

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

(DR. RER. NAT.)

im Fach Chemie

**EINFLUSS NATÜRLICHER UND SYNTHETISCHER LIPIDE
SOWIE VERSCHIEDENER COSOLVENTIEN AUF
LIPIDMEMBRANEN**

vorgelegt an der

Technischen Universität Dortmund
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

von

JOHANN MARIUS ALEXANDER HERZOG

Dortmund, Oktober 2020

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG (AFFIDAVIT)

Name, Vorname (Surname, first name)

Matrikel-Nr. (Enrolment number)

Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, §63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

Ort, Datum (Place, date)

Unterschrift (Signature)

Titel der Dissertation (Title of the thesis):

Einfluss natürlicher und synthetischer Lipide sowie verschiedener Cosolventien auf Lipidmembranen

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.*

***Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.**

Ort, Datum (Place, date)

Unterschrift (Signature)

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl Physikalische Chemie I (Biophysikalische Chemie) der TU Dortmund unter Anleitung von Herrn PROF. DR. R. WINTER im Zeitraum von April 2017 bis August 2020 durchgeführt.

Eingereicht am 21.10.2020

Disputation am 27.11.2020

Prüfungskommission:

Prüfungsvorsitzender: PROF. DR. CARSTEN STROHMANN
Anorganische Chemie, CCB, TU
Dortmund

Erstgutachter: PROF. DR. ROLAND WINTER
Physikalische Chemie I, CCB, TU
Dortmund

Zweitgutachter: PROF. DR. CLAUD CZESELIK
Physikalische Chemie I, CCB, TU
Dortmund

„Der Mensch muss bei dem Glauben verharren, daß das Unbegreifliche begreiflich sei; er würde sonst nicht forschen.“

JOHANN WOLFGANG VON GOETHE (1749-1832)

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mir während der Durchführung dieser Doktorarbeit in jedweder Form zur Seite standen.

Mein herzlichster Dank geht an **Herrn PROF. DR. ROLAND WINTER**, der mir die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit gegeben sowie mich stets gut betreut hat und allzeit für Fragen und erkenntnisbringende Diskussionen zur Verfügung stand.

Für die Übernahme des Koreferats bedanke ich mich bei **Herrn PROF. DR. CLAUS CZESLIK**.

Für eine angenehme Zusammenarbeit in verschiedenen Forschungsprojekten möchte ich **Herrn STEFFEN BORNEMANN** und **Frau MAGILINY MANISEGARAN** danken. Des Weiteren gilt dieser Dank sowohl **Herrn PROF. DR. FRANK GLORIUS**, **Frau LENA ROHLING** und **Frau TIFFANY PAULISCH** von der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster sowie **Herrn PROF. DR. LARS BLANK** von der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen für eine angenehme Kooperation während der gemeinsamen Forschungsprojekte.

Ebenfalls danke ich **Frau ANDREA JEWORREK**, die sich jederzeit gern und mit großem Einsatz um verwaltungstechnische und organisatorische Angelegenheiten gekümmert hat sowie dem **Arbeitskreis der Physikalischen Chemie I** für eine gute und freundliche Arbeitsatmosphäre, in der ich mich während der gesamten Promotionszeit wohlfühlt habe.

Für eine angenehme Arbeitsatmosphäre im Büro und viele intellektuelle Diskussionen möchte ich mich vor allem bei **Herrn STEFFEN BORNEMANN**, **Frau MAGILINY MANISEGARAN** und **Herrn MICHEL JAWOREK** bedanken. Auch gilt mein Dank **Frau KARIN PLANTE** für viele neue Anregungen und tolle Gespräche.

Meinen ELTERN danke ich für ihre allzeit gewährte Hilfsbereitschaft sowie ihr entgegengebrachtes Verständnis und ihre Rücksichtnahme während meines gesamten Studiums. Durch ihre Motivation und ihren mir stets gebotenen Rückhalt war es überhaupt erst möglich, dass diese Arbeit entstehen konnte. Daher möchte ich Euch sowie meiner verstorbenen **GROBMUTTER** diese Arbeit von Herzen widmen.

PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Einige in dieser Arbeit präsentierte Forschungsergebnisse wurden wie folgt publiziert:

- M. Herzog, L. Li, H.-J. Galla, R. Winter, "Effect of hyaluronic acid on phospholipid model membranes", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 173 (2019) 327-334.
- M. Herzog, M. Dwivedi, R. K. Harishchandra, A. Bilstein, H.-J. Galla, R. Winter, "Effect of ectoine, hydroxyectoine and β -hydroxybutyrate on the temperature and pressure stability of phospholipid bilayer membranes of different complexity", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 178 (2019) 404-411.
- S. Bornemann[‡], M. Herzog[‡], L. Roling, T. O. Paulisch, D. Brandis, S. Kriegler, H.-J. Galla, F. Glorius, R. Winter, "Interaction of imidazolium-based lipids with phospholipid bilayer membranes of different complexity", *Phys. Chem. Chem. Phys.* 22 (2020) 9775-9788 (<https://doi.org/10.1039/D0CP00801J>).
- T. Paulisch[‡], Steffen Bornemann[‡], M. Herzog[‡], S. Kudruk[‡], L. Roling, A. Linard Matos, H.-J. Galla, V. Gerke, R. Winter, F. Glorius, "An Imidazolium-based Lipid Analogue as Gene Transfer Agent", *Chem. Eur. J.* (2020), Copyright Wiley-VCH GmbH. Reproduced with permission.
- M. Herzog, T. Tiso, L. Blank, R. Winter, "Interaction of rhamnolipids with model biomembranes of varying complexity", *BBA- Biomembranes* 1862 (2020) 183431.

Des Weiteren war der Autor an folgenden Publikationen beteiligt:

- M. Gao, M. Berghaus, S. Möbitz, V. Schuabb, N. Erwin, M. Herzog, K. Julius, C. Sternemann, and R. Winter, "On the Origin of Microtubules' High-Pressure Sensitivity", *Biophys. J.* 114 (2018) 1080-1090.
- S. R. Al-Ayoubi, P. K. F. Schinkel, M. Berghaus, M. Herzog, and R. Winter, "Combined Effects of Osmotic and Hydrostatic Pressure on Multilamellar Lipid Membranes in the Presence of PEG and Trehalose", *Soft Matter* 14 (2018) 8792-8802.
- S. Bornemann, M. Herzog, R. Winter, "Impact of Y^{3+} -ions on the structure and phase behavior of phospholipid model membranes", *Phys. Chem. Chem. Phys.* 21 (2019) 5730-5743.

[‡] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Publikation beigetragen.

INHALTSVERZEICHNIS

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG (AFFIDAVIT)	I
DANKSAGUNG	VII
PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	IX
INHALTSVERZEICHNIS	XI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XV
VARIABLEN UND NATURKONSTANTEN	XVII
KURZZUSAMMENFASSUNG	XIX
ABSTRACT	XXI
VORWORT	XXIII
1. Einleitung	1
1.1 Plasmamembranen	1
1.1.1 Aufbau und Zusammensetzung	1
1.1.2 Phasenverhalten und lyotroper Polymorphismus von Lipidmembranen	3
1.2 Zielsetzung	9
1.2.1 Vorstellung der Projekte	10
2. Material und Methoden	15
2.1 Verwendete Chemikalien	15
2.2 Verwendete Messgeräte und Software-Programme	16
2.3 DSC	17
2.3.1 Probenpräparation	17
2.3.2 Messungen	18
2.3.3 Methode	19
2.4 PPC	21
2.4.1 Probenpräparation	21
2.4.2 Messungen	21
2.4.3 Methode	21
2.5 Fluoreszenzspektroskopie	23
2.5.1 Probenpräparation	23
2.5.2 Messungen	24

2.5.3 Methode	26
2.6 Fluoreszenzmikroskopie	30
2.6.1 Probenpräparation	30
2.6.2 Messungen	35
2.6.3 Methode	37
2.7 FOURIER-Transform-Infrarot-Spektroskopie	40
2.7.1 Probenpräparation	40
2.7.2 Messungen	40
2.7.3 Methode	40
2.8 AFM	47
2.8.1 Probenpräparation	47
2.8.1 Messungen	48
2.8.2 Methode	48
2.9 DLS	52
2.9.1 Probenpräparation	52
2.9.2 Messungen	52
2.9.3 Methode	53
2.10 Kritische Mizellkonzentration	56
2.10.1 Probenpräparation	56
2.10.2 Messungen	57
2.10.3 Methode	57
3. Ergebnisse und Diskussion	59
3.1 Hochdruckfluoreszenzmikroskopie an Lipidmodellmembranen	59
3.2 Untersuchung des Einflusses verschiedener Glykansysteme auf das barotrope und thermotrope Phasenverhalten verschiedener Modellmembranen	64
3.2 A) Einfluss von Hyaluronsäure auf das thermotrope Verhalten einer DPPC- Modellmembran	64
3.2.1 Hyaluronsäure	65
3.2.2 DSC-Messungen	66
3.2.3 Fluoreszenzspektroskopie	69
3.2.4 Zusammenfassung	71
3.2 B) Einfluss von Dextran auf die Organisation einer heterogenen anionischen 5 Komponenten-Modellmembran	73

3.2.5	Glykane	73
3.2.6	Fluoreszenzmikroskopie	75
3.2.7	Zusammenfassung	81
3.2 C)	Einfluss eines wässrigen Zweiphasensystems auf die Organisation und das thermotrope Verhalten einer heterogenen, anionischen Modellmembran	82
3.2.8	Wässrige Zweiphasensysteme	82
3.2.9	Fluoreszenzmikroskopie	83
3.2.10	Zusammenfassung	88
3.3	Einfluss verschiedener Osmolyte auf Lipidmodellmembranen	89
3.3.1	Osmolyte und Extremolyte	89
3.3.2	Ectoin, Hydroxyectoin und β -Hydroxybutyrat	89
3.3.3	Fluoreszenzspektroskopie	91
3.3.4	DSC- und PPC-Messungen	93
3.3.5	Zusammenfassung	96
3.4	Einfluss des Monorhamnolipids RhaC ₁₀ C ₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen	98
3.4.1	Rhamnolipide	98
3.4.2	Fluoreszenzspektroskopie	110
3.4.3	AFM-Messungen	114
3.4.4	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	118
3.4.5	Zusammenfassung	130
3.5	Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität	132
3.5.1	Rhamnolipide	132
3.5.2	DSC-Messungen	133
3.5.3	Fluoreszenzspektroskopie	134
3.5.4	AFM-Messungen	138
3.5.5	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	143
3.5.6	Zusammenfassung	158
3.6	Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen	162
3.6.1	Imidazoliumbasierte Lipide	162

3.6.2	Bestimmung der kritischen Mizellkonzentration (CMC)	165
3.6.3	FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie	166
3.6.4	DSC-Messungen	169
3.6.5	Fluoreszenzspektroskopie	172
3.6.6	Zeta-Potenzial-Messungen	175
3.6.7	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	177
3.6.8	AFM-Messungen	184
3.6.9	Zusammenfassung	187
3.7	Untersuchung der Transfektionseigenschaften imidazoliumbasierter Lipide	190
3.7.1	Lipofektion	190
3.7.2	Transfektionsförderndes imidazoliumbasiertes Lipid	191
3.7.3	Fluoreszenzspektroskopie	192
3.7.4	AFM-Messungen	194
3.7.5	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	195
3.7.6	Zusammenfassung	201
4.	Fazit und Ausblick	204
5.	Anhang	212
5.1	Literaturverzeichnis	212
5.2	Abbildungsverzeichnis	226
5.3	Tabellenverzeichnis	232
5.4	Weitere Abbildungen	234
5.4.1	Strukturformeln verwendeter Substanzen	234

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Methoden:

- AFM *Atomic Force Microscopy* (dt. Rasterkraftmikroskopie)
- DLS Dynamische Lichtstreuung
- DSC *Differential Scanning Calorimetry* (dt. dynamische Differenzkalorimetrie)
- FT-IR FOURIER-Transform-Infrarot (-Spektroskopie)
- PPC *Pressure perturbation Calorimetry* (dt. Druck-Perturbations-Kalorimetrie)

Chemikalien:

- C₁₁IMe·HI 1,3-dimethyl-4,5-diundecylimidazoliumiodid
- C₁₁IPr·HBr 1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)-4,5-diundecylimidazoliumbromid
- C₁₅IMe·HI 1,3-dimethyl-4,5-dipentadecylimidazoliumiodid
- D₂O Deuteriumoxid
- DOPC 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
- DOPE 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine
- DOPG 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol)(sodium salt)
- DPPC 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
- DPPG 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol)(sodium salt)
- Ectoin [(4S)-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-4-carboxylic acid]
- HA Hyaluronsäure
- HAA Hydroxy-Alkanoyloxy-Alkanoate; oft auch als Synonym für Hydroxy-Decanoyloxy-Decanoat verwendet
- HCl Salzsäure
- HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
- Hydroxyectoin [(4S,5S)-2-methyl-5-hydroxy-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-4-carboxylic acid]
- ITO Indium-Zinn-Oxid
- NaCl Natriumchlorid
- NaOH Natriumhydroxid
- NBD-DHPE Nitrobenzoxadiazoldihexadecanolyphosphatidylethanolamin
- NHC *N*-heterocyclische Carbene
- *N*-Rh-DHPE *N*-Rhodamin-Dihexadecanolyphosphatidylethanolamin
- PEG Polyethylenglykol
- PVA Polyvinylalkohol

- POPC 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine
- POPG 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-rac- glycerol)(sodium salt)
- Rha Rhamnose-Einheit eines Rhamnolipids
- RL Rhamnolipid
- TM (1,3-Dimethyl-4,5-dipentadecyl-2-(5-(trimethylammonio)-pentyl)-imidazoliumiodid
- TRIS Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Weitere verwendete Abkürzungen:

- eV Elektronenvolt
- dt. deutsch
- engl. englisch
- FWHM *full width at half maximum*
- GUV *Giant unilamellar vesicle* (dt. riesige unilamellare Vesikel)
- kDa Kilo-Dalton
- l_d *liquid-disordered* (dt. flüssig-ungeordnet)
- l_o *liquid-ordered* (dt. flüssig-geordnet)
- LPS Lipopolysaccharid
- LUV *large unilamellar vesicle* (dt. große unilamellare Vesikel)
- MLV Multilamellares Vesikel
- NA Numerische Apertur
- RT Raumtemperatur
- s_o *solid-ordered* (dt. fest-geordnet)
- SUV *small unilamellar vesicle* (dt. kleine unilamellare Vesikel)

VARIABLEN UND NATURKONSTANTEN

- $AFWHM$	Breite auf halber Maximalhöhe der axialen Funktion
- c	Stoffmengenkonzentration
- C_{ex}	Wärmekapazität der untersuchten Biomoleküle
- $C(\tau)$	Intensitätskorrelationsfunktion
- C_m	Wärmekapazität des Phasenüberganges
- C_p	Wärmekapazität der Probe
- C_R	Wärmekapazität der Referenz
- D	Translationsdiffusionskoeffizient
- d	(ABBE-)Abstand
- E_v	Energieunterschied der Schwingungsniveaus
- E	Elektrische Feldstärke
- E^*	Extinktion
- E_{pot}	Potentielle Energie
- F	Kraft
- F_0	Schwingungsamplitude
- G°	Standard-GIBBS-Energie
- GP	Generalisierte Polarisierung
- H	Enthalpie
- H_m	Enthalpie des Phasenüberganges
- h, \hbar	PLANCK Konstante, reduzierte PLANCK Konstante
- I	Intensität
- I_0	Grundintensität
- I_B	LAURDAN-Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von 440 nm
- I_R	LAURDAN-Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von 490 nm
- I_S	Streuintensität
- K	Kalibrierfaktor
- k	Federkonstante
- k_B	BOLTZMANN-Konstante
- $LFWHM$	Breite auf halber Maximalhöhe der lateralen Funktion
- m	Masse
- n	Brechungsindex
- P	Heizleistung
- P_p	Heizleistung Probe
- P_R	Heizleistung Referenz
- p	Druck
- Q_s	Streuvektorbetrag
- Q	Qualitätsfaktor
- r	Radius / Abstand
- r_0	Gleichgewichtsabstand

- R_h	Hydrodynamischer Radius
- r_k	Kugelradius
- S_0	elektrischer Grundzustand
- S_1	elektrisch angeregter Zustand
- S_m	Entropie des Phasenüberganges
- t	Zeit
- T	Temperatur
- T^*	Transmission
- T_m	<i>melting temperature</i> (dt. Schmelztemperatur / Hauptphasenübergangstemperatur)
- T_{on}	<i>onset temperature</i> (dt. Starttemperatur des Phasenübergangs)
- T_p	Vorphasenübergangstemperatur
- ν	Schwingungsquantenzahl
- ν_0	Eigenfrequenz
- ν_a	Schwingungsfrequenz
- V	Volumen
- x	Auslenkung
- x_a	Anharmonizitätskonstante
- z	Vertikale Auslenkung
- δ_{as}	asymmetrische Deformationsschwingung
- δ_s	symmetrische Deformationsschwingung
- $\tilde{\nu}$	mittlere Wellenzahl
- ν_{as}	asymmetrische Streckschwingung
- ν_j	Schwingungszustand
- ν_s	symmetrische Streckschwingung
- Π_s	Spreitungsdruck bzw. Spreitungskraft
- σ_0	Oberflächenspannung reines Lösungsmittel
- σ	Oberflächenspannung filmbedeckte Oberfläche
- μ	reduzierte Masse
- μ_{el}	elektrisches Dipolmoment
- α	thermischer Ausdehnungskoeffizient
- β	Heizrate
- ε	Dielektrizitätskonstante
- ε_0	Influenzkonstante
- ζ	Zetapotenzial
- η	Viskosität
- θ	Streuwinkel
- κ	Dicke der Doppelschicht
- λ	Wellenlänge
- ν	Frequenz
- τ	Korrelationszeit
- ψ	Oberflächenpotenzial

KURZZUSAMMENFASSUNG

Die Grundlage vieler Lebensprozesse bilden biologische Membranen, wie unter anderem die zellumgebende Plasmamembran. Neben einer Barrierenfunktion regulieren Zellmembranen auch die Aufnahme spezifischer Substrate in die Zelle. Durch Veränderungen der äußeren Einflüsse, wie Temperatur und Druck sowie Anwesenheit von z.B. osmolytisch-aktiven Substraten oder durch den Einbau weiterer Lipide in die Membran, lassen sich die Eigenschaften und Funktionen einer Membran beeinflussen. In dieser Arbeit soll die Auswirkung verschiedener Substrate unter variierenden thermotropen und barotropen Bedingungen auf Lipidmodellmembranen untersucht werden.

Der Einsatz von Glykanen diente zum einen dazu, direkte Wechselwirkungen dieser Stoffklasse mit Lipidmembranen zu untersuchen, da hydrierte Glykan-Netzwerke in direktem Kontakt mit Plasmamembranen anzutreffen sind. Zum anderen wurden Glykane in einem sogenannten *aqueous two phase system* (ATPS) eingesetzt, um die makromolekulare Verdichtung in Zellen zu simulieren. In beiden Fällen wurde eine den eukaryotischen Zellen nachempfundene heterogene anionische *raft*-Modellmembran verwendet. Homogene Glykan-Netzwerke unterdrückten eine Phasenseparation dieses Membransystems, wohingegen inhomogene Glykan-Netzwerke diese stabilisierten. Für das, in die Vesikel eingebrachte, ATPS konnte eine intravesikuläre Membranbenetzung beobachtet werden. Abhängig von der Vesikelumgebung bildeten sich Ausstülpungen der I_d -Domäne, um eine Reduktion der flüssig-flüssig Grenzflächenenergie des ATPS und eine Bildung energetisch günstiger, homogener, quasi-sphärischer Vesikel zu bewirken. In fortführenden Untersuchungen soll der zusätzliche Einfluss von hydrostatischem Druck für beide Projekte im Fokus stehen.

Osmolyte, wie Ectoin, Hydroxyectoin und β -Hydroxybutyrat, erlauben Organismen, unter extremen Bedingungen, wie hohen Temperaturen oder Salzkonzentrationen, zu überleben. Da Osmolyte biologisch inert sind, können sich diese Stoffe in hohen Konzentrationen im Zytoplasma akkumulieren. Der genaue Wirkmechanismus dieser Substanzen ist jedoch nicht vollends aufgeklärt. Hier wurde zum einen der Einfluss dieser drei kompatiblen Osmolyte auf eine DPPC-Lipidmodellmembran unter variierenden Temperatur- und Druckbedingungen untersucht. Dabei konnte eine Stabilisierung der Gelphase durch veränderte Hydratationseigenschaften an der Lipidgrenzfläche sowie durch Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen im Kopfgruppenbereich beobachtet werden. Zum anderen konnten Belege für einen fluidisierenden Effekt der Osmolyte auf phasengetreunt vorliegende Lipiddoppelschichten gefunden werden.

