochim. Acta* **48**, 361–366.
- [82] Knebel, D.; Sieber, M.; Reichelt, R.; Galla, H.-J. und Amrein, M. (2002): Fluorescence Light Microscopy of Pulmonary Surfactant at the Air-Water Interface of an Air Bubble of Adjustable Size. *Biophys. J.* **83**, 547–555.
- [83] Knebel, D.; Sieber, M.; Reichelt, R.; Galla, H.-J. und Amrein, M. (2002): Scanning Force Microscopy at the Air-Water Interface of an Air Bubble Coated with Pulmonary Surfactant. *Biophys. J.* **82**, 474–480.

- [84] Korfhagen, T. R.; Bruno, M. D.; Glasser, S. W.; Ciruolo, P. J.; Whitsett, J. A.; Lattier, D. L.; Wikenheiser, K. A. und Clark, J. C. (1992): Murine Pulmonary Surfactant SP-A Gene: Cloning, Sequence, and Transcriptional Activity. *Am. J. Physiol.* **263**, L546–L554.
- [85] Korfhagen, T. R.; Bruno, M. D.; Ross, G. F.; Huelsman, K. M.; Ikegami, M.; Jobe, A. H.; Wert, S. E.; Stripp, B. R.; Morris, R. E.; Glasser, S. W.; Bachurski, C. J.; Iwamoto, H. S. und Whitsett, J. A. (1996): Altered Surfactant Function and Structure in SP-A Gene Targeted Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9594–9599.
- [86] Korfhagen, T. R.; LeVine, A. M. und Whitsett, J. A. (1998): Altered Surfactant Function and Structure in SP-A Gene Targeted Mice. *Biochim. Biophys. Acta* **1408**, 296–302.
- [87] Krol, S. (2000): Biophysikalische Untersuchung der hydrophoben Bestandteile des pulmonaren Surfactants. *Dissertation* .
- [88] Krol, S.; Ross, M.; Sieber, M.; Künneke, S.; Galla, H.-J. und Janshoff, A. (2000): Formation of three Dimensional Protein-Lipid Aggregates in Monolayer Films Induced by Surfactant Protein B. *Biophys. J.* **79**, 904–918.
- [89] Leonard, D. und Mathieu, H. J. (1999): Characterisation of Biomaterials Using ToF-SIMS. *Fresenius J. Anal. Chem.* **365**, 3–11.
- [90] Leufgen, K. M.; Rulle, H.; Benninghoven, A.; Sieber, M. und Galla, H. J. (1996): Imaging Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Allows Visualization and Analysis of Coexisting Phases in Langmuir-Blodgett Films. *Langmuir* **12**, 1708–1711.
- [91] LeVine, A. M.; Kurak, K.; Bruno, M. D.; Stark, J.; Whitsett, J. A. und Korfhagen, T. R. (1998): Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **19**, 700–708.
- [92] Lide, D. (1999): Handbook of Chemistry and Physics. CRC Print, Cleveland.
- [93] Liepinsh, E.; Andersson, M.; Ruysschaert, J. M. und Otting, G. (1997): Saposin Fold Revealed by the NMR Structure of NK-lysin. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 793–795.
- [94] Lin, S.; Na, C. L.; Akinbi, H. T.; Apsley, K. S.; Whitsett, J. A. und Weaver, T. E. (1999): Surfactant protein B (SP-B)  $-/-$  mice are Rescued by Restoration of SP-B Expression in Alveolar Type II Cells but not Clara Cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 19168–19174.
- [95] Lopatko, O. V.; Orgeig, S.; Daniels, C. B. und Palmer, D. (1998): Alterations in the Surface Properties of Lung Surfactant in the Torpid Marsupial *Sminthopsis crassicaudata*. *J. Appl. Physiol.* **84**, 146–156.
- [96] Lopatko, O. V.; Orgeig, S.; Palmer, D.; Schürch, S. und Daniels, C. B. (1999): Alterations in Pulmonary Surfactant after Rapid Arousal from Torpor in the Marsupial *Sminthopsis crassicaudata*. *J. Appl. Physiol.* **86**, 1959–1970.
- [97] Lottspeich, F. (1998): Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