Rhamnolipide bilden eine große Klasse biologischer, oberflächenaktiver Verbindungen, die an essentiellen zellulären Funktionen beteiligt sind. Viele Studien haben über antibakterielle Wirkungen von Rhamnolipiden berichtet, jedoch nur wenige Studien haben versucht, die zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären. In einem ersten Schritt wurde der Einfluss eines Monorhamnolipids, RhaC₁₀C₁₀, auf einfache sowie komplexe Lipidmodellmembranen untersucht. In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss der Rhamnose-Kopfgruppe anhand einer Synthesevorstufe der Rhamnolipide, die keinerlei Zuckermoleküle besitzt, des Monorhamnolipids und eines Dirhamnolipids, RhaRhaC₁₀C₁₀, auf dieselben Membransysteme vergleichend untersucht. Der Einbau aller drei Moleküle in Lipidmodellmembranen bewirkte eine signifikante Veränderung der lateralen Lipidorganisation, der Membranomorphologie und -fluidität. Unterschiede in den Einflüssen der drei Substrate waren erst bei Konzentration ab 10 mol% deutlich zu erkennen und können auf das unterschiedliche Potenzial zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen der Rhamnolipidkopfgruppen zurückgeführt werden. Der Einbau in riesige unilamellare Vesikel (GUVs) des heterogenen anionischen *raft*-Membransystems bewirkte das Abknospen von Domänen und die Aufspaltung in Tochtervesikel für alle drei Rhamnolipide. Ferner destabilisierte RhaC₁₀C₁₀ Lipidvesikel nach Insertion, wohingegen RhaRhaC₁₀C₁₀ die Bildung riesiger GUVs förderte.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass alkylierte Imidazoliumsalze Lipidmembranen beeinflussen und eine allgemeine Zytotoxizität sowie signifikante Antitumoraktivitäten aufweisen. Neben dem Einfluss lipidierter Imidazoliumsalze auf Struktur und Phasenverhalten verschieden komplexer Lipidmembranen wurde auch das Potenzial dieser Molekülklasse zur Fusionsinduktion untersucht. Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung der Membranwechselwirkungen des bislang unerforschten 1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)-4,5-diundecyl-1H-imidazol-3-iumbromid (C₁₁IPr·HBr) im Vergleich zum gut charakterisierten 1,3-dimethyl-4,5-diundecyl-1H-imidazol-3-iumiodids (C₁₁IMe·HI) in variierenden Konzentrationen. Dabei konnten eine deutliche Absenkung des thermotropen Phasenübergangs, Störungen der Konformations- und lateralen Ordnung der Lipide sowie Morphologieänderungen von GUVs festgestellt werden. Das zur Fusionsinduktion konstruierte imidazoliumbasierte Lipid wies geringere störende Effekte auf die laterale Membranordnung und -Morphologie auf. Durch den Einsatz eines speziellen Lipidträgersystems konnte ein generelles Fusionspotenzial dieser Molekülklasse nachgewiesen werden.

ABSTRACT

Biological membranes, such as the plasma membrane, are paramount in regulating the basis of many life processes. In addition to their function as physical barriers, cell membranes importantly serve to influence the uptake of specific substrates into the cell with marked specificity. Membranes are dynamic and their properties are adaptive to changes in both internal factors (e.g. variable lipid compositions) and external factors, such as temperature, pressure, and fluctuations in specific substrates (e.g. osmotically active substances). In this thesis, the effects of multiple substrates on lipid model membranes are investigated under varying thermotropic and barotropic conditions.

Glycans are polysaccharides, which are the essential energy suppliers and energy storages in the metabolism. Each cell is encased in a carbohydrate shell, the so-called glycocalyx, which protects the cell from drying out and is important in cell-cell recognition and communication. The first aim of this work emphasized glycan usage in order to model naturally occurring hydrogenated glycan networks, which are normally found in direct contact with plasma membranes. Second, glycan incorporation was used in an aqueous two-phase system (ATPS), which simulates typical macromolecular crowding in cells. In both cases, a heterogeneous anionic raft model membrane mimicking a eukaryotic cell membrane was used. Homogeneous glycan networks suppressed the phase separation of this membrane system, whereas inhomogeneous glycan networks stabilized it. Intravesicular membrane wetting was observed upon ATPS introduction to the vesicle. Depending on the vesicle environment, protrusions of the l_a -domains were formed in order to achieve a reduction in the liquid-liquid interface energy of the ATPS, and the formation of energetically favorable homogeneous, quasi-spherical vesicles. For both projects, the additional influence of hydrostatic pressure should be the focus of further investigations.

Osmolytes such as ectoine, hydroxyectoine and β -hydroxybutyrate allow organisms to survive under extreme conditions, such as high temperatures or salt concentrations. Since osmolytes are biologically inert, these substances can accumulate in high concentrations in the cytoplasm; however, the exact mechanism of action of these substances is not completely understood. In pursuit of this information, the influence of ectoine, hydroxyectoine and β -hydroxybutyrate on a DPPC lipid model membrane was investigated under varying temperature and pressure conditions. A stabilization of the gel phase through altered hydration properties at the lipid interface, as well as through hydrogen bonds and electrostatic

interactions in the head group area, could be observed. Furthermore, evidence of a fluidizing effect of the osmolytes on phase-separated lipid bilayers was found.

Rhamnolipids are a large class of biological, surface-active compounds that are involved in essential cellular functions. Many studies have reported on the antibacterial effects of rhamnolipids, but only a few studies have attempted to elucidate their underlying mechanisms. To begin, the influence of a monorhamnolipid, RhaC₁₀C₁₀, on simple and complex lipid model membranes was investigated. Secondly, the influence of a rhamnolipid precursor void of any sugar molecules on membrane systems was compared against the influence of the monorhamnolipid and a dirhamnolipid, RhaRhaC₁₀C₁₀. The incorporation of all three molecules in lipid model membranes resulted in a significant change of the lateral lipid organization, the membrane morphology, and fluidity. Differences between the influences of the three substrates were only clearly recognizable at concentrations of 10 mol% and above and can be attributed to the different potential for the formation of hydrogen bonds of the rhamnolipid head groups. Incorporation into giant unilamellar vesicles (GUVs) of the heterogeneous anionic raft membrane system caused a budding of domains and fission into daughter vesicles for all three rhamnolipids. Furthermore, RhaC₁₀C₁₀ destabilized lipid vesicles after insertion, whereas RhaRhaC₁₀C₁₀ promoted the formation of giant GUVs.

Various studies have shown that alkylated imidazolium salts have a general cytotoxicity, as well as significant antitumor activities and affect lipid membranes. In addition to the influence of lipidated imidazolium salts on the structure and phase behavior of lipid membranes of various complexities, the potential of this molecule class to induce vesicle fusion was also investigated. This work focuses on the investigation of the membrane interactions of the previously unexplored 1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)-4,5-diundecyl-1H-imidazol-3-iumbromide (C₁₁IPr · HBr) in comparison to the well-characterized 1, 3-dimethyl-4,5-diundecyl-1H-imidazol-3-iumiodides (C₁₁IMe · HI) in varying concentrations. A significant decrease in the thermotropic phase transition temperature, disturbances in the conformational and lateral order of the lipids, and changes in the morphology of GUVs were found. The imidazolium-based lipid constructed for fusion induction showed less disturbing effects on the lateral membrane order and morphology. By using a special lipid carrier system, a general fusion potential of this molecule class could be demonstrated.

VORWORT

Frei nach NILS BOHR ist es die Aufgabe der Naturwissenschaften, natürliche Phänomene zu erforschen und daraus neue Erkenntnisse und Einblicke in die durchaus komplexen Vorgänge der Natur zu erlangen. Durch das Verschwimmen der traditionellen Grenzen zwischen Chemie, Physik und Biologie hat die biophysikalische Chemie in den letzten Jahren immer weiter an Aufschwung gewonnen, da in dieser Fachrichtung biologische Problemstellungen mittels physikalischer Methoden untersucht und anschließend durch physikalisch-chemische Modelle beschrieben und interpretiert werden. Somit bietet die biophysikalische Chemie die Möglichkeit, Antworten zu einem breiten Spektrum an biologischen, chemischen und medizinischen Fragestellungen zu liefern. Die Entwicklung und Verwendung einfacher bis hin zu komplexen Modellsystemen aus den elementaren und molekularen Grundbausteinen einer biologischen Zelle ermöglicht es, biologische und biochemische Prozesse unter kontrollierten Bedingungen und großen Ähnlichkeiten mit natürlichen Systemen zu untersuchen. Ferner ist es so möglich, den Einfluss externer Substrate und Komponenten beliebig anzupassen und zu analysieren. Durch eine Erhöhung der Komplexität der untersuchten Systeme kann das Verständnis biologischer Prozesse vertieft und allgemeingültige zugrundeliegende Gesetzmäßigkeiten abgeleitet werden, welche wichtige Beiträge bis hin zur Diagnose und Behandlung von Krankheiten leisten können.

1. Einleitung

Die Basis organischer Lebensformen bilden im Wesentlichen Aminosäuren, Nukleotide, Lipide und Kohlenhydrate, welche sich zu Überstrukturen, wie Chromosomen, Membranen u.v.a.m., zusammenlagern können. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung von Lipidmembranen, die viele lebensnotwendige Prozesse erst ermöglichen, unter verschiedensten Bedingungen und Einflüssen. Dazu sollen im folgenden Kapitel die Grundlagen und Eigenschaften von Plasmamembranen erläutert werden.

1.1 Plasmamembranen

1.1.1 Aufbau und Zusammensetzung

Die Grundeinheit jedes lebenden Organismus ist die Zelle. Zellen grenzen sich von ihrer Umgebung durch Plasmamembranen ab. Pflanzen-, Bakterien- und Pilzzellen sind zusätzlich zu der normalen Plasmamembran noch von einer Zellwand umgeben, die sich aus Polysacchariden aufbaut. Auch eukaryotische Organelle, wie das Mitochondrium, der Golgi-Apparat und das Endoplasmatische Retikulum, sind von einer Membran umhüllt. In tierischen Zellen ist die Plasmamembran die einzige lokale Abgrenzung vom extrazellulären Raum und hat die Funktion einer Permeabilitätsbarriere. Somit ermöglicht sie einen kontrollierten Stoffaustausch mit der Zellumgebung. Weitere Aufgaben der Zellmembran sind bei Säugetieren unter anderem die Signaltransduktion aus dem extrazellulären Raum in das Zellinnere, die Ausbildung und Ermöglichung von Zellkontakten sowie eine Interaktion bestimmter Plasmamembran-Komponenten mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix bzw. Proteinfilamenten des Zytoskeletts, um eine Stabilisierung der Zelle zu erlangen.^[1-5]

Die Plasmamembranen müssen für diese Aufgaben hochorganisiert vorliegen und bestehen zumeist aus Lipiden, Proteinen sowie Kohlenhydraten, welche zumeist an Lipiden oder Proteinen gebunden vorliegen und dementsprechend als Glykolipide oder Glykoproteine bezeichnet werden. Den Hauptbestandteil einer Membran bilden jedoch die Lipide mit einem Anteil von 40 – 60 % an der Gesamtmasse. Abweichungen davon können durch die jeweilige Funktion einer Membran entstehen. Zelluläre Membranlipide besitzen einen amphiphilen Charakter, der sich aus ihrer polaren Kopfgruppe und den hydrophoben Kohlenwasserstoffresten ergibt. Membranlipide sind zum Beispiel Phospholipide, Glykolipide und

1 Einleitung

1.1 Plasmamembranen

Cholesterin. Phospholipide basieren zumeist auf einem Glycerin- oder Sphingosin-Grundgerüst (Abbildung 1-1), welches mit verschiedenen phosphorylierten Alkoholgruppen modifiziert ist, wodurch die unterschiedlichen Lipidspezies generiert werden.

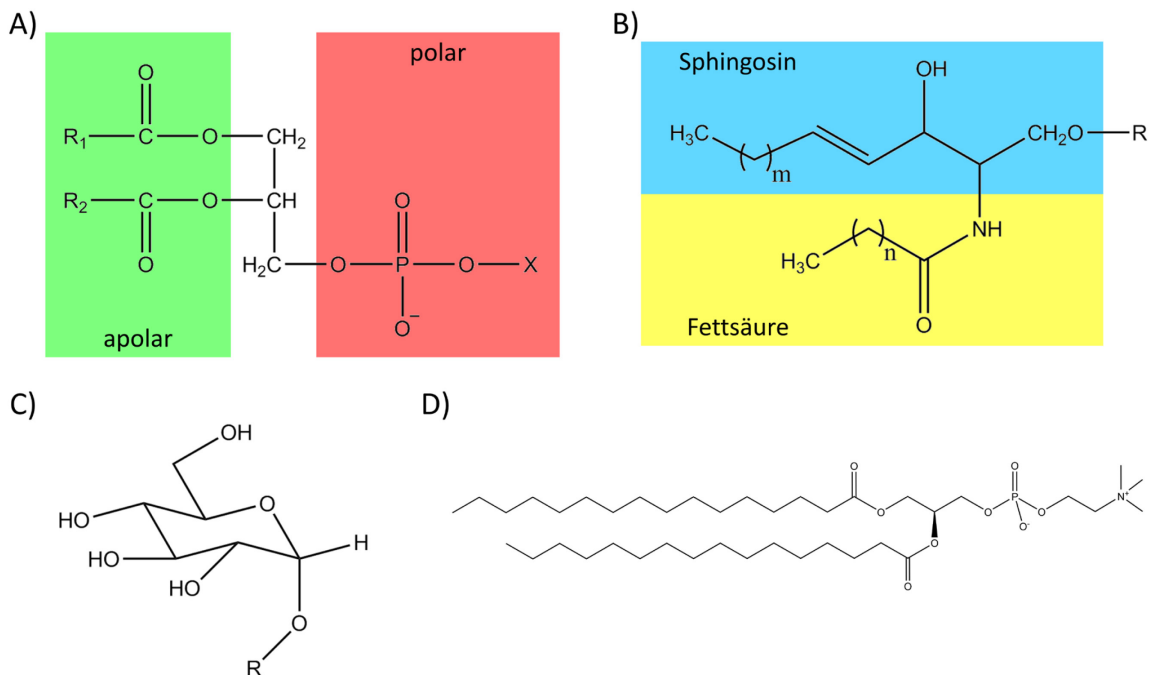


Abbildung 1-1: Darstellung der (A) Phosphoglycerin-, (B) Sphingo- und (C) Glykolipid Grundgerüste sowie beispielhaft (D) die Struktur des Phospholipids DPPC. A) Darstellung der Grundstruktur eines Phosphoglyceridlipides unterteilt in eine hydrophile Kopfgruppe und zwei hydrophobe Alkylketten (R₁ und R₂). B) Grundgerüst eines Sphingolipids, welches sich in eine Sphingosin-Gruppe und einen Fettsäurerest unterteilt. Die verschiedenen Klassen der Sphingolipide ergeben sich durch verschiedene Substitutionen (R). C) Kopfgruppe eines Glykolipids, an die entweder ein Fettsäurerest oder ein Glycero- bzw. Sphingolipid über eine Ester- bzw. Amidbindung gebunden ist. D) Strukturformel des Phospholipids DPPC.

Eine weitere Möglichkeit, die Eigenschaften eines Lipids zu beeinflussen, ergibt sich aus der Länge und dem Sättigungsgrad der Kohlenwasserstoffketten. Phosphoglyceride besitzen zumeist 12 - 24 Kohlenstoffatome in ihren Ketten, die gesättigt oder einfach sowie mehrfach ungesättigt vorliegen können. Die Doppelbindungen weisen jedoch eine *cis*-Konfiguration auf.^[5,6] Die Bindung der Kohlenwasserstoffreste an das Glycerinrückgrat findet in eukaryotischen Zellen üblicherweise über eine Esterbindung an die *sn*-1 und *sn*-2 Position statt. Ausnahmen bilden in einigen wenigen Zellarten die Bindung von langkettigen Alkoholen oder Vinylalkoholen mittels Etherbindung an die *sn*-1 Position des Glycerins. Ferner können sich durch eine Hydrolyse, welche von Phospholipasen katalysiert wird,

auch Lysophospholipide bilden, die lediglich einen Fettsäurerest an einer der beiden oben genannten Positionen besitzen. Die Bindung der Fettsäurereste findet bei Sphingolipiden hingegen über eine Amidbindung statt. Daraus resultiert ein sogenanntes Ceramid. Die Kohlenwasserstoffketten der Ceramide können eine Länge von bis zu 36 Kohlenwasserstoff-Einheiten erreichen, wobei eine Einheit einer Methylengruppe entspricht. Im Gegensatz zu den Phospholipiden haben hierbei die eher seltenen ungesättigten Sphingolipide eine *trans*-Doppelbindung.^[7] Wie hieraus ersichtlich wird, erlaubt eine Kombination vieler unterschiedlicher Lipidbausteine die Generierung einer großen strukturellen Vielfalt an Lipiden. Dadurch ist es eukaryotischen Zellen möglich, über 1000 unterschiedliche Lipidspezies zu bilden.^[2,3,5,6,8] Dies ist für einen Organismus lebensnotwendig, da er so über verschiedene Lipidkompositionen verfügt, die die funktionellen Eigenschaften einer zellulären Membran beeinflussen können. Dies betrifft unter anderem die Aufrechterhaltung der Fluidität unter variierenden äußeren Bedingungen, wie der Änderung des Drucks oder der Temperatur. Dieser Vorgang wird als homöoviskose Adaption bezeichnet.^[9]

1.1.2 Phasenverhalten und lyotroper Polymorphismus von Lipidmembranen

Durch die Lipidkomposition wird jedoch nicht nur die Funktion einer Membran, sondern auch deren Struktur bestimmt. Wie schon erwähnt, besitzen Lipide oft einen amphiphilen Charakter, wodurch sie in wässrigen Lösungen spontan Doppelschichten ausbilden können. Bei diesen supramolekularen Aggregaten sind die hydrophoben Bereiche, die unpolaren Kohlenwasserstoffketten, dem Wasser abgewandt und die polaren Kopfgruppen interagieren mit dem wässrigen Medium. Die Triebkraft für diese Anordnung stellt der hydrophobe Effekt dar.^[10] Die Wassermoleküle lagern sich dabei um die Aggregate unter Ausbildung der maximalen Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen herum an. Das unpolare Molekül wird somit von einer Hydrathülle oder einem „Wasserkäfig“ umgeben. H. FRANK und M. EVANS gelang es 1945 zu zeigen, dass dieser Effekt vor allem durch die Entropieabnahme der Wassermoleküle angetrieben wird. Somit wird die Struktur und Organisation biologischer Moleküle entscheidend definiert.^[1]

Die eingenommene geometrische Form von Lipiden wird durch deren Kopfgruppe und die Kohlenwasserstoffketten vorgegeben, sodass die zusammengelagerten Lipide eine übergeordnete Struktur mit optimaler Packung der Lipidmoleküle einnehmen. Somit ist es ihnen möglich, in viele verschiedene Strukturen von Aggregaten zu assemblieren. Dies wird als

1 Einleitung

1.1 Plasmamembranen

Lipidpolymorphismus bezeichnet.^[11] Eine Möglichkeit, die Struktur dieser Aggregate vorherzusagen, bietet der von ISRAELACHVILI eingeführte kritische Packungsparameter *CPP*. Der *CPP* ist als das Verhältnis des Volumens der hydrophoben Kohlenwasserstoffketten v_m zur Kopfgruppenfläche A normiert auf die Kohlenwasserstoffkettenlänge l definiert^[1,12]:

$$CPP = \frac{v_m}{A \cdot l} \quad 1-1$$

Die Fläche der Kopfgruppe ist schwierig exakt anzugeben, da sie von unterschiedlichen Parametern, wie dem pH-Wert, der Hydratation, dem Druck, der Ionenstärke der Lösung und der Temperatur abhängig ist. Trotzdem erlaubt das Modell eine gute qualitative Angabe der Gestalt und Form der meisten amphiphilen Aggregatstrukturen. Bei einem *CPP*-Wert $< 1/3$ kommt es zur Bildung von mizellaren Strukturen, die auf eine kegelförmige Lipidmolekülstruktur zurückzuführen ist, wohingegen sich bei *CPP*-Werten oberhalb von 1 inverse Mizellen aus den kegelstumpfförmig geformten Lipiden bilden.^[11,13] Diese Kegeltstumpfformen sind häufig in nicht-lamellaren Phasen, z.B. der invers hexagonal H_{II} oder den verschiedenen kubischen Phasen Q_{II} , denen wichtige Funktionen in unterschiedlichen biologischen Vorgängen, wie u.a. Endo- bzw. Exocytose oder Membranfusion zukommen, anzutreffen.^[3,11,13] Lipide mit einem *CPP* von ~ 1 , die somit eine zylinderförmige Grundstruktur besitzen, aggregieren bevorzugt in planaren Doppelschichten. Dies trifft vor allem auf phosphatidylcholin (PC)-haltige Lipide zu.^[11] Die Dicke einer solchen Lipiddoppelschicht liegt meist etwa bei 4 – 5 nm^[1] und die Lipidmoleküle sind darin so angeordnet, dass die hydrophoben Bereiche der beiden Schichten sich gegenüberstehend, dem polaren Medium abgekehrt, vorliegen und die hydrophilen Kopfgruppen dem polaren Lösungsmittel zugewandt sind. Die Diffusion von Lipidmolekülen in zweidimensionaler lateraler Richtung geht schnell vonstatten ($10^{-12} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$)^[1], wohingegen die transversale Diffusion, auch als *flip-flop* Diffusion bezeichnet, zwischen den beiden Doppelschichten einer Membran vergleichsweise langsam und wesentlich unwahrscheinlicher ist.^[1,14] Die Ausbildung der übergeordneten Makrostrukturen einer Lipiddoppelschicht hängt entscheidend von dem Wassergehalt der Membran ab. Bis zu 30 Gew.-% Wasser in der Membran bilden sich bevorzugt übereinander gelagerte, parallele Doppelschichten, bei einem noch höheren Wassergehalt kommt es zur Bildung von multilamellaren Vesikeln (MLVs) und in sehr verdünnten Lösungen sind erst unilamellare Vesikel stabil.^[1] Die verschiedenen makromolekularen Strukturen können in Abbildung 1-2 eingesehen werden.

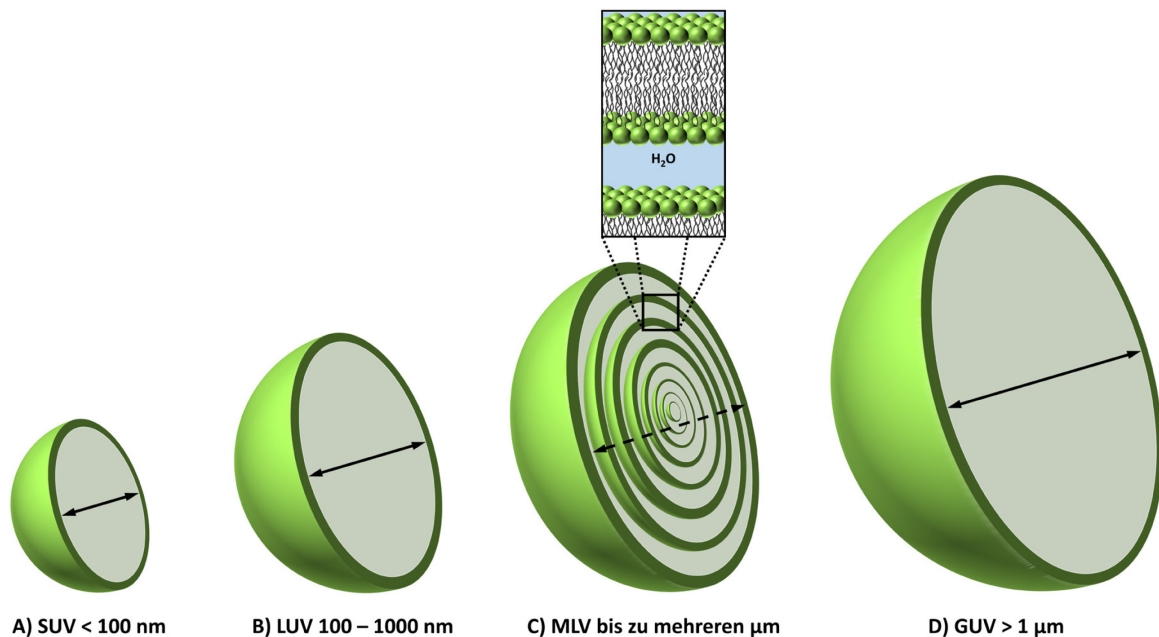


Abbildung 1-2: Schematische Übersicht über verschiedene Lipidvesikelsysteme. A) *Small unilamellar vesicle* (SUV) mit einer Größe unterhalb von 100 nm, B) *Large unilamellar vesicle* (LUV) in einer Größenordnung von 100 – 1000 nm, C) *Multilamellar vesicle* (MLV) bestehend aus vielen lamellaren Lipidschichten mit einer Größe bis zu mehreren μm und D) *Giant unilamellar vesicle* (GUV) mit Größen oberhalb von 1 μm (Abbildung modifiziert aus Literatur ^[15]).

Diese verschiedenen makromolekularen Strukturen sind für diese Arbeit insofern essentiell, da verschiedene Untersuchungsmethoden unterschiedliche Strukturformen benötigen. Festkörperunterstützte, planare Doppelschichten (engl. *supported bilayer membrane*) werden für die Rasterkraftmikroskopie (AFM) verwendet. Riesige unilamellare Vesikel (GUVs) kommen in der Fluoreszenzmikroskopie zum Einsatz. Diese Vesikel wiesen in den meisten Untersuchungen Durchmesser zwischen 10 – 50 μm auf, wobei auch schon unilamellare Vesikel ab einem Durchmesser von 1 μm als GUV bezeichnet werden.^[15] Multilamellare Vesikel (MLVs) zeichnen sich durch mehrere parallel übereinanderliegende, lamellare Membranschichten aus. Die einzelnen Membranschichten sind dabei durch das Lösungsmittel (Wasser) voneinander getrennt.^[1,16] Diese MLVs kamen unter anderem in der Fluoreszenzspektroskopie und *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) zum Einsatz. Abhängig von den äußeren Bedingungen, wie pH-Wert, Temperatur, Druck, Ionenstärke oder verschiedenen Additiven, werden die unterschiedlichen lamellaren Phasen auch noch in ihrem Zustand beeinflusst. Die Phasenzustände zeichnen sich durch ihre charakteristischen Eigenschaften aus. Die für diese Arbeit relevanten Zustände sind schematisch in Abbildung 1-3 dargestellt.

1 Einleitung

1.1 Plasmamembranen

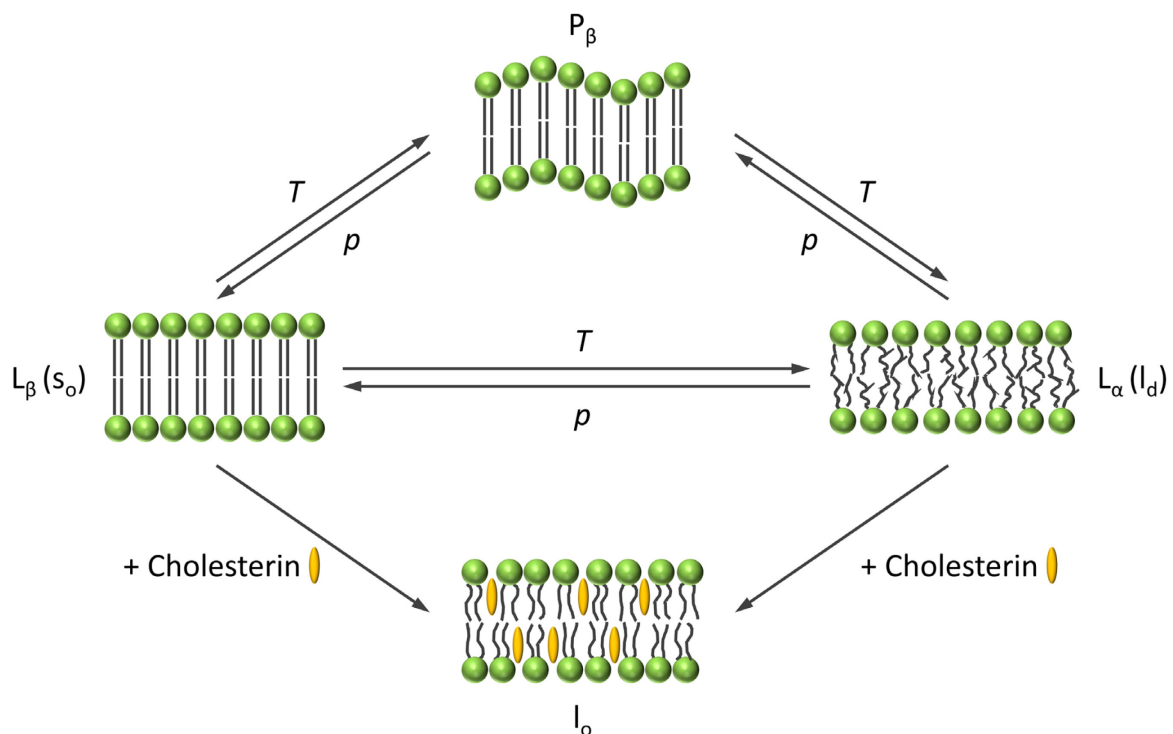


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung lamellarer Lipidphasen bei verschiedenen Bedingungen in wässrigem Medium. Die Lipiddoppelschicht liegt in der Gelphase, L_β bzw. s_o - (*solid ordered*) Phase, bei tiefen Temperaturen vor. Dabei sind die Kohlenwasserstoffketten in einer *all-trans*-Konformation, wodurch der Ordnungsparameter erhöht und die laterale Diffusion eingeschränkt wird. Durch Temperaturerhöhung kommt es zur Ausbildung der P_β -Phase, welche sich durch eine gewellte Überstruktur von der L_β -Phase unterscheidet. Der Übergang in die L_α -Phase bzw. l_d - (*liquid-disordered*) Phase beginnt bei noch höheren Temperaturen. In dieser liegen die Kohlenwasserstoffketten hauptsächlich in der *gauche*-Konformation vor und es herrschen eine schnelle laterale Diffusion und ein geringer Ordnungsparameter vor. Durch die Einlagerung von Cholesterin bildet sich die l_o - (*liquid-ordered*) Phase aus, die über eine hohe laterale Diffusion sowie einen hohen Ordnungsparameter verfügt (Abbildung modifiziert aus Literatur ^[17]).

In der L_β -Phase, welche bei niedrigen physiologischen Temperaturen auftritt, weisen die Alkylketten hauptsächlich eine gestreckte *all-trans*-Konformation auf und können je nach Temperatur, zusätzlich noch in einem Winkel von bis zu 30° gegen die Membrannormale geneigt sein. Diese Phase wird als L_β gekennzeichnet. Diese Neigung ist auf den jeweiligen Flächenbedarf der Kopfgruppen sowie der gesättigten Alkylketten zurückzuführen. Neben einer effizienten Packung ist diese geneigte Phase durch eine hohe laterale Ordnung sowie geringe laterale Diffusionsgeschwindigkeiten und Fluiditäten der Lipidmoleküle gekennzeichnet. Resultierend aus den gestreckten Alkylketten ist die Rotationsfreiheit der Lipidmoleküle hingegen hoch.^[1] Durch eine weitere Temperaturerhöhung werden die Lipide

in die $P_{\beta'}$ -Phase überführt. Dieser Übergang von der $L_{\beta'}$ - in die $P_{\beta'}$ -Phase wird als Vorübergang bezeichnet. Die hauptsächlichsten Unterschiede zwischen diesen beiden Phasen sind die periodisch gewellte Überstruktur der $P_{\beta'}$ -Phase und ihre etwas größere Schichtdicke. Durch eine weitere Temperaturerhöhung wird der Hauptübergang von der $P_{\beta'}$ - in die L_{α} -Phase durchlaufen. Diese ist die physiologisch relevanteste Phase, da die Lipide eine hohe Fluidität und hohe Diffusionsgeschwindigkeiten in der Membran aufweisen und die Alkylketten nun meist in einer *gauche*-Konformation vorliegen. Aus einer hohen Konformationsfreiheit und einer geringen Packungsdichte dieser Phase ergibt sich eine hohe Hydratation der Kopfgruppenregion. Aus diesen Gründen wird diese Phase auch als flüssig-kristalline oder fluide Phase bezeichnet, wohingegen die beiden vorhergenannten als Gelphasen benannt werden.^[1] Eine Variation der Übergangstemperaturen kann durch die verschiedensten Lipidzusammensetzungen einer Membran erreicht werden. Der Einbau von Lipiden mit kürzeren oder ungesättigten Alkylketten bewirkt eine Abschwächung der intermolekularen Wechselwirkungen, vor allem der VAN DER WAALS-Wechselwirkungen, und eine Abnahme der Phasenübergangstemperatur, wodurch die physiologisch relevante L_{α} -Phase auch unter hohen Drücken oder niedrigen Temperaturen aufrecht erhalten werden kann.^[1] Dabei verhalten sich die Phasenübergänge bei einer Druckerhöhung (bei konstanter Temperatur) gegensätzlich zu den oben beschriebenen thermotropen Phasenübergängen. Unter hohen hydrostatischen Drücken kommt es bevorzugt zu einer Ausbildung der Gelphasen gegenüber der fluiden Phase. Diese weisen ein deutlich geringeres Volumen auf, so ist z. B. das spezifische Volumen der $P_{\beta'}$ -Phase um 3,5 % geringer als das der L_{α} -Phase.^[18] Nach dem Prinzip von LE CHÂTELIER-BRAUN reagiert ein im Gleichgewicht vorliegendes physikalisches System auf eine Druckerhöhung mit einer Volumenverringerng, wodurch sich in biologischen Systemen eine Begünstigung von Prozessen ergibt, die zu einer Volumenverringerng beitragen.^[18]

Neben dem Einbau von Lipidmolekülen, die sich in Länge und Sättigungsgrad ihrer Alkylkette unterscheiden, kann auch eine Adaption an äußere Einflüsse durch die Einlagerung von Cholesterin in die Membran erreicht werden. In natürlichen Plasmamembranen liegt Cholesterin in einer Konzentration von 10 – 15 % vor, die jedoch zellspezifisch variieren kann.^[14] Durch den Einbau dieses Sterins werden intermolekulare Wechselwirkungen zwischen dem Steroidgerüst und Alkylketten benachbarter Lipidmoleküle induziert, wodurch diese in die *all-trans*-Konformation überführt werden. Des Weiteren stört Cholesterin die

1 Einleitung

1.1 Plasmamembranen

kristalline Packung der Lipidmoleküle und unterbindet so einen Übergang in die Gelphase.^[19] Durch eine Erhöhung der Cholesterinkonzentration wird der Hauptphasenübergang verbreitert, da sich eine weitere Phase, die *liquid-ordered* (l_o)-Phase ausbildet (Abbildung 1-4). Die Rotation sowie laterale Diffusionsgeschwindigkeit der Lipide sind ähnlich der *liquid disordered* (l_d)-Phase, jedoch liegen die Alkylketten meist in *all-trans* statt *gauche*-Konformation vor.^[20]

Innerhalb der Membran ist es den einzelnen Komponenten möglich, sich transversal oder lateral zu bewegen. Dabei ist die laterale Bewegung der weitaus schnellere Prozess und damit auch wahrscheinlicher als die transversale, langsamere Bewegung. Das von SINGER und NICHOLSON 1972 entworfene Flüssig-Mosaik-Modell gibt eine ungefähre schematische Beschreibung der Bewegungsprozesse in einer Membran wieder, in dem es die Membran als zweidimensionales Lösungsmittel mit einer homogenen Verteilung von funktionellen Strukturen und membranständigen Proteinen betrachtet. Jedoch gilt es heutzutage als überholt ^[1], da es lokale Heterogenitäten, die aus Interaktionen von Proteinen und einigen Lipiden resultieren, unbeachtet lässt und ferner nachgewiesen wurde, dass die eukaryotische Zellmembran in der zytosolischen Lipidschicht vorwiegend neutral geladene Lipidmoleküle besitzt und in der intrazellulären Membranschicht 10 – 15 % der Lipide eine anionische Ladung tragen.^[14,21,22] Durch den Ausschluss bestimmter Lipide von der Lipid-Protein-Grenzfläche und die Rekrutierung anderer Lipidmoleküle können energetisch ungünstige Packungsdefekte in der Membran minimiert sowie die Exposition hydrophober Bereiche reduziert werden.^[23] Dieser Vorgang wird als hydrophober *mismatch* bezeichnet.^[24] Nicht nur Lipid-Protein-Interaktionen haben eine Auswirkung auf die Membraneigenschaften, sondern auch Lipid-Lipid-Wechselwirkungen. Der Einbau von Cholesterin in eine Lipidmembran aus gesättigten Phosphoglyceriden bzw. Sphingolipiden bewirkt in der lateralen Ebene eine Entmischung der Lipidmoleküle und bildet geordnete Membrandomänen in einer sonst fluiden Lipidmatrix (Abbildung 1-4).^[20,25] Diese nanoskopischen, transienten *raft*-Domänen innerhalb der Zellmembran wurden 1997 von SIMONS und IKONEN postuliert und sind für verschiedene zelluläre Prozesse, wie u.a. Transportprozessen und Signalweiterleitung, essentiell.^[26,27] Aufgrund der kurzen Lebensdauer und der geringen Größe dieser *raft*-Domänen wird ihre Existenz in lebenden Zellen bis heute noch diskutiert.^[28] Die Untersuchung räumlicher und zeitlicher Prozesse einer zellulären Membran

unter kontrollierten Bedingungen wird durch ihre komplexe und dynamische Struktur erschwert, daher ist die *in vitro* Nachbildung dieser biologischen Systeme durch Modellmembranen eine lohnenswerte Alternative, um Einflüsse verschiedener Substrate und Komponenten sowie membranassoziierte Vorgänge zu analysieren und verstehen.

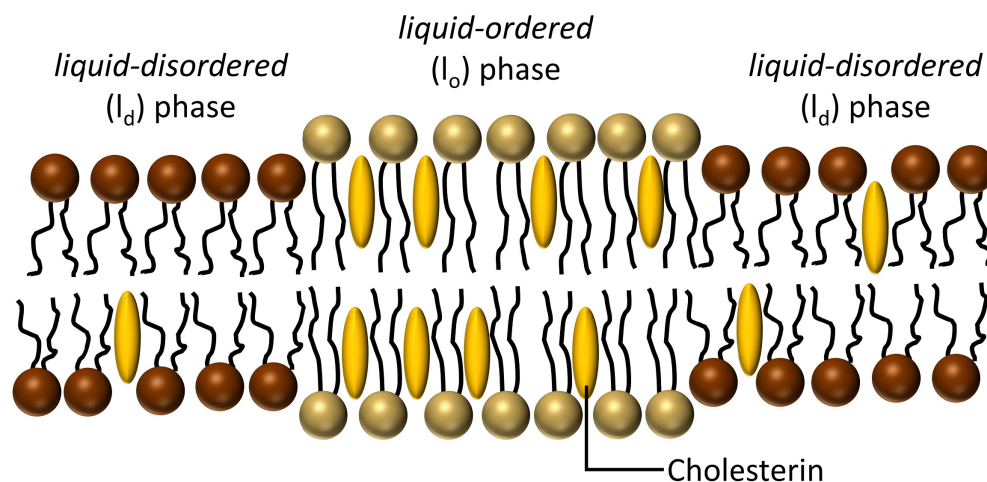


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der cholesterinhaltigen l_o - und cholesterinarmen l_d -Phasen.

1.2 Zielsetzung

Auch wenn einige Wissenschaftler heutzutage Lipidmembranen noch als „*plastic bags*“ (Michael J. Russell, 2019, *Why does life start, what does it do, where will it be, and how might we find it?* - "Solvation Science meets High Pressure Bioscience" 10th IMBP - DFG FOR 1979 – RESOLV, Dortmund) abtun, hat sich doch das grundlegende Verständnis über die Relevanz von Lipidmembranen für biologische Prozesse in den vergangenen Jahrzehnten durch den Einsatz neuer Methoden und den daraus resultierenden Erkenntnissen, Theorien und Modellen stark gewandelt. Die Lipidmembran wird nicht mehr nur als zweidimensionale Matrix, die die Aufnahme von Membranproteinen und weiteren Komponenten regelt sowie die Zelle vom extrazellulären Raum abgrenzt gesehen, sondern ihr werden auch wichtige Aufgaben in vielen membranassoziierten Vorgängen zugesprochen. Die Untersuchung der Wechselwirkungen dieses Grundbausteins des zellulären Lebens mit verschiedenen natürlichen und synthetischen Agenzien sowie die Untersuchung von Modifikationen der Membran durch unterschiedliche Zusätze, um gezielte Optimierungen ausgewählter Prozesse und Vorgänge zu erreichen, ist dabei von hohem Interesse. Ein weiteres Ziel ist auch, die Optimierung aktuell verwendeter Membranmodellsysteme durch Varianz

1 Einleitung

1.2 Zielsetzung

und Anpassung der Lipidzusammensetzung sowie die Simulation des makromolekularen *Crowdings* innerhalb der Zelle, um noch naturähnlichere Zustände zu erreichen und somit möglichst realistische *in vitro* Untersuchungen zu gewährleisten.

1.2.1 Vorstellung der Projekte

In diesem Teil der Arbeit sollen kurz die verschiedenen Projekte, deren jeweiliges Ziel und ihre Signifikanz vorgestellt werden:

I. HOCHDRUCKFLUORESZENZMIKROSKOPIE

Neben der Temperatur ist Druck der wichtigste thermodynamische Parameter, der zur Untersuchung biologischer Systeme angewendet werden kann. In vielen Studien haben sich Lipidmembranen von allen zellulären Bestandteilen als besonders drucksensitiv hervorgetan. Dabei ist das Verständnis der intrinsischen Wirkung von Druck auf Membranen entscheidend für die Erforschung der Anpassung von Tiefseeorganismen an hohe hydrostatische Drücke. Die hier geleisteten Untersuchungen sollen als Ausgangspunkt für spätere mikroskopische Druckuntersuchungen an Lipidmembranen fungieren, um so Aussagen über die Biegesteifigkeit und das Struktur- sowie das Phasenverhalten von Lipidmembranen unter hohen hydrostatischen Drücken, in Kombination mit verschiedenen Substraten und Osmolyten treffen zu können.

II. UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VERSCHIEDENER GLYKANSYSTEME AUF DAS BAROTROPE UND THERMOTROPE PHASENVERHALTEN SOWIE DIE PHASENORGANISATION VERSCHIEDENER MODELLMEMBRANEN

Die Untersuchung des Einflusses von Glykanen auf Zellmembranen hat durch die allgegenwärtige Präsenz von hydrierten Glykannetzwerken in unmittelbarer Nähe zu Plasmamembranen eine hohe Signifikanz. Doch trotz ihrer Häufigkeit ist die Funktion von Glykanen im extrazellulären Milieu noch weitestgehend unbekannt. Daher soll dieses Projekt zum einen neue Einblicke in die Wechselwirkungen verschiedener Lipidmodellmembranen mit unterschiedlichen Glykanen bieten, zum anderen als Basis für weitere Untersuchungen dienen. Dazu untergliedert sich dieses Projekt in drei weitere Teile, die jedoch unter dem Oberbegriff des Einflusses

von Glykanen auf das Struktur- sowie Phasenverhalten von Lipidmembranen zusammengefasst werden können. Im ersten Projektteil sollen fortführende Untersuchungen des Einflusses der Hyaluronsäure auf eine DPPC-Modellmembran mittels DSC und Fluoreszenzspektroskopie gemacht werden, um den Einfluss von Ionen in Lösung sowie des Molekulargewichts der Hyaluronsäure ermitteln zu können. Der zweite Projektteil soll den Einfluss von Dextran auf das Phasenverhalten eines 5-Komponentenmembransystems (5 KS) untersuchen. Dabei wird vor allem das Augenmerk auf die Aufteilung der l_o - und l_d -Phasen dieses heterogenen anionischen *raft*-Systems in Bereichen mit homogener und inhomogener Dextranverteilung gerichtet. Im letzten Teilprojekt wird der Einfluss eines wässriges Zweiphasensystems aus PEG und Dextran, welches als Modellsystem für makromolekulare, zytosolische Verdichtung herangezogen werden kann, auf das Struktur- und Phasenverhalten des gleichen 5 KS wie im Teilprojekt zuvor untersucht. Ziel ist es, in einem späteren Stadium dieser Untersuchungen die Wirkung dieses Zweiphasensystems auf Modellmembranen unter hohen hydrostatischen Drücken zu analysieren, wofür die Charakterisierung des barotropen Phasenverhaltens dieser Modellmembran aus dem Projekt I herangezogen werden kann.

III. EINFLUSS VERSCHIEDENER OSMOLYTE AUF LIPIDMODELLMEMBRANEN

Osmolyte, kleine organische Moleküle, stabilisieren den nativen Zustand von Biomolekülen und halten das osmotische Gleichgewicht innerhalb einer Zelle aufrecht. Natürliche Osmolyt-Verbindungen, die von extremophilen Mikroorganismen unter extremen Situationen synthetisiert werden, wie z.B. drastischen Temperaturveränderungen oder hohen Salzkonzentration, werden im Allgemeinen als Extremolyte bezeichnet. Diese Substrate sind biologisch inert und akkumulieren in hohen Konzentrationen im Zytoplasma, ohne mit den allgemeinen zellulären Funktionen zu interagieren. Ectoin und Hydroxyectoin sind solche Substanzen, die von den Organismen zum Schutz der zelleigenen Biopolymere gegen u.a. Trockenheit, Hitze, Einfrieren und osmotischen Stress synthetisiert werden. Die Erklärung des zugrundeliegenden Schutzmechanismus basiert bisher nur auf Vermutungen und ist vor allem für Peptide und Nukleinsäuren erforscht worden. Nur einige wenige Studien haben sich auch mit den Wechselwirkungen mit Lipidmembranen beschäftigt. Für

1 Einleitung

1.2 Zielsetzung

das β -Hydroxybutyrat konnte ebenfalls ein gewisser Schutz der Zellproteine gegen Hitze und hohe Drücke festgestellt werden. Um diesen Schutzmechanismus aufzuklären, sollen die Auswirkungen dieser drei Substrate auf Lipidmembranen bei hohen Temperaturen und Drücken untersucht werden. Dazu wurde hier insbesondere die schützende Wirkung der Osmolyte auf den Phasenübergang von DPPC-Doppelschichten mittels Fluoreszenzspektroskopie, DSC und PPC untersucht.

IV. EINFLUSS DES MONORHAMNOLIPIDS RHA_{C10}C₁₀ AUF VERSCHIEDENE LIPIDMODELLMEMBRANEN

&

V. VERGLEICHENDE STUDIE DES EINFLUSSES DER ANZAHL VON RHAMNOSE-EINHEITEN VON RHAMNOLIPIDEN AUF LIPIDMODELLMEMBRANEN UNTERSCHIEDLICHER KOMPLEXITÄT

Rhamnolipide stellen eine große Klasse von biologisch hergestellten, oberflächenaktiven Verbindungen dar, die an zahlreichen verschiedenen essentiellen Zellfunktionen beteiligt sind. Während viele Studien über die antibakteriellen und antimykotischen Wirkungen von Rhamnolipiden berichtet haben, wurde in nur wenigen Studien versucht, die molekularen Mechanismen zu beschreiben, die diesen Wirkungen zugrunde liegen. In Projekt IV werden dazu zuerst die Einflüsse des Monorhamnolipids Rha_{C10}C₁₀ auf Lipidmembranen aus einer DPPC-, einer DOPE/DPPG-Modellmembran sowie dem 5 KS bestehend vorgestellt, bevor in Projekt V die Wechselwirkungen von zwei bekannten Rhamnolipid-Kongeneren, dem Monorhamnolipid Rha_{C10}C₁₀ und Dirhamnolipid RhaRha_{C10}C₁₀ sowie dem 3-(3-Hydroxydecanoyloxy)decanoat, einer Synthesestufe der beiden Rhamnolipide, auf die gleichen Lipidmembransysteme untersucht und verglichen werden. Indem sich auf die Wechselwirkungen zwischen Rhamnolipiden und Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität bis hin zu anionischen heterogenen *raft*-artigen Modellbiomembranen konzentriert wird, sollen neue Einblicke in Veränderungen der lateralen Membranorganisation und morphologische Veränderungen von Lipidvesikeln erhalten werden. Zu diesem Zweck wurden AFM, konfokale Fluoreszenzmikroskopie, DSC und LAURDAN-Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt. Einleitend soll ferner eine kurze zusammenfassende Beschreibung der physikalisch-

chemischen Wirkungen, die Rhamnolipide auf Lipidmembranen ausüben, gegeben werden, um ihre physiologische Rolle zu verstehen.

VI. EINFLUSS VON IMIDAZOLIUMBASIERTEN LIPIDEN AUF VERSCHIEDENE LIPIDMODELLMEMBRANEN

In diesem Projekt sollen die Wechselwirkungen eines sterisch anspruchsvollen, biophysikalisch unerforschten alkylierten Imidazoliumsalzes, 1,3-Bis (2,6-diisopropylphenyl)-4,5-diundecylimidazoliumbromid ($C_{11}IPr$), auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften verschiedener Modellbiomembransysteme untersucht werden. Diese Ergebnisse sollen anschließend mit denen für die Imidazoliumsalz-Variante mit einer kleineren Kopfgruppe, 1,3-Dimethyl-4,5-diundecylimidazoliumiodid ($C_{11}IMe$), verglichen werden. Dazu wurde der Einfluss dieser beiden imidazoliumbasierten Lipide in verschiedenen Konzentrationen auf Modellbiomembransysteme unterschiedlicher Komplexität, einschließlich anionischer heterogener *raft*-Membranen, die eher natürlichen Membranen entsprechen, betrachtet. DSC-, Fluoreszenzspektroskopie-, Oberflächenpotenzial- und FT-IR-Messungen wurden durchgeführt, um Änderungen des thermotropen Phasenverhaltens der Membran, der Lipidkonformationsordnung, der Fluidität und der Kopfgruppenladung anzuzeigen. Komplementäre AFM- und konfokale Fluoreszenzmikroskopiemessungen ermöglichen es, Änderungen in der lateralen Organisation und Membranomorphologie festzustellen.

VII. UNTERSUCHUNG DER TRANSFEKTIONSEIGENSCHAFTEN IMIDAZOLIUMBASIERTER LIPIDE

Da gezeigt wurde, dass mehrere 4,5-dialkylierte Imidazoliumsalze die Lipidmembranen auf verschiedene Weise beeinflussen, sollen hier die Wechselwirkung von Modellbiomembranen mit einem neuartigen, doppelt positiv geladenen lipidähnlichen Imidazoliumsalz, (1,3-Dimethyl-4,5-dipentadecyl-2-(5-(trimethylammonio)pentyl)-imidazoliumiodid (TM) sowie dem einfach geladenen Analogon, 1,3-dimethyl-4,5-dipentadecylimidazoliumiodid ($C_{15}IMe$), zur Erforschung des Potenzials dieser Molekülklasse eine Vesikelfusion einzuleiten, untersucht und verglichen

1 Einleitung

1.2 Zielsetzung

werden. Fluoreszenzspektroskopie-, AFM-, Fluoreszenzspektroskopie und konfokale Fluoreszenzmikroskopiemessungen wurden durchgeführt, um Änderungen in der Lipidkonformationsordnung, der lateralen Membranorganisation und der Membranomorphologie nach Insertion der lipidierten Imidazoliumsalze aufzuzeigen. Um die Membranfusionsneigung der Imidazoliumsalze zu untersuchen, wurde eine fluoreszenzmarkierte heterogene 5 KS-Modellmembran, dem ebenfalls fluoreszenzmarkierten Frachtlipidsystem DPPC/DOPE mit 10 mol% des jeweiligen Imidazoliumsalzes ausgesetzt und mittels Fluoreszenzmikroskopie überwacht.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien

Tabelle 2-1: Verwendete Chemikalien mit Bezugsquellen

Chemikalie	Herkunft
Hyaluronsäure (≥ 1000 kDa) Hyaluronic acid sodium salt, Streptococcus equi, 91%	Alfa Aesar (Ward Hill)
Hyaluronsäure (~ 10 kDa), Hyaluronic acid sodium salt 97 %	Creative PEGWorks (Chapel Hill (NC), USA)
Ectoin	Bitop AG (Deutschland)
Hydroxyectoin	Bitop AG (Deutschland)
β -Hydroxybutyrat	Sigma-Aldrich (Deutschland)
C ₁₁ IMe·HI	WWU Münster, Arbeitsgruppe (AG) Prof. Dr. F. GLORIUS
C ₁₁ IPr·HBr	WWU Münster, AG Prof. Dr. F. GLORIUS
C ₁₅ IMe·HI	WWU Münster, AG Prof. Dr. F. GLORIUS
TM	WWU Münster, AG Prof. Dr. F. GLORIUS
HAA	RWTH Aachen, AG Prof. Dr. L. Blank
RhaC ₁₀ C ₁₀	RWTH Aachen, AG Prof. Dr. L. Blank
RhaRhaC ₁₀ C ₁₀	RWTH Aachen, AG Prof. Dr. L. Blank
DPPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)
DOPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)
Cholesterin	Sigma Aldrich (Deutschland)
DOPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)
DPPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)
Agarose Typ IX-A (Gelpunkt $T_g \leq 17$ °C, Schmelzpunkt $T_m \leq 60$ °C)	Sigma-Aldrich (Deutschland)
Polyvinylalkohol, vollhydrolysiert (MW ~ 145000)	Merck KGaA (Deutschland) bestellt bei VWR (Darmstadt, Deutschland)
Polyethylenglycol (4,6 kDa)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dextran (10 kDa)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dextran, ATTO Fluor™ 647, 10000 MW	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
SBA-ALEXA-647	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
NaCl	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
HEPES	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
TRIS	Alfa Aesar (Haverhill, USA)
MgCl ₂	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
N-Rhodamin-DHPE	Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA)
NBD-DHPE	Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA)
ATTO 647	ATTO-TEC (Siegen, Deutschland)
LAURDAN	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Chloroform	Merck Millipore Uvasol®, Darmstadt
Methanol	VWR Chemicals (Darmstadt) HiPerSolv CHROMANORM

2.2 Verwendete Messgeräte und Software-Programme**Tabelle 2-2:** Verwendete Messgeräte sowie zugehörige Programme

Methode	Apparatur	Programme
AFM	Multimode Atomic force microscope, Digital Instruments, Santa Barbara (Kalifornien, USA)	Nanoscope® Software 6.13
CMC	Oberflächendrucksensor Typ PS4 (NIMA Technology Ltd., England)	NIMA Software
DLS / Zeta- Potenzial	ZetaSizer Nano ZS, Einwegkapillarmesszellen DTS 1070 (Malvern Instruments, Malvern, UK)	ZetaSizer Nano ZS Soft- ware
DSC / PPC DSC	VP DSC Mikrokalorimeter mit MicroCal PPC Aufsatz, MicroCal (Northampton, MA, USA) Q20 DSC (TA instruments, New Castle, USA)	MicroCal Origin Software TA instruments
Fluoreszenz- mikroskopie	<ul style="list-style-type: none"> - Konfokales Laser-Scanning-System MRC 1024, Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA (heute Zeiss, Deutschland) - Inverses Mikroskop Eclipse TE-300DV, Nikon, Tokio, Japan - Laser Combiner L4Cc, Oxxius, S.A., France <p>Objektive:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Typ CFI Plan Apo Lambda 100x Oil, NA 1,45, WD 0,13 mm, Nikon, Tokio, Japan - Typ CFI Lu Plan ELWD 50x Air, NA 0,55, WD 10,1 mm, Nikon, Tokio, Japan - Typ CFI Plan APO 60x Air, NA 1.20, WD 0,22 mm, Nikon, Tokio, Japan - Typ CFI Superplan Fluor ELWD 40x Air, NA 0,6, WD 3,6-2,8 mm, Nikon, Tokio, Japan - Typ CFI Superplan Fluor ELWD 20x Air, NA 0,45, WD 8,2-6,9 mm, Nikon, Tokio, Japan 	<p>Bildaufnahme: La- serSharp2000, Biorad, heute Carl Zeiss, Oberko- chen, Deutschland</p> <p>Laser: Oxxius Lasers, Oxxius S.A. France</p>
Fluoreszenz- spektroskopie	Multifrequenz Phasen- und Modulationsfluorometer Typ K2 Firma ISS (Urbana, IL)	Vinci 2 (ISS, Urbana, IL)
FT-IR-Spekt- roskopie	Vertex 70 FT-IR-Spektrometer Firma Bruker	OPUS (Firma Bruker)
Auswertungs- software		OriginPro 2015G 64 Bit, Excel 2013, <i>ImageJ</i>

2.3 DSC

2.3.1 Probenpräparation

Für DSC-Messungen am TA Instrument (New Castle, DE, USA) wurden 10 mg der jeweiligen Lipidlösung in Chloroform gelöst und dieses anschließend unter einem Stickstoffstrom wieder entfernt, sodass ein dünner Lipidfilm im Gefäß zurückblieb. Restliches Chloroform wurde anschließend in einem Lyophilisator für mindestens 2 Stunden entfernt. Danach wurden 90 μL der Pufferlösung bzw. Pufferlösung mit gelöstem Substrat zugegeben und für 30 min in ein Ultraschallbad bei Temperaturen, die so gewählt wurden, dass die Lipide in der fluiden Phase (L_{α}/l_d) vorliegen, gestellt. Damit sollte eine möglichst homogene Größenverteilung der Lipidvesikel erreicht werden. Anschließend wurde die Probe kurz gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad wieder auf eine Temperatur oberhalb des Lipidschmelzpunktes erhitzt. Dieser Zyklus aus Mischen, Einfrieren und Auftauen wurde insgesamt fünfmal durchgeführt und diente zum Erhalt multilamellarer Vesikel. Die DSC-Messungen wurden mit einer Heizrate von $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ vorgenommen. Als Referenz diente die jeweilige Pufferlösung bzw. die Pufferlösung mit gelöstem Substrat.

Für DSC-Messungen am VP DSC Micro-Kalorimeter (MicroCal, Northampton, MA, USA) wurden die Proben, wie zuvor beschrieben, präpariert. Die Unterschiede zwischen den Geräten lagen in der benötigten Probenkonzentration und Heizrate, die am VP DSC Micro-Kalorimeter nur 5 mg mL^{-1} sowie $0,5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ betragen.

2.3.2 Messungen

Tabelle 2-3: Mit DSC untersuchte Proben bei denen externe Zusätze zugegeben wurden.

Lipidsystem	Zusatz	Puffer	T-Intervall / °C	Kapitel
DPPC		H ₂ O (pH 7,0)	25-50	3.2.2
DPPC	+ 10 kDa HA	H ₂ O (pH 7,0)	25-50	
DPPC	+ 1000 kDa HA	H ₂ O (pH 7,0)	25-50	
DPPC		155 mM NaCl (pH 7,0)	25-50	
DPPC	+ 10 kDa HA	155 mM NaCl (pH 7,0)	25-50	
DPPC	+ 1000 kDa HA	155 mM NaCl (pH 7,0)	25-50	
<hr/>				
DPPC		50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)	25-55	3.3.4
DPPC	+ 1 M Ectoin	50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)	25-55	
DPPC	+ 1 M Hydroxyectoin	50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)	25-55	
DPPC	+ 1 M Hydroxybutyrat	50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)	25-55	

Tabelle 2-4: Mit DSC untersuchte Proben bei denen Zusätze in die Membran eingebaut wurden.

Lipidsystem	Zusatz	Puffer	T-Intervall / °C	Kapitel
DPPC		10 mM HEPES (pH 7,4)	20 - 55	3.5.2
DPPC	+ 1, 5, 10 mol% RhaC ₁₀ C ₁₀	10 mM HEPES (pH 7,4)	20 - 55	
DPPC	+ 1, 5, 10 mol% HAA	10 mM HEPES (pH 7,4)	20 - 55	
DPPC	+ 1, 5, 10 mol% Rha-RhaC ₁₀ C ₁₀	10 mM HEPES (pH 7,4)	20 - 55	
<hr/>				
¹ DPPC	+ 0-15 mol% C ₁₁ IMe	10 mM HBS (pH 7,4)	20-55	3.6.4
¹ DPPC	+ 0-50 mol% C ₁₁ IPr	10 mM HBS (pH 7,4)	20-55	

¹ Diese Messungen wurden von S. Kriegler in seiner Bachelorarbeit „Einfluss von Imidazoliumsalzen auf Lipidmodellmembranen“ (2018) unter Anleitung von M. Herzog und S. Bornemann durchgeführt.

2.3.3 Methode

Zur Untersuchung von thermodynamischen Parametern während Phasenumwandlungen und Strukturänderungen von Lipidmembranen eignen sich kalorimetrische Methoden besonders gut. Eine dieser Methoden ist die „*Differential Scanning Calorimetry*“ (dt. dynamische Differenzkalorimetrie). Dabei wird die Temperaturänderung einer Probe während der Zufuhr bzw. Abfuhr von Wärme gemessen und diese dann mit einer Referenz, meist aus dem reinen Puffer bestehend, verglichen. Während des voneinander getrennten Erhitzens von Probe und Referenz in thermisch isolierten Gefäßen wird ihre jeweilige Temperatur aufgezeichnet. Von außen kann es zu keinerlei Wärmeaufnahme bzw. Wärmeabgabe kommen. Vor Messbeginn wird eine gewünschte Heizrate für die beiden Systeme festgelegt, die die benötigte Temperaturänderung ΔT pro Zeiteinheit Δt angibt:

$$\beta = \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad 2-1$$

Daraus folgt für die Temperatur T des Systems:

$$T = T_0 + \beta \cdot t \quad 2-2$$

mit T_0 = Temperatur zu Messbeginn und t = Zeitpunkt. Während der Messung bleibt die Temperatur in der Probe T_P und Referenz T_R identisch, wodurch bei z.B. endothermen Phasenumwandlungen in der Probe diese im Vergleich zur Referenz wesentlich stärker aufgeheizt werden muss. Die Differenz der daraus resultierenden größeren Heizleistung P_P der Proben gegenüber der Referenz P_R ist die Messgröße ΔP :

$$\Delta P = P_P - P_R \quad 2-3$$

Der Unterschied der Heizleistungen ist proportional zur Differenz der Wärmekapazitäten $\Delta C(T)$ von Probe $C_P(T)$: und Referenz $C_R(T)$:

$$\Delta C(T) = C_P(T) - C_R(T) = \Delta P(T) / \beta$$

2-4

Im Messverlauf wird in einem DSC-Thermogramm ΔP gegen T aufgetragen. Bei bekannter Heizrate kann die Wärmekapazität bestimmt und gegen die Temperatur aufgetragen werden. Eine in Relation zum reinen Lösungsmittel gemessene Wärmekapazität der Probe wird als Exzesswärmekapazität bezeichnet und setzt sich anteilig aus der spezifischen Wärme

während einer Phasenumwandlung C_m sowie der Basislinienverschiebung, die aus der Differenz der Wärmekapazitäten von Probe und Referenz resultiert, zusammen. In Abbildung 2-1 ist ein solches DSC-Thermogramm schematisch dargestellt.