- [98] Ma, J.; Koppenol, S.; Yu, H. und Zografi, G. (1998): Effects of a Cationic and Hydrophobic Peptide, KL4, on Model Lung Surfactant Lipid Monolayers. *Biophys. J.* **74**, 1899–1907.
- [99] Malcharek, S.; Hilterhaus, L.; Hinz, A. und Galla, H. J. (2004): Formation of Multilayer Structures in Lipid Monolayer Films Containing Surfactant Protein C: Effects of Cholesterol and POPE. *Biophys. J.* , submitted for publication.
- [100] Marsh, D. (2003): Lipid interactions with transmembrane proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 1575–1580.
- [101] McConnell, H. M. (1991): Structures and Transitions in Lipid Monolayers at the Air-Water Interface. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **42**, 171–195.
- [102] McCormack, F. X. und Whitsett, J. A. (2002): The Pulmonary Collectins, SP-A and SP-D, Orchestrate Innate Immunity in the Lung. *J. Clin. Invest.* **109**, 707–712.
- [103] Meban, C. (1981): Effect of Lipids and Other Substances on the Adsorption of Dipalmitoylphosphatidylcholine. *Pediatr. Res.* **15**, 1029–1031.
- [104] Morrow, M. R.; Perez-Gil, J.; Simatos, G.; Boland, C.; Stewart, J.; Absolom, D.; Sarin, V. und Keough, K. M. (1993): Pulmonary Surfactant-associated Protein SP-B Has Little Effect on Acyl Chains in Dipalmitoylphosphatidylcholine Dispersions. *Biochemistry* **32**, 4397–4402.
- [105] Morse, R.; Ma, L. D.; Magin, R. L. und Dunn, F. (1999): Ultrasound Interaction with Large Unilamellar Vesicles at the Phospholipid Phase Transition: Perturbation by Phospholipid Side Chain Substitution with Deuterium. *Chem. Phys. Lipids* **103**, 1–10.
- [106] Nag, K.; Munro, J. G.; Hearn, S. A.; Rasmusson, J.; Petersen, N. O. und Possmayer, F. (1999): Correlated Atomic Force and Transmission Electron Microscopy of Nanotubular Structures in Pulmonary Surfactant. *J. Struct. Biol.* **126**, 1–15.
- [107] Nag, K.; Munro, J. G.; Inchley, K.; Schürch, S.; Petersen, N. O. und Possmayer, F. (1999): SP-B Refining of Pulmonary Surfactant Phospholipid Films. *Am. J. Physiol.* **277**, L1179–L1189.
- [108] Nag, K.; Taneva, S. G.; Perez-Gil, J.; Cruz, A. und Keough, K. M. (1997): Combinations of Fluorescently Labeled Pulmonary Surfactant Proteins SP- B and SP-C in Phospholipid Films. *Biophys. J.* **72**, 2638–2650.
- [109] Nakorn, P. N.; Flach, C. R.; Mendelsohn, R. und Galla, H.-J. (2004): The Influence of Truncated Surfactant Protein C (SP-C17) on the Surface Properties of Lipid-monolayers at the Air-Water-Interface. *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology* **13**, 62–63.
- [110] Netter, F. H. (1982): Farbatlanten der Medizin. Band 4: Atmungsorgane. Thieme Verlag, Stuttgart.
- [111] New, R. (1992): Liposomes - a Practical Approach. IRL Press, Oxford.