Aus der Integration zwischen Anfangs- (T_1) und Endtemperatur (T_2) des DSC-Peaks nach erfolgter Untergrundkorrektur bzw. direkt aus der $C_m(T)$ -Kurve kann die Umwandlungsenthalpie ΔH_m ermittelt werden:

$$\Delta H_m = \int_{T_1}^{T_2} C_m(T) dT \quad 2-5$$

Für die in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchten Lipide und Lipidvesikel lassen sich mit dieser kalorimetrischen Methode die Phasenumwandlungstemperaturen sowie die zugehörigen Umwandlungsenthalpien messen. Die Lipide durchlaufen dabei in der Regel zwei endotherme Phasenumwandlungen, die als Gel-zu-Gel-Vorumwandlung sowie bei weiterer Erhöhung der Temperatur als Gel-zu-flüssig-kristalline Hauptumwandlung (s. Kapitel 1.1.2) bezeichnet werden. Die Enthalpieänderung kann durch die Integration der Fläche zwischen T_1 und T_2 bestimmt werden. Ausgehend von der Annahme, dass es sich um einen reversiblen Phasenübergang erster Ordnung handelt, kann die entsprechende Entropieänderung ΔS_m mit folgender Gleichung erhalten werden:

$$\Delta S_m = \frac{\Delta H_m}{T_m} \quad 2-6$$

T_m entspricht dem Maximum der Wärmekapazitätskurve des Thermogramms und ist folglich die Hauptphasenübergangstemperatur des Lipids.^[1,29]

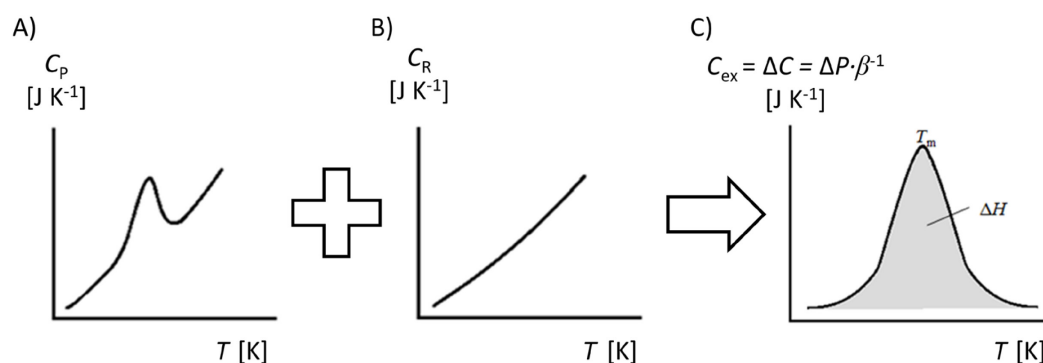


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung eines endothermen DSC-Thermogramms. Darstellung der A) Wärmekapazität der Probenzelle C_p , B) der Referenzzelle C_R und C) das resultierende endotherme DSC-Thermogramm. Aus dem DSC-Thermogramm können die Daten der Hauptphasenübergangstemperatur T_m und der Umwandlungsenthalpie ΔH direkt erhalten werden (Abbildung modifiziert aus Literatur^[29]).

2.4 PPC

2.4.1 Probenpräparation

Die gemessenen Proben der PPC (*pressure perturbation calorimetry*) waren identisch mit denen, welche mittels VP DSC micro-Calorimeter (MicroCal, Northampton, MA, USA) mit einem MicroCal PPC-Zusatz ebenfalls gemessen worden sind. Die PPC-Messungen wurden mit einer Equilibrierung bei der gewünschten Starttemperatur begonnen und anschließend mit Drucksprüngen von 5 bar fortgeführt. Als Druckmedium wurde gasförmiger Stickstoff verwendet. Kalibriert wurde vor jeder Messreihe mit Wasser/Wasser-, Wasser/Puffer-, Puffer/Puffer- und Puffer/Probe-Messungen. Die Datenauswertung wurde mit der MicroCal Origin Software durchgeführt, wobei ein spezifisches Volumen des DPPCs von $v = 0,9876 \text{ mL g}^{-1}$ verwendet worden ist.^[30]

2.4.2 Messungen

Tabelle 2-5: Mit PPC durchgeführte Messungen.

Lipidsystem	Zusatz	Puffer	T-Intervall / °C	Kapitel
DPPC		50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)	25-53	3.3.4
DPPC	+ 1 M Ectoin	50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)	25-53	
DPPC	+ 1 M Hydroxyectoin	50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)	25-53	
DPPC	+ 1 M Hydroxybutyrat	50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)	25-53	

2.4.3 Methode

Die Druck-Perturbations-Kalorimetrie ermöglicht eine effiziente Messung von volumetrischen Eigenschaften von Biomolekülen in Lösung. Der Aufbau der PPC ist in Abbildung 2-2 schematisch dargestellt und weitgehend identisch mit einer Leistungskompensations-DSC. Dabei wird jedoch die Wärmefreisetzung bzw. der Wärmeverbrauch der Probe nach einem isothermen Drucksprung (meist $\pm 5 \text{ bar}$) gemessen. Die hauptsächliche Messgröße ist der thermische Ausdehnungskoeffizient α .

2 Material und Methoden

2.4 PPC

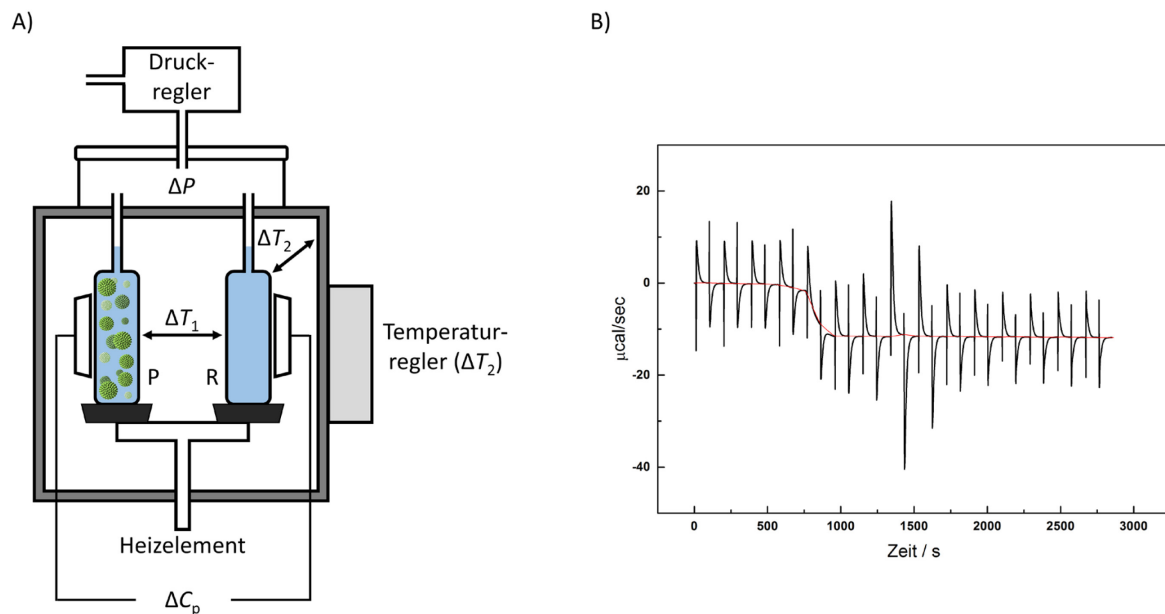


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Messresultate einer PPC. Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau einer PPC (A) und die Rohdaten einer PPC-Messung von DPPC gegen einen Phosphatpuffer. Dabei sind die charakteristischen Wärmefluss-Antworten auf die Druckamplituden zu erkennen (Abbildung modifiziert aus Literatur ^[30]).

Der thermische Ausdehnungskoeffizient ist definiert als:

$$\alpha = \left(\frac{1}{V}\right) \left(\frac{\partial V}{\partial T}\right)_p \quad 2-7$$

wobei V dem Probenvolumen und T der Temperatur entspricht. Bei bekanntem α ist es dann möglich, die relative Volumenveränderung $\Delta V/V$ am Phasenübergang im Temperaturbereich von T_1 bis T_2 zu ermitteln:

$$\frac{\Delta V}{V} = \int_{T_1}^{T_2} \alpha(T) dT \quad 2-8$$

Aus der relativen Volumenveränderung kann dann die absolute spezifische Volumenveränderung ΔV bestimmt werden:

$$\Delta V = \left(\frac{\Delta V}{V}\right) / c \quad 2-9$$

Dabei entspricht c der Probenkonzentration in mg mL^{-1} .^[30]

2.5 Fluoreszenzspektroskopie

2.5.1 Probenpräparation

Für die Untersuchung aller gemessenen Druckreihen wurden insgesamt 1,5 mL Gesamtvolumen der Proben benötigt. Für die Messungen mit variierender Temperatur betrug das benötigte Volumen pro Messung 100 μL . Die Konzentration an Lipid in Lösung betrug 5 mg mL^{-1} und der Fluorophor LAURDAN wurde in einem molaren Verhältnis von 0,0000735:1 zu den Lipiden zugegeben. Die Präparation der MLVs erfolgte wie in 2.3.1 beschrieben. Die temperaturabhängigen Messungen wurden in einer verschlossenen Ultra-Mikro-Küvette aus 3 mm dickem Quarzglas der Firma Hellma (Mühlheim, Deutschland) durchgeführt. Durch Verwendung eines Drei-Positionen-Küvettenhalters der Firma ISS (Urbana, IL) konnte eine zeitgleiche Doppelbestimmung von Probe und Referenz durchgeführt werden.

Die druckabhängigen Messungen wurden in einem, mit einer flexiblen Plastikfolie und O-Ring verschlossenen, Quarzgefäß durchgeführt, welches in der Mitte der Hochdruckzelle platziert wurde. Der Druckaufbau erfolgte mittels Wasser über ein Rohrsystem mit einer Handspindelpumpe der Firma Hip (High Pressure Equipment Company, Erie, PA). Der Druck wurde über ein Manometer der Firma Burster Präzisionsmesstechnik (Gernsbach, Deutschland) bestimmt. Sowohl die druck- als auch temperaturabhängigen Messungen wurden durch ein externes Kälte-Umwälzthermostat der Firma Julabo (Seelbach, Deutschland) temperiert.

Zur Anregung des Fluorophors wurde Licht mit einer Wellenlänge von 390 nm genutzt und die Emission wurde bei 440 nm (I_B) und 490 nm (I_R) detektiert.

2.5.2 Messungen

In den nachfolgenden Tabellen sind die einzelnen Messungen und die jeweils herrschenden Bedingungen aufgeführt.

Tabelle 2-6: Fluoreszenzspektroskopisch temperaturabhängig gemessene Proben mit Zusatz in Pufferlösung bei Atmosphärendruck.

Lipidsystem	Zusatz	Puffer	T-Intervall / °C	Kapitel
DPPC		H ₂ O (pH 7,0)	25-55	3.2.3
DPPC	+ 10 kDA Ha	H ₂ O (pH 7,0)	25-55	
DPPC	+ 1000 kDA Ha	H ₂ O (pH 7,0)	25-55	
DPPC		155 mM NaCl (pH 7,0)	25-55	
DPPC	+ 10 kDA Ha	155 mM NaCl (pH 7,0)	25-55	
DPPC	+ 1000 kDA Ha	155 mM NaCl (pH 7,0)	25-55	
DPPC		50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)	25-50	3.3.3
DPPC	+ 1 M Ectoin	50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)	25-50	
DPPC	+ 1 M Hydroxyectoin	50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)	25-50	
DPPC	+ 1 M Hydroxybutyrat	50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)	25-50	

Tabelle 2-7: Fluoreszenzspektroskopisch temperaturabhängig gemessene Proben in Pufferlösung bei Atmosphärendruck.

Lipidsystem		Puffer	T-Intervall / °C	Kapitel
DPPC		10 mM HEPES (pH 7,4)	20-50	3.4.2 & 3.5.3
DPPC	+ 1, 5, 10, 20 mol% HAA	10 mM HEPES (pH 7,4)	20-50	
DPPC	+ 1, 5, 10, 20 mol% RhaC ₁₀ C ₁₀	10 mM HEPES (pH 7,4)	20-50	
DPPC	+ 1, 5, 10, 20 mol% RhaRhaC ₁₀ C ₁₀	10 mM HEPES (pH 7,4)	20-50	
DOPE/DPPG (2:1)		10 mM HEPES (pH 7,4)	5-60	
DOPE/DPPG (2:1)	+ 15 mol% HAA	10 mM HEPES (pH 7,4)	5-60	

Fortsetzung Tabelle 2-7: Fluoreszenzspektroskopisch temperaturabhängig gemessene Proben in Pufferlösung bei Atmosphärendruck.

Lipidsystem		Puffer	T-Intervall / °C	Kapitel
DOPE/DPPG (2:1)	+ 15 mol% RhaC ₁₀ C ₁₀	10 mM HEPES (pH 7,4)	5-60	3.4.2 & 3.5.3
DOPE/DPPG (2:1)	+ 15 mol% RhaRhaC ₁₀ C ₁₀	10 mM HEPES (pH 7,4)	5-60	
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)		10 mM HEPES (pH 7,4)	10-80	
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 10, 20 mol% HAA	10 mM HEPES (pH 7,4)	10-80	
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 10, 20 mol% RhaC ₁₀ C ₁₀	10 mM HEPES (pH 7,4)	10-80	
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 10, 20 mol% RhaRhaC ₁₀ C ₁₀	10 mM HEPES (pH 7,4)	10-80	
<hr/>				
DPPC		10 mM HBS (pH 7,4)	25-55	3.6.5
DPPC	+ 10 mol% C ₁₁ Ime	10 mM HBS (pH 7,4)	25-55	
DPPC	+ 10 mol% C ₁₁ IPr	10 mM HBS (pH 7,4)	25-60	
DPPC/DOPC/Cholesterin (2:1:1)		10 mM HBS (pH 7,4)	10-80	
DPPC/DOPC/Cholesterin (2:1:1)	+ 5, 10 mol% C ₁₁ Ime	10 mM HBS (pH 7,4)	10-80	
DPPC/DOPC/Cholesterin (2:1:1)	+5, 10 mol% C ₁₁ IPr	10 mM HBS (pH 7,4)	10-80	
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)		10 mM HBS (pH 7,4)	10-80	
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 5, 10 mol% C ₁₁ Ime	10 mM HBS (pH 7,4)	10-80	
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 5, 10 mol% C ₁₁ IPr	10 mM HBS (pH 7,4)	10-80	
<hr/>				
DPPC	+ 10 mol% TM	10 mM HBS (pH 7,4)	20-55	3.7.3
DPPC/DOPE/Cholesterin (2:1:1)	+ 10 mol% TM	10 mM HBS (pH 7,4)	10-80	
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 10 mol% TM	10 mM HBS (pH 7,4)	10-80	

Tabelle 2-8: Fluoreszenzspektroskopisch druckabhängig gemessene Proben.

Lipidsystem	Zusatz	Puffer	p -Intervall / bar	$T / ^\circ\text{C}$	Kapitel
DPPC		50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)	1-1500	50	3.3.3
DPPC	+ 1 M Ectoin	50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)	1-1500	50	
DPPC	+ 1 M Hydroxyectoin	50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)	1-1500	50	
DPPC	+ 1 M Hydroxybutyrat	50 mM Phosphatpuffer (pH 7,0)	1-1500	50	

Tabelle 2-9: Fluoreszenzspektroskopisch zeitabhängig gemessene Proben bei Umgebungstemperatur und Atmosphärendruck.

Lipidsystem	Zusatz	Puffer	Kapitel
DPPC	+ 0,09 mg mL ⁻¹ RhaC ₁₀ C ₁₀	10 mM HEPES (pH 7,4)	3.4.2
DOPE/DPPG (2:1)	+ 0,09 mg mL ⁻¹ RhaC ₁₀ C ₁₀	10 mM HEPES (pH 7,4)	
DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 0,09 mg mL ⁻¹ RhaC ₁₀ C ₁₀	10 mM HEPES (pH 7,4)	

2.5.3 Methode

Eine zerstörungsfreie Analyse der Struktur und Dynamik komplexer Systeme und Moleküle gewährleistet die Fluoreszenzspektroskopie. Diese Methode basiert auf der Anregung eines Moleküls durch Lichtabsorption. Bei entsprechender Wellenlänge werden die Elektronen der absorbierenden Spezies aus dem elektronischen Grundzustand (S_0) in einen elektronisch angeregten Zustand (S_1) angehoben. Durch eine innerhalb von Nanosekunden stattfindende Photonenemission relaxiert das Molekül zurück in den Grundzustand. Die Emissionsstrahlung ist im Vergleich zur Anregungsstrahlung zu niedrigeren Frequenzen verschoben. Dies wird als Rotverschiebung bzw. STOKES-Shift bezeichnet. Polare Lösungsmittel verstärken diesen Effekt noch weiter. Das nachfolgende JABLONSKI-Diagramm (Abbildung 2-3) stellt detailliert die Anregung und möglichen Relaxationsarten dar.

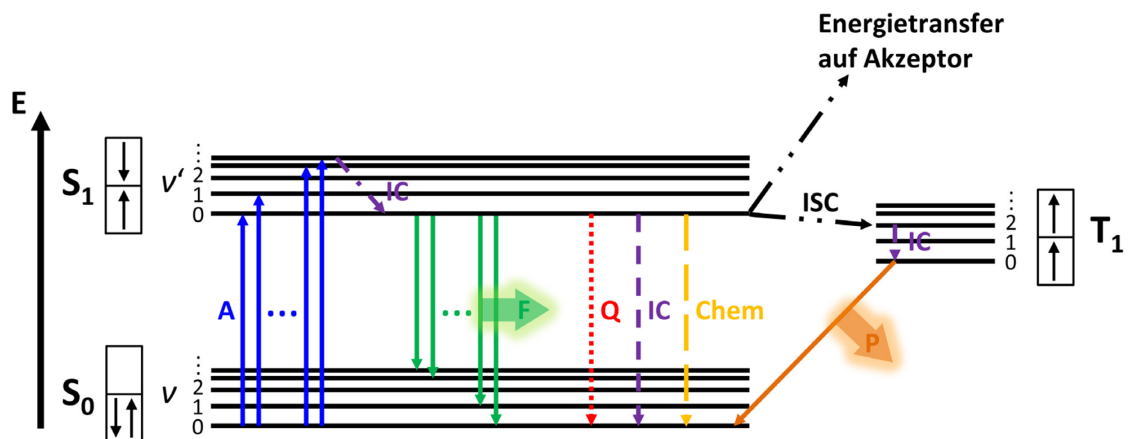


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung eines JABLONSKI-Diagramms. Darstellung eines JABLONSKI-Diagramms mit Anregungs- und möglichen Relaxations-Prozessen eines Fluorophors ausgehend vom Grundzustand. Die möglichen Relaxationsprozesse sind F: Fluoreszenz, IC: *Internal Conversion*, Q: *Quenching*, Chem: Chemische Reaktionen, ISC: *Intersystem Crossing*, P: Phosphoreszenz (modifiziert aus Literatur ^[1]).

Nach Absorption von elektromagnetischer Strahlung erfolgt ein Übergang aus dem untersten Schwingungsniveau ($v = 0$) des elektronischen Grundzustandes (S_0) in den ersten elektronisch angeregten Zustand S_1 innerhalb von einigen Femtosekunden. Durch Kollisionen mit umgebenden Lösungsmittelmolekülen (*internal conversion*) wird das Molekül in den untersten Schwingungszustand des ersten angeregten Zustandes S_1 ($v' = 0$) abgesenkt. Aus diesem Zustand erfolgen dann die im JABLONSKI-Diagramm gezeigten Relaxationsprozesse. Diese können die Emission eines Photons (F), innere Umwandlungen (IC), Nutzung der freiwerdenden Energie für chemische Reaktionen (Chem) sowie *Quenching* (Q) sein. Durch diese Relaxationsprozesse erreicht das Molekül den Grundzustand wieder. Eine andere Möglichkeit, in den Grundzustand zurück zu gelangen, ist die Phosphoreszenz (P), wobei ein Übergang des Moleküls durch *intersystem crossing* vom Singulettzustand S_1 in den Triplettzustand T_1 mit Änderung der Gesamtspinquantenzahl von $S = 0$ zu $S = 1$ stattfindet. Die Relaxation wird hierbei auch wieder durch die Emission eines Photons ausgelöst, verläuft aber im Vergleich zur Fluoreszenz wesentlich langsamer. Die Basis für die Fluoreszenzemission bildet somit der Übergang vom niedrigsten Schwingungsniveau des elektronisch angeregten Zustandes in den elektronischen Grundzustand. Als 0-0-Übergang wird der Übergang vom niedrigsten Schwingungsniveau des Grundzustandes $v = 0$ in das niedrigste Schwingungsniveau des ersten angeregten Zustandes $v' = 0$ bezeichnet. Das Be-

sondere dieses Übergangs ist, dass sowohl bei Absorption als auch bei Emission die Energiedifferenz dieselbe ist. Alle anderen Absorptionsübergänge benötigen hingegen mehr Energie als die zugehörigen Emissionsübergänge. Daraus resultiert eine Verschiebung des Spektrums zu niedrigeren Energien, die sogenannte Rotverschiebung.

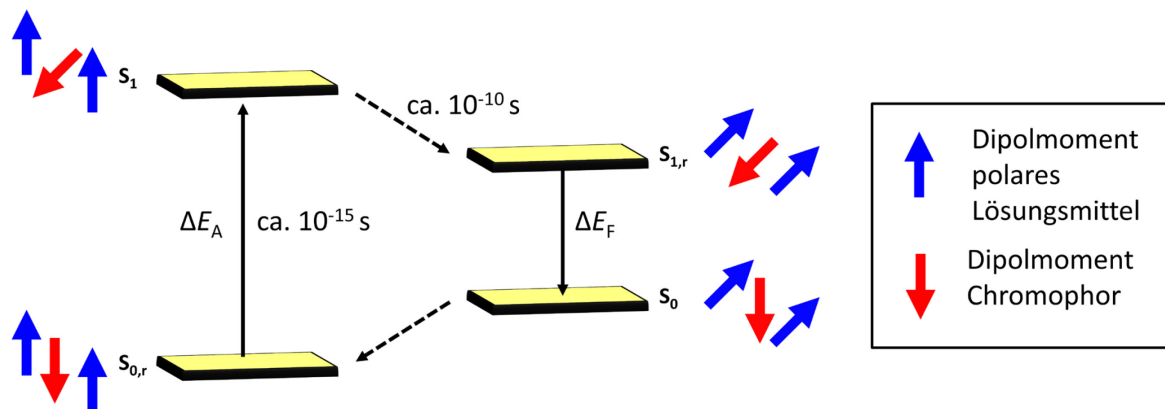


Abbildung 2-4: Rotverschiebung eines chromophoren Fluoreszenzspektrums. Schematische Erklärung der Rotverschiebung eines chromophoren Fluoreszenzspektrums aufgrund des Einflusses eines polaren Lösungsmittels, wie z.B. H_2O , mit $S_{0,r}$ und $S_{1,r}$ als relaxiertem elektronischen Grund- bzw. angeregten Zustand (modifiziert aus Literatur ^[1]).

Der Einfluss des Lösungsmittels auf die Energielage des Fluorophors hängt von dessen Polarität ab (Abbildung 2-4). Polare Lösungsmittel weisen eine antiparallele Orientierung ihrer Dipole in Bezug zu den Dipolen des Fluorophors auf. Bei Anregung des Fluorophors ändert sich sein Dipolmoment, wodurch die Lösungsmitteldipolmomente gezwungen sind, sich zum Erhalt der Gleichgewichtslage umzuorientieren. Dadurch wird der erste angeregte Zustand stabilisiert und so energetisch abgesenkt. Durch Emission eines Photons kehrt das Fluorophordipolmoment in seine Ausgangslage vor Anregung zurück, wohingegen die Lösungsmitteldipolmomente immer noch energetisch ungünstig ausgerichtet sind. Somit liegt dieser Grundzustand energetisch höher als die Ausgangsgleichgewichtslage des Grundzustandes, wodurch es auch hier zu einer Rotverschiebung des Spektrums kommt. Je polarer das verwendete Lösungsmittel ist, desto stärker ist dieser Effekt ausgeprägt und das Spektrum rotverschoben.^[1]

Fluoreszenzsonde LAURDAN

Eine sensible Sonde für die Polarität einer Fluorophorumgebung ist der Fluoreszenzfarbstoff LAURDAN. Die folgende Abbildung 2-5 zeigt die chemische Struktur dieses extrinsischen Fluorophors.

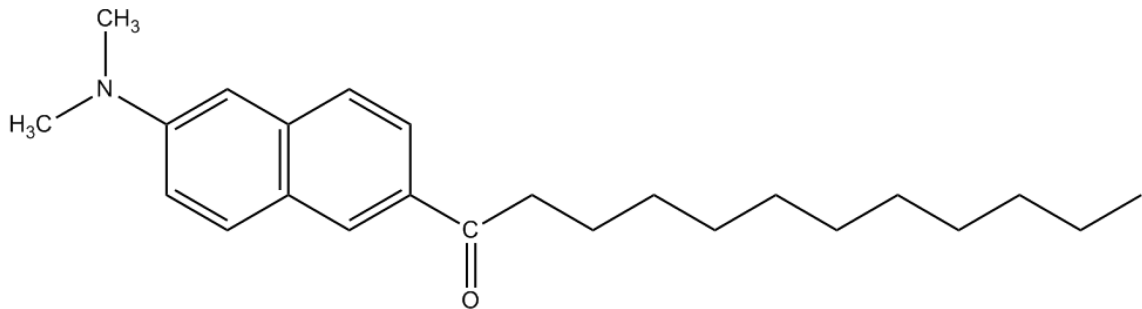


Abbildung 2-5: Molekülstruktur des verwendeten Fluorophors LAURDAN.

Aufgrund seines solvatochromen Effekts ändert sich das Absorptionsspektrum des LAURDANS je nach Anteil der umgebenden Wassermoleküle. Je größer die Lösungsmittelpolarität, desto ausgeprägter verschiebt sich das Emissionsspektrum in den Bereich des längerwelligen Lichts (20-50 nm) zusätzlich zur Rotverschiebung, die durch *internal conversion* ausgelöst wird (STOKES-Shift). Durch den Einbau des LAURDAN in eine Lipidmembran können so strukturelle Änderungen dieser detektiert werden. Das Emissionsmaximum des LAURDANS in einer in der Gelphase befindlichen Lipidmembran liegt bei 440 nm und verschiebt sich beim Übergang in die flüssig-kristalline Phase zu einer Wellenlänge von etwa 490 nm. Phasenübergänge und Änderungen des Phasenverhaltens von Lipidmodellmembranen können so unter verschiedenen Einflüssen, wie z.B. Druck und Temperatur, untersucht werden. Um geräteunabhängige und quantitative Beschreibungen des Phasenübergangs zu ermöglichen, wurde das Konzept der verallgemeinerten Polarisation (engl.: *generalized Polarisation*), *GP*, aufgestellt:^[1,31]

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R} \quad 2-10$$

Die Intensität der Fluoreszenzemission im blauen (440 nm) und die Fluoreszenzemission im roten (490 nm) Bereich des Spektrums werden als I_B und I_R bezeichnet. I_B spiegelt somit den Anteil der Lipidmembran in der Gelphase und I_R den Anteil in der fluiden Phase wider. Vorteile der Verwendung des *GP*-Wertes sind seine oben erwähnte Geräteunabhängigkeit

sowie, dass er die Rotverschiebung des Fluoreszenzspektrums über die Fluoreszenzintensitäten beschreibt, die proportional zur Fluorophorkonzentration sind.^[1]

2.6 Fluoreszenzmikroskopie

2.6.1 Probenpräparation

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der GUVs wurden an einem inversen Mikroskop (Eclipse TE 300DV Nikon, Tokio, Japan) durchgeführt. Dabei wurden die folgenden Objektive verwendet:

- Typ CFI Plan Apo Lambda 100x Oil, NA 1,45, WD 0,13 mm, Nikon, Tokio, Japan,
- Typ CFI Lu Plan ELWD 50x Air, NA 0,55, WD 10,1 mm, Nikon, Tokio, Japan,
- Typ CFI Plan APO 60x Air, NA 1.20, WD 0,22 mm, Nikon, Tokio, Japan,
- Typ CFI Superplan Fluor ELWD 40x Air, NA 0,6, WD 3,6-2,8 mm, Nikon, Tokio, Japan,
- Typ CFI Superplan Fluor ELWD 20x Air, NA 0,45, WD 8,2-6,9 mm, Nikon, Tokio, Japan.

Bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie kam ein Laser-Scanning-System (MRC 1024, Bio-Rad Laboratories) zum Einsatz, welches über einen Seiteneingang an dem oben beschriebenen Mikroskop angeschlossen war. Die Fluoreszenz der Fluorophore konnte durch die Verwendung eines Krypton-Argon-Lasers (Laser combiner L4Cc, Oxxius S.A., Lannion, Frankreich) bei 488 nm, 561 nm und 642 nm angeregt werden. Zur Bildaufnahme mit der Auflösung von $512 \cdot 512$ Pixel, und Steuerung des konfokalen Fluoreszenzmikroskops wurde das Programm LaserSharp2000 (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet. Die Detektion des Signals erfolgte mittels einer PMT (*photomultiplier tube*) mit vorgeschaltetem Emissionsbandfilter (580 nm /32 nm FWHM). Die Bildbearbeitung (Kontrasterhöhung, Hintergrundkorrekturen und Übereinanderlegen der Bilder verschiedener Kanäle) geschah mit dem Programm *ImageJ*.^[32]

Das Anregungslicht der Weitfeldmikroskopie wurde von einer Quecksilberdampflampe (Hg 100 W, Nikon, Tokio, Japan) erzeugt, über einen im Filterwürfel befindlichen dichroitischen Spiegel reflektiert und auf die Probe gelenkt. Das Emissionslicht der Probe wurde nach erneutem Passieren des dichroitischen Spiegels mittels CCD-Kamera (iXon Ultra EMCCD, Andor Technology, Belfast, UK) detektiert. Zur Steuerung der CCD-Kamera und

Bildaufnahme (512 x 512 Pixel) wurde die Software NIS-Element BR (Nikon, Tokio, Japan) eingesetzt. Die anschließende Bildbearbeitung wurde ebenfalls mit dem Programm *ImageJ*^[33,34] durchgeführt, um Hintergrundkorrekturen und Kontrastverbesserungen durchzuführen.

Die Hochdruckmessungen wurden mit Hilfe einer speziell angefertigten Hochdruckzelle auf einem eigens angefertigten xy-Mikroskopietisch, der an das inverse Mikroskop montiert wurde, durchgeführt. Der Zellkörper der Hochdruckzelle besteht aus einer Cr-Ni-Cu-Legierung mit hoher Zugfestigkeit (17-4 PH[®], Schumacher Verfahrenstechnik, Wiehl, Deutschland). Als Fenstermaterial wurden optische CVD-Diamantfenster mit einem Durchmesser von 5 mm und einer Dicke von 0,5 – 1 mm gewählt (Element Six Technologies, Berkshire, UK). Zur Verminderung des Probenvolumens (~20 µL) wurde ein 1 mm hoher PTFE-Ring (Außendurchmesser 8 mm, Innendurchmesser 3 mm) eingesetzt. Dieser wurde luftblasenfrei mit einem Deckglas (Ø = 8 mm) bedeckt und mit doppelseitigem Klebeband an dem PTFE-Ring befestigt. Dadurch wurde eine Abgrenzung der Probenlösung vom Druckmedium (Wasser) erreicht. Zur Erzeugung des hydrostatischen Drucks wurde eine Handspindelpresse (NovaSwiss[®], Illnau-Effretikon, Schweiz) verwendet und der Druck mittels Drucksensor (P3298, 0 - 4000 bar, 0,5 % Genauigkeit, tecsis, Offenbach, Deutschland) und digitaler Druckanzeige (tecsis, Offenbach, Deutschland) bestimmt. Die Regulierung der Zelltemperatur wurde mittels elektrisch beheizbarem Kupferblock vorgenommen. Eine ausführliche Beschreibung der Hochdruckzelle und der einzelnen verwendeten Komponenten kann der Dissertation von NELLI ERWIN (TU Dortmund, März 2018) entnommen werden.^[17]

Herstellung der verwendeten Lipidlösungen

Aus den in Pulverform erhaltenen jeweiligen Lipiden wurde zunächst eine Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mg mL⁻¹ in Chloroform angesetzt. Aus diesen Stammlösungen wurden dann die Lipidmischungen z.B. DOPC/DPPC/Cholesterin (1:2:1 mol%) hergestellt. Die Lipidlösungen wurden mit dem jeweiligen Fluorophor versetzt, so dass die Gesamtfluorophorkonzentration 0,1 - 0,2 mol% betrug. Bei Verwendung von zwei verschiedenen Fluorophoren wurde eine maximale Konzentration von 0,2 mol% Gesamtfluorophor in der Probe nicht überschritten.

2 Material und Methoden

2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Herstellung von homogenen und inhomogenen Dextranfilmen

Die Präparation eines dünnen Dextranfilms zur Mikroskopie wurde wie in der Literatur ^[35] beschrieben vorgenommen. Dazu wurde zuerst 10 kDa Dextran in Millipore-Wasser auf eine Konzentration von $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ verdünnt, anschließend auf ein Deckglas (22 x 22 mm) in einer Whatmann-Zelle (Warner Instruments, Hamden, USA) pipettiert und bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$ getrocknet. Nach dem Trocknen wurde 10 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) zum Rehydrieren der Glykane zugegeben, bis die Oberfläche komplett benetzt war. Nach einer Rehydratationszeit von 10 min wurden die parallel mittels PVA-gestützter Methode präparierten GUVs auf die Dextranschicht gegeben, die Whatmann-Zelle mit einem weiteren Deckglas verschlossen und für 10 min bzw. auch bis zu 24 Stunden bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Proben wurden nach Abkühlen bei Raumtemperatur (ca. $20 \text{ }^\circ\text{C}$) vermessen.

Agarosegel- und PVA-unterstützte Bildung von GUVs

Die GUVs wurden nach modifizierten Protokollen von HORGER *et al.* ^[36] und TSAI *et al.* ^[37] für die Bildung der Vesikel auf Agarose und nach einem Protokoll von WEINBERGER *et al.* ^[38] für die PVA-gestützte Präparation durchgeführt. Für beide Varianten wurden die Polymere in MilliQ-Wasser gelöst und unter Rühren auf $80 - 100 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Nach dem Lösen wurden $150 - 200 \text{ } \mu\text{L}$ der jeweiligen Polymerlösung mittels Rotationsbeschichtung bei 1800 U min^{-1} für eine 1 min auf ein Deckglas aufgetragen und anschließend 30 min bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Ofen getrocknet. Danach erfolgte die Beschichtung der Polymerlösung mit den gewählten Lipidlösungen bei 800 U min^{-1} für 1 min. Das Entfernen des restlichen Lösungsmittels wurde durch Lyophilisieren für mindestens 2 h im Vakuum vorgenommen. Als Präparationskammern dienten 4-Well-Plates (NuncTM Zellkultur-Multischalen, $1,9 \text{ m}^2$, Thermo Scientific). In diese wurden die beschichteten Coverslips mit der Lipidseite nach oben vorsichtig überführt und mit $450 - 500 \text{ } \mu\text{L}$ Puffer befüllt. Bei Bedarf wurde dem Puffer noch $5 \text{ } \mu\text{M}$ ATTO 647-Carboxy beigefügt. Die Bildung der GUVs erfolgte bei $75 \text{ }^\circ\text{C}$ für 30 – 45 min. Die so gebildeten Vesikel konnten nun für Fusions- und Hochdruckexperimente verwendet werden.

Elektroformation von GUVs

Die Herstellung von GUVs mittels Elektroformation geschah nach einem von ANGELOVA und DIMITROV 1986 beschriebenen Verfahren. ^[39] Ähnlich wie bei der GUV-Präparation

mittels Polymer-Schicht wurde auch hier ein dünner homogener Lipidfilm auf elektrisch-leitfähigen Indiumzinnoxid-beschichteten Deckgläsern (*indium tin oxide* (ITO), 22 x 22 mm, 100 Ω , West Chester USA) mittels Rotationsbeschichtung hergestellt. Dafür wurden 20 μL Lipidlösung auf das ITO-Deckglas aufgebracht und 1 min lang bei 800 U min^{-1} gespreitet. Zur vollständigen Entfernung des organischen Lösungsmittels wurden die lipidbeschichteten Deckgläser für mindestens 2 h lyophilisiert. Die Probenkammer des Typs RC-21B (Warner Instruments, Hamden, USA) mit einem Volumen von etwa 360 μL wurde von unten durch ein lipidbeschichtetes und von oben durch ein unbeschichtetes Deckglas verschlossen. Zum Anlegen eines elektrischen Feldes wurden diese vorher auf der lipidbeschichteten Seite mit selbstklebender Kupferfolie ET 11813 (3MTM, Neuss, Deutschland) versehen und anschließend die Kammer mit Vakuumpaste (Korasilon Paste M-S 2-270, Kurt Obermeier GmbH & Co. KG, Bad Berleburg-Raumland, Deutschland) abgedichtet. Das Befüllen der Probenkammer geschah durch Polyethylenschläuche PE-160 (Warner Instruments, Hamden, USA), die seitlich in dafür vorgesehene Öffnungen eingeführt werden konnten. Mittels aufgesetzter Durchfluss-Temperierzelle wurde dann die Probenkammer auf der Plattform P-2 (Warner Instruments, Hamden, USA) befestigt und anschließend mit ausgewähltem Puffer hydratisiert. Die Enden der Polyethylenschläuche wurden auch wieder mittels Vakuumpaste (Korasilon Paste M-S 2-200, Kurt Obermeier GmbH & Co. KG, Bad Berleburg-Raumland, Deutschland) abgedichtet. Über die aus der Kammer ragende Kupferfolie wurde mittels Funktionsgenerators TG315 (Thurlby Thandar Instruments, Huntingdon, Großbritannien) eine sinusförmige Wechselspannung angelegt. Die angelegte Frequenz, Spannung und Temperatur unterschied sich je nach untersuchtem Lipidsystem. Eine kurze Übersicht ist in der folgenden Tabelle 2-10 gegeben.

Tabelle 2-10: Verwendetes Elektroformationsprogramm in Abhängigkeit des Lipidsystems.

Lipidsystem	Frequenz	Spannung / Zeit	T / °C	Bezeichnung
DPPC	500 Hz	0,14 V / 5 min 1,25 V / 20 min 3,5 V / 90 min	> 50	<i>High frequency (HF)</i>
DPPC/DOPC/Cholesterin (2:1:1)	10 Hz	2 V / 2 h	> 70	<i>Low frequency (LF)</i>
DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)	500 Hz	0,14 V / 5 min 1,25 V / 20 min 3,5 V / 90 min	> 70	<i>High frequency 1 (HF1)</i>
DOPC	500 Hz	0,1 V / 10 min 1 V / 20 min 1,6 V / 150 min	RT	<i>High frequency 2 (HF2)</i>

2 Material und Methoden

2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die Temperatur wurde die gesamte Elektroformation über der Phasenübergangstemperatur des jeweiligen Lipids bzw. der jeweiligen Lipidmischung gehalten. Nach Beendigung der Elektroformation wurde die Probe langsam abgekühlt (ca. 1 °C / min) und konnte sofort zum Mikroskopieren verwendet werden. Die eingesetzten Polyethylenschläuche erlaubten eine nachträgliche Zugabe verschiedener gelöster Substanzen, um deren Einfluss auf GUVs zu untersuchen, oder einen Pufferaustausch, wie z.B. im Fall des wasserlöslichen Fluorophors ATTO 647. Dieser wurde vor der Präparation in einem 10 mM HEPES-Puffer ($c_{\text{ATTO 647}} = 5 \mu\text{M}$) gelöst in die Probenkammer injiziert und nach der Elektroformation mit reinem 10 mM HEPES-Puffer vorsichtig ausgespült, um restliches ATTO 647 zu entfernen, das nicht in den Vesikeln befindlich war. Dies ist möglich, da die gebildeten GUVs auf der ITO-Schicht adhäreren und somit nicht vom Deckglas gespült wurden. Nachteil dieser GUV-Herstellungsmethode ist, dass die Vesikel in ihrer Qualität und Größe deutliche Defizite im Vergleich zur Polymer-gestützten-Methode aufweisen.^[40,41]

Messungen von GUVs unter Hochdruck

Der Aufbau und die Funktionsweise der verwendeten Hochdruckzelle wurde in der Dissertation von NELLI ERWIN detailliert beschrieben^[17], weswegen hier lediglich die essentiellen Hintergründe zur Präparation sowie Messung und dem Verhalten der GUVs unter Hochdruck erläutert werden. Die Präparation der Vesikel wurde auf Agarose- oder PVA- Gelen durchgeführt, da die Elektroformation auf ITO-Deckgläsern einige Nachteile bezüglich der Verwendung in der Hochdruckzelle aufweist. Zum einen lösen sich die gebildeten GUVs nicht vollständig von Deckgläsern und adhäreren an der Glasoberfläche. Dadurch kommt es bei der Probenentnahme zu großen Verlusten und Zerstörungen der Vesikel. Bei der Agarose-/PVA-gestützten GUV-Präparation hingegen sind die Vesikel frei in der Lösung beweglich und können in ausreichender Konzentration erhalten werden. Ferner ist diese Präparationsvariante auch eine schnelle und vor allem mildere Methode, da das angelegte elektrische Feld die Oxidation ungesättigter Lipide begünstigt^[42] und somit einen Einfluss auf das Phasenverhalten nehmen kann.^[43]

Herstellung von GUVs in ATPS

GUVs aus dem anionischen heterogenen fünf Komponenten-*raft* System DOPC/DOPG/DPPC/DPPG/Cholesterin (20:5:45:5:25 mol%) wurden durch Mischen der 10 mg mL⁻¹

konzentrierten Stammlösungen der jeweiligen in Chloroform gelösten Lipide hergestellt. Des Weiteren wurden die beiden Fluorophore *N*-Rh-DHPE und NBD-DHPE jeweils in einer Konzentration von 0,1 mol% zugegeben. Da für die Untersuchungen Vesikel vonnöten waren, die sich frei in der Lösung bewegen können bzw. später überführt werden sollten, wurde die PVA-gestützte Präparation (s. oben) in einem PEG (8 kDa)/Dextran (10 kDa)-System gewählt. Dieses ATPS wurde durch Einwaage beider Substanzen und Lösen in einem 10 mM HBS-Puffer (pH 7,8) angesetzt. Zur Markierung der dextranreichen Phase wurden 1,5 µL des Proteins Lectin-SBA konjugiert mit ALEXA 647 zugegeben. Durch das Erwärmen auf 50 °C wurde das System durch nachträgliche Zugabe an reinem Puffer, Dextran oder PEG so eingestellt, dass es oberhalb von 50 °C einphasig vorlag. Dies ist essentiell, damit beide Polymere in die Vesikel eingebaut werden. Diese Lösung wurde dann zu den auf PVA-aufgetragenen Lipidschichten gegeben, wobei sowohl das ATPS als auch die Lipide im Vorfeld auf 70 °C vorgeheizt worden sind, um eine direkte Separation des einphasigen ATPS im Probengefäß zu verhindern.^[44] Anschließend wurden die Proben bis zu 2 Stunden inkubiert und dann zum Separieren in Eppendorf-Tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt. Nach Separation in zwei Phasen konnten die GUVs an der Phasengrenze abgenommen werden und mit der doppelten Menge an PEG-reicher Phase verdünnt werden. Durch Verdünnung wird zum einen die Hintergrundfluoreszenz des SBA-ALEXA 647 Fluorophors als auch die Zahl der Streuzentren durch Mikrokompartimente des ATPS reduziert und so die Qualität der Mikroskopieaufnahmen verbessert.