- [112] Niehuis, E. (1988): Entwicklung und Anwendung von hochauflösenden Flugzeitspektrometern für die statische Sekundärionen-Massenspektrometrie. Dissertation, Universität Münster.
- [113] Noguee, L. M. (1998): Genetics of the Hydrophobic Surfactant Proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1408**, 323–333.
- [114] Olafson, R. W.; Rink, U.; Kielland, S.; Yu, S. H.; Chung, J.; Harding, P. G. und Possmayer, F. (1987): Protein Sequence Analysis Studies on the Low Molecular Weight Hydrophobic Proteins Associated with Bovine Pulmonary Surfactant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**, 1406–1411.
- [115] Oosterlaken-Dijksterhuis, M. A.; Haagsman, H. P.; van Golde, L. M. und Demel, R. A. (1991): Characterization of Lipid Insertion into Monomolecular Layers Mediated by Lung Surfactant Proteins SP-B and SP-C. *Biochemistry* **30**, 10965–10971.
- [116] Oosterlaken-Dijksterhuis, M. A.; Haagsman, H. P.; van Golde, L. M. und Demel, R. A. (1991): Interaction of Lipid Vesicles with Monomolecular Layers Containing Lung Surfactant Proteins SP-B or SP-C. *Biochemistry* **30**, 8276–8281.
- [117] Oosterlaken-Dijksterhuis, M. A.; van Eijk, M.; van Buel, B. L.; van Golde, L. M. und Haagsman, H. P. (1991): Surfactant Protein Composition of Lamellar Bodies Isolated From Rat Lung. *Biochem. J.* **274**, 115–119.
- [118] Orgeig, S.; Barr, H. A. und Nicholas, T. E. (1995): Effect of Hyperpnea on the Cholesterol to Disaturated Phospholipid Ratio in Alveolar Surfactant of Rats. *Exp. Lung. Res.* **21**, 157–174.
- [119] Oviedo, J. M.; Valino, F.; Plasencia, I.; Serrano, A. G.; Casals, C. und Perez-Gil, J. (2001): Quantitation of Pulmonary Surfactant Protein SP-B in the Absence or Presence of Phospholipids by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Anal. Biochem.* **293**, 78–87.
- [120] Paananen, R.; Glumoff, V.; Sormunen, R.; Voorhout, W. und Hallman, M. (2001): Expression and Localization of Lung Surfactant Protein B in Eustachian Tube Epithelium. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **280**, L214–L220.
- [121] Palaniyar, N.; Ikegami, M.; Korfhagen, T.; Whitsett, J. und McCormack, F. X. (2001): Domains of Surfactant Protein A that Affect Protein Oligomerization, Lipid Structure and Surface Tension. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* **129**, 109–127.
- [122] Palaniyar, N.; Ridsdale, R. A.; Hearn, S. A.; Possmayer, F. und Harauz, G. (1999): Formation of Membrane Lattice Structures and their Specific Interactions with Surfactant Protein A. *Am. J. Physiol.* **276**, L642–L649.
- [123] Perez-Gil, J. (2001): Lipid-protein Interactions of Hydrophobic Proteins SP-B and SP-C in Lung Surfactant Assembly and Dynamics. *Pediatr. Pathol. Mol. Med.* **20**, 445–469.
- [124] Perez-Gil, J.; Casals, C. und Marsh, D. (1995): Interactions of Hydrophobic Lung Surfactant Proteins SP-B and SP-C with Dipalmitoylphosphatidylcholine and Dipalmitoylphosphatidylglycerol Bilayers Studied by Electron Spin Resonance Spectroscopy. *Biochemistry* **34**, 3964–3971.

- [125] Perez-Gil, J. und Keough, K. M. (1998): Interfacial Properties of Surfactant Proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1408**, 203–217.
- [126] Perkins, W. R.; B.Dause, R.; Parente, R. A.; Minchey, S. R.; Neuman, K. C.; Gruner, S. M.; Taraschi, T. F. und Janoff, A. S. (1996): Role of lipid polymorphism in pulmonary surfactant. *Science* **273**, 330–332.
- [127] Pharmacia-Biotech (2004): Sephadex LH-60: Data File 18-1108-79. *Product Information*, 1–3.
- [128] Piknova, B.; Schief, W. R.; Vogel, V.; Discher, B. M. und Hall, S. B. (2001): Discrepancy Between Phase Behaviour of Lung Surfactant Phospholipids and the Classical Model of Surfactant Function. *Biophys. J.* **81**, 2172–2180.
- [129] Possmayer, F. (1988): A Proposed Nomenclature for Pulmonary Surfactant-associated Proteins. *Am. Rev. Respir. Dis.* **138**, 990–998.
- [130] Possmayer, F.; Nag, K.; Rodriguez, K.; Qanbar, R. und Schürch, S. (2001): Surface Activity in Vitro: Role of Surfactant Proteins. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* **129**, 209–220.
- [131] Poulain, F. R.; Akiyama, J.; Allen, L.; Brown, C.; Chang, R.; Goerke, J.; Dobbs, L. und S.Hawgood (1999): Ultrastructure of phospholipid mixtures reconstituted with surfactant proteins B and D. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20**, 1049–1058.
- [132] Power, J. H. T.; Doyle, I. R.; Davidson, K. und Nicholas, T. E. (1999): Ultrastructural and Protein Analysis of Surfactant in the Australian Lungfish *Neoceratodus Forsteri*: Evidence for Conservation of Composition For 300 Million Years. *J. Exp. Biol.* **202**, 2543–2550.
- [133] Pütz, G.; Goerke, J.; Schürch, S. und Clements, J. A. (1994): Evaluation of Pressure-driven Captive Bubble Surfactometer. *J. Appl. Physiol.* **76**, 1417–1424.
- [134] Pütz, G.; Taeusch, H. W. und Clements, J. A. (1994): Comparison of Captive and Pulsating Bubble Surfactometers with Use of Lung Surfactants. *J. Appl. Physiol.* **76**, 1425–1431.
- [135] Pütz, G.; Walch, M.; Eijk, M. V. und Haagsman, H. P. (1998): A Spreading Technique for Forming Film in a Captive Bubble. *Biophys. J.* **75**, 2229–2239.
- [136] Robertson, B.; Kobayashi, T.; Ganzuka, M.; Grossmann, G.; Li, W. Z. und Suzuki, Y. (1991): Experimental Neonatal Respiratory Failure Induced by a Monoclonal Antibody to the Hydrophobic Surfactant-Associated Protein SP-B. *Pediatr. Res.* **30**, 239–243.
- [137] Rooney, S. A. (2001): Regulation of Surfactant Secretion. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* **129**, 233–243.
- [138] Ross, M.; Krol, S.; Janshoff, A. und Galla, H. J. (2002): Kinetics of Phospholipid Insertion into Monolayers Containing the Lung Surfactant Proteins SP-B or SP-C. *Eur. Biophys. J.* **31**, 52–61.