2.6.2 Messungen

Tabelle 2-11: Fluoreszenzmikroskopisch gemessene Proben bei verschiedenen Drücken und Temperaturen.

Lipidsystem	Puffer	<i>T</i> / °C	<i>p</i> / bar	Kapitel
² DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/ Cholesterin (45:5:20:5:25)	10 mM HEPES (pH 7,4)	40, 45, 50	1-1000	3.1

² Diese Messungen wurden zusammen mit M. Manisegaran und S. Bornemann durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Tabelle 2-12: Fluoreszenzmikroskopisch gemessene Proben bei Atmosphärendruck.

Lipidsystem		Puffer	T / °C	Kapitel
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)		10 mM HEPES (pH 7,4)	20	3.2.6
² DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)		11,5/8 w% PEG/Dextran/H ₂ O	20	3.2.9
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)		10 mM HEPES (pH 7,4)	25-75	3.5.5
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 10 mol% HAA	10 mM HEPES (pH 7,4)	10-60	
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 10 mol% RhaC ₁₀ C ₁₀	10 mM HEPES (pH 7,4)	10-60	
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 10 mol% Rha- RhaC ₁₀ C ₁₀	10 mM HEPES (pH 7,4)	15-60	
DPPC		10 mM HEPES (pH 7,4)	20	3.6.7
DPPC	+ 10, 50 mol% C ₁₁ Pr	10 mM HEPES (pH 7,4)	20	
DPPC/DOPC/Cholesterin (2:1:1)		10 mM HEPES (pH 7,4)	5-70	
DPPC/DOPC/Cholesterin (2:1:1)	+ 5, 10 mol% C ₁₁ Me	10 mM HEPES (pH 7,4)	5-75	
DPPC/DOPC/Cholesterin (2:1:1)	+ 5, 10 mol% C ₁₁ Pr	10 mM HEPES (pH 7,4)	5-75	
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)		10 mM HEPES (pH 7,4)	25-75	
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 1, 5, 10 mol% C ₁₁ Me	10 mM HEPES (pH 7,4)	5-70	
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 1, 5, 10 mol% C ₁₁ Pr	10 mM HEPES (pH 7,4)	5-70	
DPPC/DOPC/Cholesterin (2:1:1)	+ 10 mol% TM	10 mM HEPES (pH 7,4)	20	3.7.5
DPPC/DOPE (1:1)		10 mM HEPES (pH 7,4)	20	
DPPC/DOPE (1:1)	+ 10 mol% TM	10 mM HEPES (pH 7,4)	20	

Fortsetzung Tabelle 2-12: Fluoreszenzmikroskopisch gemessene Proben bei Atmosphärendruck.

Lipidsystem		Puffer	T / °C	Kapitel
DPPC/DOPE (1:1)	+ 10 mol% C ₁₅ Ime	10 mM HEPES (pH 7,4)	20	3.7.5
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 10 mol% TM	10 mM HEPES (pH 7,4)	20 & 65	

Tabelle 2-13: Fluoreszenzmikroskopisch gemessene Proben mit injiziertem Substrat in Pufferlösung bei Atmosphärendruck und Umgebungstemperatur (ca. 20 °C).

Lipidsystem	Zusatz	Puffer	T / °C	Kapitel
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 0,09 mg mL ⁻¹ HAA	10 mM HEPES (pH 7,4)	20	3.4.4 & 3.5.5
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 0,09 mg mL ⁻¹ RhaC ₁₀ C ₁₀	10 mM HEPES (pH 7,4)	20	
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 0,09 mg mL ⁻¹ RhaR- haC ₁₀ C ₁₀	10 mM HEPES (pH 7,4)	20	
DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 0,09 mg mL ⁻¹ RI-Mix	10 mM HEPES (pH 7,4)	20	
DOPC	+ 0,09 mg mL ⁻¹ RhaC ₁₀ C ₁₀	10 mM HEPES (pH 7,4)	20	
DOPE/DPPG (2:1)	+ 0,09 mg mL ⁻¹ RhaC ₁₀ C ₁₀	10 mM HEPES (pH 7,4)	20	

2.6.3 Methode

Lichtmikroskopie ist eine essentielle Methode, um zerstörungsfreie und nichtinvasive Untersuchungen und Vergrößerungen an Geweben und Zellen vorzunehmen. Durch die Verwendung der Lichtmikroskopie war es erst möglich, Zellen, Zellkerne und Zellorganelle sowie ihre Struktur und ihren Aufbau zu entdecken und zu erforschen. Die klassische Lichtmikroskopie ist jedoch in ihrer Auflösung und Vergrößerung durch die Wellenlänge und Beugung des eingesetzten Lichtes begrenzt.^[1] Diese wellenlängenabhängige Beschränkung kann als kritischer Abstand d nach ABBÉ bestimmt werden:

$$d = \frac{0,61 \lambda}{n \sin(\alpha)} \quad 2-11$$

mit λ = Wellenlänge des verwendeten Lichtes, n = Brechungsindex des Mediums zwischen Probe und Objektiv, und α = halber Öffnungswinkel des eingesetzten Objektivs.

2 Material und Methoden

2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Der Nenner $n \sin(\alpha)$ beschreibt die numerische Apertur (NA) mit einem maximalen Wert von 1,7. Die numerische Apertur ist eine wichtige grundlegende Eigenschaft des eingesetzten Objektivs. Um die Auflösung eines Mikroskops zu erhöhen, kann somit die Wellenlänge des eingesetzten Lichtes reduziert und der Brechungsindex des Mediums zwischen Objektiv und Probe erhöht werden. Eine Möglichkeit bietet dazu der Einsatz von Immersionsölen, die einen Brechungsindex von bis ca. 1,5 erreichen können. Meist liegt der Brechungsindex bei < 2 , woraus $d \approx \lambda/2$ folgt. Somit entspricht die maximale Auflösung in etwa der halben Wellenlänge des Lichtes. Die Verwendung von blauem Licht ($\lambda = 400 \text{ nm}$) in Kombination mit dem Auflösungsvermögen des menschlichen Auges ermöglicht somit eine tausendfache Vergrößerung.^[1]

Durch die Fokussierung des Lichtes mittels einer Linse kommt es aufgrund seiner Wellennatur zu Beugungs- und Streuungseffekten, die die Bildschärfe reduzieren. Unter Verwendung einer Punktspreizfunktion (PSF, *point-spread function*) kann die Auflösung eines Mikroskops beschrieben werden, da diese für ein punktförmiges Objekt unter idealen Bedingungen den Bereich vorgibt, in dem es nach Abbildung durch ein System auftreten kann. Die mögliche laterale und axiale Auflösung eines konventionellen Mikroskops können durch die Breite auf halber Maximalhöhe der PSF (*FWHM*, *lateral full-width half-maximum* bzw. *AFWHM*, *axial full-width half-maximum*) bestimmt werden: ^[45]

$$FWHM_{\text{konv}} = 0,51 \frac{\lambda}{NA} \quad 2-12$$

$$AFWHM_{\text{konv}} = 0,89 \frac{\lambda}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \quad 2-13$$

Die konfokale Laserscanning Mikroskopie erlaubt im Gegensatz zur konventionellen optischen Lichtmikroskopie eine Verbesserung der Auflösung und des Kontrastes, welches vor allem durch die Verwendung von zwei Lochblenden ermöglicht wird. Ein schematischer Aufbau eines konfokalen Laserscanning-Mikroskops ist in Abbildung 2-6 gezeigt. Die Lochblenden ermöglichen eine punktuelle Rasterung und Beleuchtung der Probe sowie eine Eliminierung des Lichtes, welches nicht aus der Fokusebene stammt.^[46] Die erste der beiden Lochblenden befindet sich direkt vor der Lichtquelle, um möglichst wenig Probe zu belichten und einen Lichtpunkt mittels dichroitischen Spiegel und Objektivlinse in die gewünschte Ebene der Probe zu fokussieren. Dafür sind Lichtquellen mit hohen Intensitäten, wie Laser, erforderlich, die die Fluorophorsonden in der Probe zur Fluoreszenz anregen.

Die Objektivlinse fokussiert anschließend das aus der Probe emittierte rotverschobene Fluoreszenzlicht, welches dann durch den dichroitischen Spiegel gefiltert und durch die zweite Lochblende zum Detektor geleitet wird. Streulicht aus Bereichen außerhalb des Fokus wird von dieser Lochblende eliminiert.^[1] Dies resultiert in einer verbesserten Auflösung des konfokalen Fluoreszenzmikroskops im Vergleich zu konventionellen Lichtmikroskopen und ermöglicht durch eine verbesserte axiale Auflösung die dreidimensionale Rekonstruktion der Probe durch eine Serienaufnahmen entlang der vertikalen Achse:^[45]

$$LFWHM_{\text{konf}} = 0,37 \frac{\lambda}{NA} \quad 2-14$$

$$AFWHM_{\text{konf}} = 0,64 \frac{\lambda}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \quad 2-15$$

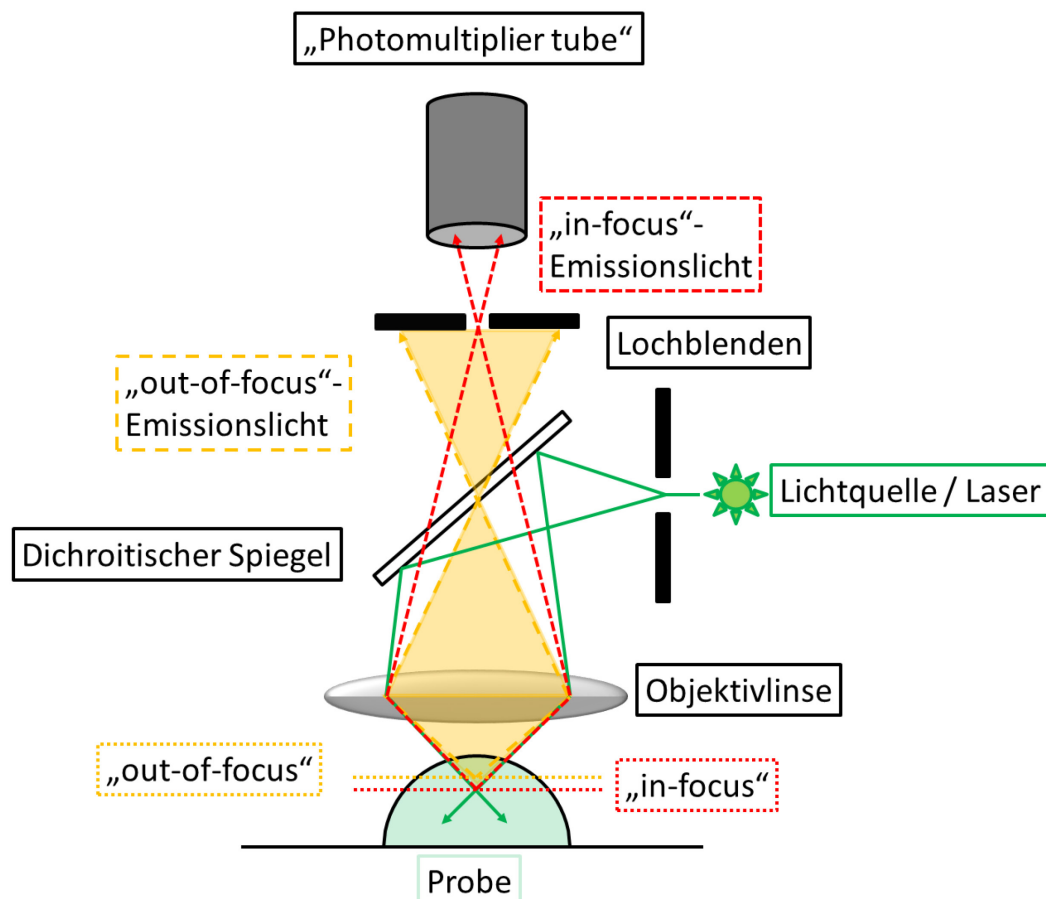


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Fluoreszenzmikroskops. Die Abbildung zeigt schematisch den Weg des Anregungslichtes von der Lichtquelle (grün) zum dichroitischen Spiegel weiter zur Objektivlinse, die es in die Probe fokussiert. Das emittierte Fluoreszenzlicht der fokussierten Probe (rot) und außerfokales Streulicht (gelb) wird durch die Objektivlinse zum Photomultiplier geleitet. Dabei wird das außerfokale Streulicht durch Lochblenden zurückgehalten.

2.7 FOURIER-Transform-Infrarot-Spektroskopie

2.7.1 Probenpräparation

Die Probenpräparation erfolgte analog zu der in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Anleitung. Dabei wurde statt Wasser D₂O in der Pufferlösung verwendet.

2.7.2 Messungen

Tabelle 2-14: FT-IR-spektroskopisch vermessene Proben.

Lipidsystem		Puffer	T-Intervall / °C	Kapitel
³ DPPC	0-15 mol% C ₁₁ IMe	10 mM HBS (pH 7,4)	25-55	3.6.3
³ DPPC	0-15 mol% C ₁₁ IPr	10 mM HBS (pH 7,4)	25-55	
DPPC/DOPC/Cholesterin (2:1:1)	+ 0-10 mol% C ₁₁ IMe	10 mM HBS (pH 7,4)	10-80	
DPPC/DOPC/Cholesterin (2:1:1)	+ 0-10 mol% C ₁₁ IPr	10 mM HBS (pH 7,4)	10-80	
⁴ DPPC/DPPG/DOPC/DOPG / Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 0-10 mol% C ₁₁ IMe	10 mM HBS (pH 7,4)	10-80	
⁴ DPPC/DPPG/DOPC/DOPG / Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 0-10 mol% C ₁₁ IPr	10 mM HBS (pH 7,4)	10-80	

2.7.3 Methode

Infrarotspektroskopie

Die Infrarotspektroskopie ist eine Schwingungsspektroskopieart, bei welcher statt Elektronenübergängen Molekülschwingungen und -rotationen angeregt werden. Über die Molekülschwingungen ist es möglich, Aussagen über die Struktur und die Dynamik der zu untersuchenden Teilchen zu treffen. Die IR-Spektroskopie arbeitet im Wellenlängenbereich von 800 – 10⁶ nm des elektromagnetischen Spektrums. Dieser Bereich kann in die Teile *Nahes Infrarot* (NIR; kurzwelliger Bereich, 800 nm – 2,5 µm), *Mittleres Infrarot* (MIR; 2,5 – 50 µm), welches die Grundschnwingungen beinhaltet, und *Fernes Infrarot* (FIR; langwelliger Bereich, 50 – 10³ µm), in welchem auch noch Gerüstschwingungen beobachtet werden können, unterteilt werden.

³ Diese Messungen wurden von S. Kriegler in seiner Bachelorarbeit „Einfluss von Imidazoliumsalzen auf Lipidmodellmembranen“ (2018) unter Anleitung von M. Herzog und S. Bornemann durchgeführt.

⁴ Diese Messungen wurden von D. Brandis in ihrer Bachelorarbeit „Untersuchung des Einflusses von imidazoliumbasierten Lipiden auf das Phasenverhalten einer Fünf-Komponenten-Modellmembran“ (2018) unter Anleitung von M. Herzog und S. Bornemann durchgeführt.

Damit Molekülschwingungen infrarot aktiv sind, ist es Voraussetzung, dass es zu einer Änderung des elektrischen Dipolmomentes oder Induktion eines Dipolmomentes während des Schwingungsvorganges kommt:

$$\frac{\partial \vec{\mu}_{el}}{\partial r} \neq 0 \quad 2-16$$

Solche Moleküle werden als IR-aktiv bezeichnet, wohingegen zweiatomige homonukleare Atome, wie z.B. N₂, die kein Dipolmoment besitzen, nicht zur Schwingung mittels IR-Strahlung angeregt werden können und somit IR-inaktiv sind. Die übliche Messgröße der IR-Spektroskopie ist nicht die Absorption, sondern die Transmission T einer Substanz. Die Transmission ist die partielle Intensität eines monochromatischen Lichtstrahls, welche die Probe passieren kann, und wird als Funktion der Wellenzahl $\tilde{\nu} = 1/\lambda$ aufgenommen. Daraus ergibt sich der Vorteil, dass eine Proportionalität der Wellenzahl von den Energieunterschieden zwischen beiden Schwingungsniveaus resultiert:

$$E_v = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} = h \cdot c \cdot \tilde{\nu} \quad 2-17$$

Zur vereinfachten Beschreibung der Bewegungsvorgänge und dem sich ergebenden Schwingungsspektrum kann der harmonische Oszillator herangezogen werden, welcher von einem zweiatomigen Molekül mit den Massen m_1 und m_2 , die sich im Gleichgewichtsabstand r_0 befinden und über eine massenlose elastische Feder verbunden sind, ausgeht. Die Feder besitzt dabei die Federkonstante k . Diese ist ein Maß für die Bindungsstärke zwischen beiden Atomen. Durch die Auslenkung r von r_0 durch z.B. Stauchung oder Streckung kommt es zur Ausbildung einer rücktreibenden Kraft $F_{rück}$, die die Atome zurück in die Gleichgewichtslage bringt (Abbildung 2-7). Die zuvor erfahrene Auslenkung $\Delta r = r - r_0$ kann durch das HOOKE'sche Gesetz beschrieben werden:

$$F_{rück} = -k \cdot \Delta r \quad 2-18$$

Ähnlich einem Pendel kommt es bei den Schwingungsvorgängen zu einer Umwandlung von potentieller und kinetischer Energie ineinander, wobei ihre Summe jederzeit konstant ist. Durch die Auslenkung aus der Gleichgewichtslage beim Schwingungsvorgang oszilliert das System um diese, wodurch die potentielle Energie E_{pot} eine Funktion des Kernabstandes ist und somit parabolisch bei Auslenkung um r_0 herum zunimmt. E_{pot} des Systems ergibt sich schließlich aus der Integration der Kraft:

$$E_{\text{pot}} = -\frac{1}{2}k \cdot \Delta r^2 \quad 2-19$$

Demnach besitzt das System die maximale E_{pot} bei maximaler Auslenkung aus der Gleichgewichtslage. Hier ist die kinetische Energie E_{kin} hingegen gleich Null und wird erst in der Gleichgewichtslage maximal, in welcher E_{pot} jedoch gleich Null wird.

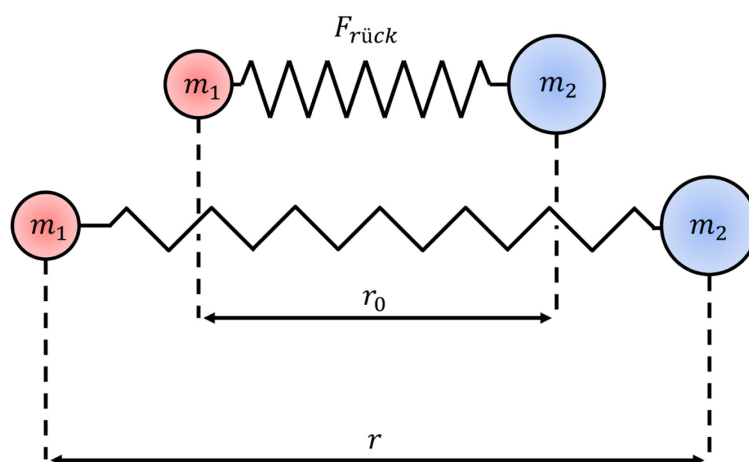


Abbildung 2-7: Molekülschwingung und -Auslenkung aus der Gleichgewichtslage. Schematische Darstellung der Auslenkung sowie Schwingung eines zweiatomigen Moleküls um die Gleichgewichtslage r_0 (Abbildung modifiziert aus Literatur ^[1]).