- [139] Rouser, G.; Siakotos, A. N. und Fleischer, S. (1966): Quantitative Analysis of Phospholipids by Thin-layer Chromatography and Phosphorus Analysis of Spots. *Lipids* **1**, 85–86.
- [140] Ruano, M. L. F.; Nag, K.; Casals, C.; Prez-Gil, J. und Keough, K. M. W. (1999): Interactions of Pulmonary Surfactant Protein A with Phospholipid Monolayers Change with pH. *Biophys. J.* **77**, 1469–1476.
- [141] Sato, S.; Nakamura, Y.; Kaneko, T.; Katoh, T.; Asamizu, E. und Tabata, S. (2000): Structural Analysis of Arabidopsis Thaliana Chromosome 3. I. Sequence Features of the Regions of 4,504,864 bp Covered by Sixty P1 and TAC Clones. *DNA Res.* **7**, 131–135.
- [142] Schaegger, H. und von Jagow, G. (1987): Tricine-sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Polar Lipids and Determination of Phospholipids by Phosphorus Analysis of Spots. *Anal. Biochem.* **166**, 368–379.
- [143] Schmidt, R. F. und Thews, G. (1995): Physiologie des Menschen. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [144] Schoel, W. M.; Schürch, S. und Goerke, J. (1994): The Captive Bubble Method for the Evaluation of Pulmonary Surfactant: Surface Tension, Area, and Volume Calculations. *Biochim. Biophys. Acta* **1200**, 281–290.
- [145] Schuerch, S.; Bachofen, H.; Goerke, J. und Possmayer, F. (1989): A Captive Bubble Method Reproduces the in situ Behavior of Lung Surfactant Monolayers. *J. Appl. Physiol.* **67**, 2389–2396.
- [146] Schuerch, S.; Green, F. H. und Bachofen, H. (1998): Formation and Structure of Surface Films: Captive Bubble Surfactometry. *Biochim. Biophys. Acta* **1408**, 180–202.
- [147] Schuerch, S.; Schürch, D.; Curstedt, T. und Robertson, B. (1994): Surface Activity of Lipid Extract Surfactant in Relation to Film Area Compression and Collapse. *J. Appl. Physiol.* **77**, 974–986.
- [148] Schürch, S.; Bachofen, H. und Possmayer, F. (2001): Surface Activity in situ, in vivo, and in the Captive Bubble Surfactometer. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* **129**, 195–207.
- [149] Schwartz, R. M.; Luby, A. M.; Scanlon, J. W. und Kellogg, R. J. (1994): Effect of Surfactant on Morbidity, Mortality, and Resource Use in Newborn Infants Weighing 500 to 1500 g. *N. Engl. J. Med.* **330**, 1476–1480.
- [150] Shiffer, K.; Hawgood, S.; Haagsman, H. P.; Benson, B.; Clements, J. A. und Goerke, J. (1993): Lung Surfactant Proteins, SP-B and SP-C, Alter the Thermodynamic Properties of Phospholipid Membranes: a Differential Calorimetry Study. *Biochemistry* **32**, 590–597.
- [151] Skoog, D. A. und Leary, J. J. (1996): Instrumentelle Analytik. Springer, Berlin.
- [152] Starzak, M. (1984): The Physical Chemistry of Membranes. Academic Press, Orlando.

- [153] Steinem, C.; Janshoff, A.; Ulrich, W. P.; Sieber, M. und Galla, H.-J. (1996): Impedance Analysis of Supported Lipid Bilayer Membranes: a Scrutiny of Different Preparation Techniques. *Biochim. Biophys. Acta* **1279**, 169–180.
- [154] Ströker, E. (1981): Wissenschaftstheorie der Naturwissenschaften. Verlag Karl Alber, Freiburg.
- [155] Sunder, S.; Cameron, D.; Mantsch, H. H. und Bernstein, H. J. (1978): Infrared and Laser Raman Studies of Deuterated Model Membranes: Phase Transition in 1,2-perdeuterodipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *Can. J. Chem.* **56**, 2121–2126.
- [156] Sutherland, L. M.; Edwards, Y. S. und Murray, A. W. (2001): Alveolar Type II Cell Apoptosis. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* **129**, 267–285.
- [157] Suzuki, Y.; Fujita, Y. und Kogishi, K. (1989): Reconstitution of Tubular Myelin from Synthetic Lipids and Proteins Associated with Pig Pulmonary Surfactant. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**, 75–81.
- [158] Taeusch, H. W. (2000): Treatment of Acute (Adult) Respiratory Distress Syndrome. The Holy Grail of Surfactant Therapy. *Biol. Neonate* **77 Suppl 1**, 2–8.
- [159] Takamoto, D. Y.; Lipp, M. M.; von Nahmen, A.; K.Y.C., L.; Waring, A. J. und Zasadzinski, J. A. (2001): Interaction of Lung Surfactant Proteins with Anionic Phospholipids. *Biophys. J.* **81**, 153–169.
- [160] Taneva, S. G.; Stewart, J.; Taylor, L. und Keough, K. M. (1998): Method of Purification Affects some Interfacial Properties of Pulmonary Surfactant Proteins B and C and their Mixtures with Dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* **1370**, 138–150.
- [161] Tittel, K. (2003): Beschreibende and funktionelle Anatomie des Menschen. Urban und Fischer, München, Jena.
- [162] Trommeshauser, D. und Galla, H. J. (1998): Interaction of a Basic Amphipathic Peptide from the Carboxyterminal Part of the HIV Envelope Protein gp41 with Negatively Charged Lipid Surfaces. *Chem. Phys. Lipids* **94**, 81–96.
- [163] Udenfriend, S.; Stein, S.; Bohlen, P.; Dairman, W.; Leimgruber, W. und Weigele, M. (1972): Fluorescamine: a Reagent for Assay of Amino Acids, Peptides, Proteins, and Primary Amines in the Picomole Range. *Science* **178**, 871–872.
- [164] Udobi, K. F.; Childs, E. und Touijer, K. (2003): Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am. Fam. Physician.* **67**, 315–322.
- [165] Vaccaro, A. M.; Salvioli, R.; Tatti, M. und Ciaffoni, F. (1999): Saposins and their Interaction with Lipids. *Neurochem. Res.* **24**, 307–314.
- [166] van Eijk, M.; Haas, C. G. D. und Haagsman, H. P. (1995): Quantitative Analysis of Pulmonary Surfactant Proteins B and C. *Anal. Biochem.* **232**, 231–237.
- [167] Veldhuizen, E. J.; Batenburg, J. J.; van Golde, L. M. und Haagsman, H. P. (2000): The Role of Surfactant Proteins in DPPC Enrichment of Surface Films. *Biophys. J.* **79**, 3164–3171.

- [168] Veldhuizen, E. J.; Diemel, R. V.; Pütz, G.; van Golde, L. M.; Batenburg, J. J. und Haagsman, H. P. (2001): Effect of the Hydrophobic Surfactant Proteins on the Surface Activity of Spread Films in the Captive Bubble Surfactometer. *Chem. Phys. Lipids* **110**, 47–55.
- [169] Veldhuizen, E. J. und Haagsman, H. P. (2000): Role of Pulmonary Surfactant Components in Surface Film Formation and Dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **1467**, 255–270.
- [170] Veldhuizen, R.; Nag, K.; Orgeig, S. und Possmayer, F. (1998): The Role of Lipids in Pulmonary Surfactant. *Biochim. Biophys. Acta* **1408**, 90–108.
- [171] von Nahmen, A.; Post, A.; Galla, H.-J. und Sieber, M. (1997): The Phase Behaviour of Lipid Monolayers Containing Pulmonary Surfactant Protein C studied by Fluorescence Light Microscopy. *Eur. Biophys. J.* **26**, 359–369.
- [172] von Nahmen, A.; Schenk, M.; Sieber, M. und Amrein, M. (1997): The Structure of a Model Pulmonary Surfactant as Revealed by Scanning Force Microscopy. *Biophys. J.* **72**, 463–469.
- [173] Wang, G. und Chen, C. H. (1993): Thermodynamic Elucidation of Structural Stability of Deuterated Biological Molecules: Deuterated Phospholipid Vesicles in H<sub>2</sub>O. *Arch. Biochem. Biophys.* **301**, 330–335.
- [174] Wang, Z.; Gurel, O.; Baatz, J. E. und Notter, R. H. (1996): Differential Activity and Lack of Synergy of Lung Surfactant Proteins SP-B and SP-C in Interactions with Phospholipids. *J. Lipid Res.* **37**, 1749–1760.
- [175] Weaver, T. E. und Conkright, J. J. (2001): Function of Surfactant Proteins B and C. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 555–578.
- [176] Weaver, T. E.; Na, C. L. und Stahlman, M. (2002): Biogenesis of Lamellar Bodies, Lysosome-related Organelles Involved in Storage and Secretion of Pulmonary Surfactant. *Semin. Cell Dev. Biol.* **13**, 263–270.
- [177] Wegman, M. E. (1991): Annual Summary of Vital Statistics–1990. *Pediatrics* **88**, 1081–1092.
- [178] Wegman, M. E. (1994): Annual Summary of Vital Statistics–1993. *Pediatrics* **94**, 792–803.
- [179] Weis, R. M. und McConnell, H. M. (1984): Two Dimensional Crystals of Phospholipid. *Nature* **310**, 47–49.
- [180] Williams, A.; Wilkin, J. und Dluhy, R. (1995): An Investigation of Miscibility in Monolayer Films of Phosphocholine-Phosphoglycerol Binary Mixtures. *Coll. Surfaces A* **102**, 231–245.
- [181] Wustneck, N.; Wustneck, R.; Perez-Gil, J. und Pison, U. (2003): Effects of Oligomerization and Secondary Structure on the Surface Behavior of Pulmonary Surfactant Proteins SP-B and SP-C. *Biophys. J.* **84**, 1940–1949.
- [182] Yau, W. M.; Wimley, W. C.; Gawrisch, K. und White, S. H. (1998): The Preference of Tryptophan for Membrane Interfaces. *Biochemistry* **37**, 14713–14718.



- [183] Zaltash, S.; Griffiths, W. J.; Beck, D.; Duan, C. X.; Weaver, T. E. und Johansson, J. (2001): Membrane Activity of (Cys48Ser) Lung Surfactant Protein B Increases with Dimerisation. *Biol. Chem.* **382**, 933–939.
- [184] Zaltash, S.; Palmblad, M.; Curstedt, T.; Johansson, J. und Persson, B. (2000): Pulmonary Surfactant Protein B: a Structural Model and a Functional Analogue. *Biochim. Biophys. Acta* **1466**, 179–186.
- [185] Zasadzinski, J. A.; Ding, J.; Warriner, H. E.; Bringezu, F. und Waring, A. J. (2001): The Physics and Physiology of Lung Surfactants. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **6**, 506–513.



# Danksagung

Folgende Menschen waren unmittelbar an der Entstehung und dem Gelingen der vorliegenden Dissertation beteiligt. Mein Dank geht daher an...

- Herrn Prof. Dr. H.-J. Galla für die interessante Aufgabenstellung, seine Unterstützung und den Freiraum, den er mir bei der Gestaltung dieser Arbeit gewährt hat.
- Herrn Dr. J.J. Batenburg (Coos) für die Einladung, (Mit-)Organisation und kritische Begleitung meiner Utrecht-Aufenthalte. In Bezug auf Forschungsstrategie und Planung von Experimenten habe ich in dieser (Anfangs-)Zeit viel von ihm gelernt.
- Frau Dr. B. Hagenhoff (Birgit) für die sehr gute wissenschaftliche Begleitung der ToF-SIMS-Messungen sowie die Möglichkeit, in ihrer Firma diesen Teil meiner Dissertation bearbeiten zu können.
- Herrn Dr. J. Brouwers (Jos) für den Versuch einer quantitativen Analyse des CBS-Oberflächenfilms mittels ESI-MS. Ich bin überzeugt, dass der gewählte Ansatz erfolgversprechend ist.
- Herrn Dr. R.V. Diemel (Rob) und Dr. E.J.A. Veldhuizen (Edwin) für die FC-Utrecht-Besuche und natürlich auch ihre CBS-Anleitungen.
- Chris, Dora, Martin, Martin, Koen, Paul und Rudy für zahlreiche kleine Hilfen im Utrechter Longenlab.
- Den Mitarbeitern der Firma Tascon: Elke, Gudrun, Katharina, Reinhard und Renate für die Einarbeitung am ToF-SIMS, zahlreiche kleine Tipps und eine nette Arbeitsatmosphäre.
- Herrn Dr. H. Luftmann für die ESI-MS-Analyse der im Rahmen dieser Arbeit isolierten Proteine.
- Frau Dr. S. König für die MALDI-MS-Analyse der im Rahmen dieser Arbeit isolierten Proteine.
- Stefan Malcharek für die exzellente Zusammenarbeit im Surfactant-Bereich über den gesamten Zeitraum meiner Dissertation.
- Herrn Dr. A. Hinz (Andreas) nicht nur für die Vermittlung dieser Promotionsstelle und das Korrekturlesen dieser Arbeit sondern vor allem für eine hervorragende Freundschaft.
- Björn Schröder für Korrekturen und Sputnikhallen-Besuche.
- den Mitarbeitern der Lipid-Arbeitsgruppe, insbesondere den (Ex-)Lipidis Andreas, Björn, Chartchalerm, Christian, Eike, Fabian, Hennes, Janine, Lutz, Löbbi, Manuela, Micha, Pariya, Sebastian, Silke, Silke, Steffi und Tanawut für die gute Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima.

- Antje, Freddy, Hedda, Sabine, Walter und Wolfgang für diverse organisatorische Hilfen in der BC.
- den weiteren Mitarbeitern des Instituts für Biochemie für die über weite Strecken gute Arbeitsatmosphäre. Insbesondere Alla, Anja, Jens und Weidi für ihre freundschaftliche Verbundenheit.
- meiner Freundin Eva für ihr Verständnis, die Ermutigungen und die Geduld mit mir bei der Erstellung dieser Arbeit sowie für das intensive Korrekturlesen.
- meinen Eltern für ihre stete Unterstützung meiner Studien-, Promotions- und Lebenspläne und das Auffinden von Literaturstelle [26] in ihrer Tageszeitung. Insbesondere aus den erstgenannten Gründen sei ihnen diese Arbeit gewidmet.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name	Daniel Breitenstein
Geburtstag	19.06.1974
Geburtsort	Ahaus
Staatsangehörigkeit	deutsch
Name des Vaters	Helmut
Name der Mutter	Margret, geb. Vrenegor
Familienstand	ledig

### Schulbildung

---

08/1980 – 07/1984	Fliednerschule (Grundschule), Stadtlohn
08/1984 – 06/1993	Canisiusschule (Gymnasium), Ahaus
15.06.1993	Abitur

### Zivildienst

---

08/1993 – 10/1994	Pflegediensthelfer, Henrikus – Hospital (Alten- und Pflegeheim), Südlohn
-------------------	---

### Studium

---

10/1994 – 11/2000	Studium des Lehramtes für die Sekundarstufe I/II für die Fächer Chemie, Deutsch und Sport an der Universität Dortmund Staatsarbeit am Institut für Didaktik der Chemie (Dortmund) unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. B. Ralle Thema: „Altlastensanierung im experimentellen Chemieunterricht“
-------------------	--

### Prüfungen

---

20.11.2000	Erste Staatsprüfung für das Lehramt der Sekundarstufe II; Fächer: Chemie und Sport
20.11.2000	Erste Staatsprüfung (Zusatzprüfung) für das Lehramt für die Sekundarstufe I; Fächer: Chemie und Sport

### Tätigkeiten

---

03/2001 – 02/2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biochemie, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster
03/1999 – 12/2000	Studentische Hilfskraft am Institut für Umweltforschung, Universität Dortmund

### Beginn der Dissertation

---

03/2001	Institut für Biochemie, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster, Betreuer: Prof. Dr. H.-J. Galla
---------	---

---