Die Gesamtenergie des Systems kann mittels der SCHRÖDINGER-Gleichung ermittelt werden und das Lösen dieser zeigt, dass der harmonische Oszillator nur bestimmte Energieeigenwerte annehmen kann:

$$E_v = h \cdot \nu_0 \cdot \left(v + \frac{1}{2} \right) \quad 2-20$$

Mit $v = 0, 1, 2, 3, \dots, \infty$ als mögliche Schwingungsquantenzahlen, ν_0 der Eigenfrequenz des Oszillators und μ der reduzierten Masse:

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad 2-21$$

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad 2-22$$

Somit sind die Energieniveaus der möglichen Schwingungszustände äquidistant, d.h. die Anregung auf ein höheres Energieniveau benötigt immer denselben Betrag $h\nu_0$ und es sind

nur Energieübergänge zwischen zwei benachbarten Energieniveaus erlaubt (Auswahlregel $\Delta v = \pm 1$). Die Nullpunktsenergie beträgt $E_v = 0,5 \cdot v_0 \cdot h$ und ermöglicht so auch eine Schwingung bei $v = 0$ um die Ruhelage.

Für reale Moleküle ist das System des harmonischen Oszillators allerdings nur beschränkt anwendbar, da sowohl die Kern-Kern-Abstoßung bei zunehmender Annäherung als auch in hohen Schwingungszuständen die Bindungsdissoziationen vernachlässigt werden. Gemäß dem PAULI-Prinzip wird bei großen Schwingungsamplituden das Molekül gestaucht und somit die Potenzialkurve wesentlich steiler. Die unsymmetrische Potenzialkurve um den Gleichgewichtsabstand des anharmonischen Oszillators bietet daher einen realistischen Ansatz. Weitere Unterschiede zum harmonischen Oszillator sind, dass hier nun auch die Differenzen der Energieniveaus der Schwingungszustände nicht gleich groß sein müssen und so auch Übergänge gemäß der Auswahlregel $\Delta v = \pm 1, \pm 2, \dots$ in höhere Schwingungsniveaus erlaubt sind sowie die nicht mehr ädiquisanten Energieniveaus.

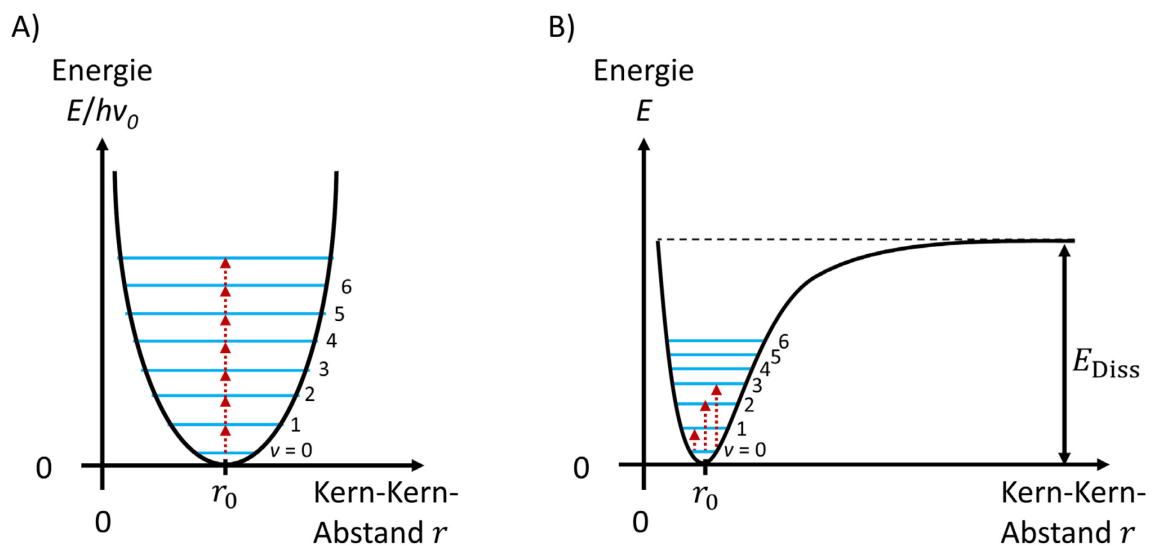


Abbildung 2-8: Potenzialkurven eines harmonischen und anharmonischen Oszillators. Schematische Abbildungen der Potenzialkurve A) des harmonischen Oszillators sowie B) des anharmonischen Oszillators (Abbildung modifiziert aus Literatur^[1]).

Die potentielle Energie wird hierbei durch das sogenannte MORSE-Potenzial angenähert. Wie in Abbildung 2-8 zu sehen ist, ist bei kleinen Schwingungszahlen die Abweichung zwischen beiden oszillatorischen Modellen noch gering, wohingegen das Potenzial des anharmonischen Oszillators bei größerer Auslenkung aus der Gleichgewichtslage abflacht

und sich einer Ordinate annähert. An dieser oberen Grenze kommt es schließlich zur Dissoziation des Moleküls. Für die möglichen Energien E_a des anharmonischen Oszillators ergeben sich:

$$E_a = h \cdot \nu_a \cdot \left(\nu + \frac{1}{2} \right) - h \cdot \nu_a \cdot x_a \cdot \left(\nu + \frac{1}{2} \right)^2 \quad 2-23$$

Die Variablen hierbei sind ν_a : hypothetische Schwingungsfrequenz des anharmonischen Oszillators um die Gleichgewichtslage, x_a : dimensionslose Anharmonizitätskonstante und $\nu = 0, 1, 2, \dots, \nu_{\max}$.

Die Schwingungsmöglichkeiten mehratomiger Moleküle sind vielzählig und hängen vom geometrischen Aufbau und der Atomzahl n des Moleküls ab. Schwingungen eines Moleküls, die aus der Überlagerung von gleichfrequenten Atomschwingungen resultieren, werden als Normalschwingungen bezeichnet. Den Atomen ist es dabei möglich, sich in die drei verschiedenen Raumrichtungen mit unterschiedlichen Amplituden zu bewegen, aber die Frequenz bzw. die Phase bleibt dieselbe. Daraus ergeben sich für ein n -atomiges Molekül $3n$ Freiheitsgrade. Hierbei entfallen drei Freiheitsgrade auf Translationsbewegungen und müssen abgezogen werden. Damit besitzt ein lineares Molekül $3n - 5$ und ein nichtlineares Molekül $3n - 6$ Normalschwingungen.

Bei Schwingungsformen wird zwischen Streck- bzw. Valenzschwingungen und Deformationsschwingungen unterschieden (Abbildung 2-9). Die Auslenkung (Schwingung) der Atome aus der Ruhelage erfolgt bei Streck- bzw. Valenzschwingungen entlang der Richtung der Bindungsachse. Daraus resultiert ein sich periodisch ändernder Bindungsabstand. Die Schwingung wird bei Verlust der Molekülsymmetrie als asymmetrische Valenzschwingung (ν_{as}) bezeichnet, bei Erhalt dieser wird von symmetrischer Valenzschwingung (ν_s) gesprochen. Bei Schwingungen mit konstantem Bindungsabstand aber sich periodisch ändernden Bindungswinkel handelt es sich um Deformationsschwingungen, δ . Hierbei wird das Dipolmoment durch die entgegengesetzte Bewegung des äußeren Atoms zum Zentralatom induziert.^[1]

Heutzutage werden IR-Spektren zumeist mit FOURIER-Transformations-IR-Spektrometern aufgenommen. Diese zeichnen sich im Vergleich zu dispersiven Spektrometern durch verschiedene Vorteile, wie z.B. kürzere Messzeiten, aus. Das zentrale Bauelement des FT-IR-

Spektrometers ist ein MICHELSON-Interferometer. Dieses ermöglicht eine simultane Absorptionsanalyse des gesamten Frequenzbereiches anstatt sequenziell nur eine einzige Wellenlänge zu vermessen.

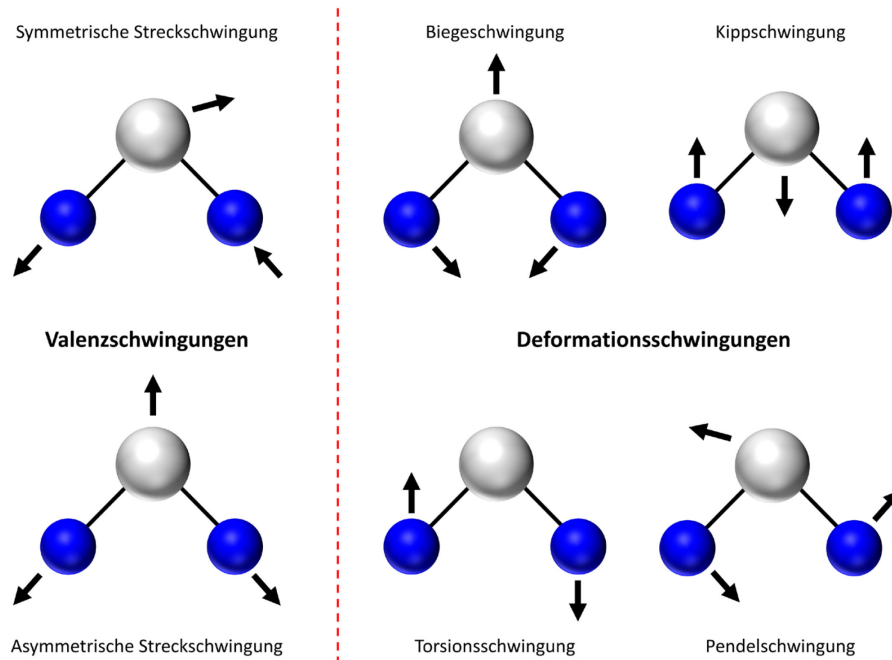


Abbildung 2-9: Schwingungsmodi aliphatischer Ketten. Schematische Darstellung typischer Normalschwingungen einer CH_2 -Gruppe. Links stehen die Valenzschwingungen, rechts die Deformationsschwingungen (Abbildung modifiziert aus Literatur ^[1]).

Abbildung 2-10 zeigt eine schematische Darstellung eines MICHELSON-Interferometers mit den wesentlichen Komponenten. Die wesentlichen Bestandteile des Interferometers sind ein halbdurchlässiger Strahlteiler sowie ein fester als auch ein beweglicher Spiegel. Der IR-Strahl wird dabei am halbdurchlässigen Strahlteiler im rechten Winkel aufgespalten und zum beweglichen und festen Spiegel gelenkt. Dort werden die Strahlen reflektiert und interferieren am Strahlteiler konstruktiv oder destruktiv. Ob eine konstruktive oder destruktive Interferenz vorliegt, hängt entscheidend von der optischen Wegdifferenz x ab. Bei identischem Abstand beider Spiegel ($x = 0$, *zero path difference*, ZPD) kommt es zu konstruktiver Interferenz und einem das Interferometer verlassenden Strahl maximaler Intensität. Dementsprechend besitzt ein Strahl basierend auf Teilstrahlen, die nicht in Phase sind ($x \neq n \cdot \lambda/2$), eine wesentlich geringere Intensität, wohingegen bei destruktiver Interferenz die Intensität auf null abgesenkt wird. Außerhalb des Interferometers trifft der interferierte Strahl dann in der Probenkammer auf die Probe und wird auf den Detektor weitergelenkt. Das Interferogramm $I(x)$ wird aus der Messung der Intensität als Funktion der optischen

Weglängendifferenz erhalten und kann mittels FOURIER-Transformation in ein Absorptionsspektrum als Funktion der Wellenzahl $\tilde{\nu}$ umgerechnet werden.

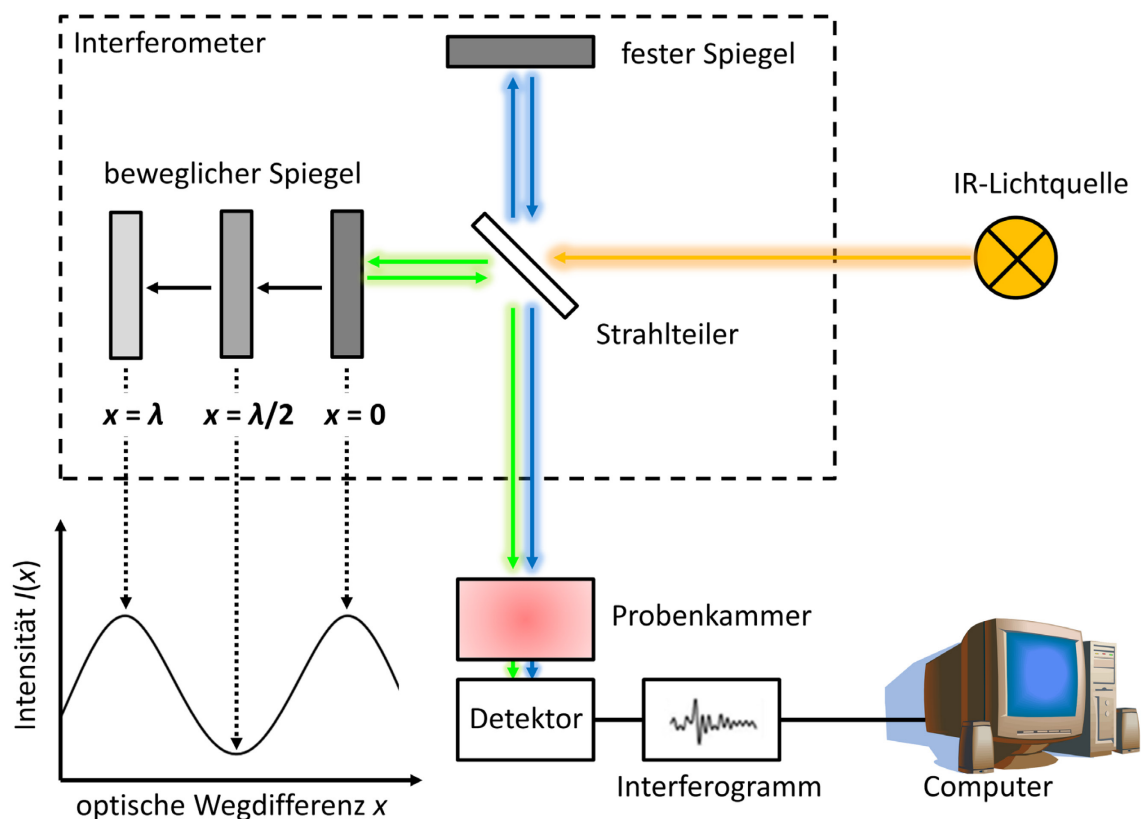


Abbildung 2-10: Schematische Darstellung eines FT-IR-Spektrometers. Schematische Wiedergabe der Funktionsweise eines FT-IR-Spektrometers mit einem MICHELSON-Interferometer (Abbildung modifiziert aus Literatur^[1]).

Mittels FT-IR-Spektroskopie ist es möglich, die Struktur und das Phasenverhalten von Phospholipiden qualitativ und teilweise sogar auch quantitativ zu untersuchen. Dabei können sowohl die hydrophoben Alkylketten als auch die hydrophilen Kopfgruppen zur Analyse herangezogen werden, da beide Bereiche IR-aktive Gruppen besitzen. Zur Betrachtung temperatur- oder druckinduzierter Phasenübergänge von Lipiden sind die symmetrische ($\nu_s(\text{CH}_2)$; ca. 2850 cm^{-1}) sowie asymmetrische ($\nu_{as}(\text{CH}_2)$; ca. 2920 cm^{-1}) Streckschwingung der aliphatischen Kohlenwasserstoffketten besonders relevant.^[1] Beim Übergang von der Gel- zur fluiden Phase kommt es zu einer Konformationsänderung der aliphatischen Ketten von der *all-trans* in die *gauche*-Konformation. Dabei verschieben sich die Bandenmaxima um etwa $2,5 \text{ cm}^{-1}$ zu höheren Wellenzahlen.^[1] Des Weiteren liegt bei etwa 2956 sowie 2837 cm^{-1} die symmetrische und asymmetrische CH_3 -Valenzschwingung. Auskunft über

die Hydratation der Kopfgruppenregion kann die Bande der Estercarbonylgruppe ($\nu(\text{C}=\text{O})$) bei etwa 1740 cm^{-1} , welche sich in zwei Banden auflösen lässt, liefern. Die Bande bei 1742 cm^{-1} kann dabei einer nicht hydratisierten Kopfgruppe und die Bande bei 1727 cm^{-1} einer hydratisierten Kopfgruppe zugeordnet werden, wodurch sich das Hydratationsverhältnis an der Grenzschicht bestimmen lässt.^[1,47]

2.8 AFM

2.8.1 Probenpräparation

Zur Untersuchung von Lipidmembranen mittels AFM wurden verschiedene Stammlösungen der einzelnen Lipide mit einer Konzentration von 10 mg mL^{-1} in Chloroform vorbereitet und dann in den jeweiligen Mischungsverhältnissen der gewünschten Membranzusammensetzungen in einem Eppendorf-Tube zusammen pipettiert. Das Chloroform wurde anschließend unter einem Stickstoffstrom entfernt, sodass ein dünner Lipidfilm an der Wandung des Eppendorf-Tubes entstand. Das restliche Chloroform wurde durch 2 - 3 stündiges Lyophilisieren entfernt. Danach wurde der Lipidfilm in einem Puffer aus 20 mM TRIS und 5 mM MgCl_2 (pH von 7,4) rehydriert, sodass die Konzentration der Lipide $1,94\text{ mg mL}^{-1}$ betrug. Vor Verwendung des Puffers wurde dieser zur Reinigung durch einen Millipore-Filter mit einer Porengröße von 20 nm filtriert. Die Lipid-Puffer-Lösung wurde anschließend mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers durchmischt und 15 min auf eine Temperatur oberhalb des Phasenüberganges der Lipide erhitzt. Anschließend folgten 10 min Ultraschallbehandlung bei derselben Temperatur und direktes Einfrieren in flüssigem Stickstoff für 2 min. Danach wurden die Lipide wieder für 10 min auf die Temperatur oberhalb des Phasenüberganges erhitzt. Dieser Zyklus des Einfrierens und Auftauens wurde insgesamt fünfmal durchgeführt. Abschließend wurden die Lipide nochmals 5 min mit Ultraschall behandelt. Um eine homogene Größenverteilung zu erreichen, wurden die Lipide bei $80\text{ }^\circ\text{C}$ durch eine Polycarbonat-Membran (Nucleopore[®] Polycarbonate Track-Etch[™], Whatman GmbH, Deutschland) mit einer Porengröße von 100 nm 21 Mal extrudiert. $30\text{ }\mu\text{L}$ der Lipidlösung wurden mit $40\text{ }\mu\text{L}$ Pufferlösung auf eine Mica-Platte gegeben und für 2 Stunden bei $80\text{ }^\circ\text{C}$ in feuchter Umgebung eines luftdicht verschlossenen Gefäßes zur Vesikelfusion inkubiert. Nach Abkühlen der Probe auf Raumtemperatur wurde sie zum Entfernen nicht fusionierter Vesikel vorsichtig mit Puffer gewaschen. Alle Messungen fanden im *tapping*-Modus statt.

2.8.1 Messungen

Tabelle 2-15: Mit AFM gemessene Proben bei Umgebungstemperatur (ca. 20 °C).

Lipidsystem	Externer Zusatz	Puffer	Kapitel
DOPC/DPPC/Cholesterin (1:2:1)	-	20 mM TRIS + 5 mM MgCl ₂ (pH 7,4)	3.6.8
DOPC/DPPC/Cholesterin/ C ₁₁ Ime (5:8:5:2)	-	20 mM TRIS + 5 mM MgCl ₂ (pH 7,4)	
DOPC/DPPC/Cholesterin/ C ₁₁ IPr (5:8:5:2)	-	20 mM TRIS + 5 mM MgCl ₂ (pH 7,4)	
DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/ Cholesterin (45:5:20:5:25)	-	20 mM TRIS + 5 mM MgCl ₂ (pH 7,4)	
DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/ Cholesterin/C ₁₁ Ime (35:5:20:5:25:10)	-	20 mM TRIS + 5 mM MgCl ₂ (pH 7,4)	
DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/ Cholesterin/C ₁₁ IPr (35:5:20:5:25:10)	-	20 mM TRIS + 5 mM MgCl ₂ (pH 7,4)	
DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/ Cholesterin/TM (35:5:20:5:25:10)	-	20 mM TRIS + 5 mM MgCl ₂ (pH 7,4)	3.7.4
DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/ Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 0,09 mg mL ⁻¹ HAA	20 mM TRIS + 5 mM MgCl ₂ (pH 7,4)	(3.4.3)
DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/ Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 0,09 mg mL ⁻¹ RhaC ₁₀ C ₁₀	20 mM TRIS + 5 mM MgCl ₂ (pH 7,4)	
DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/ Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 0,09 mg mL ⁻¹ RhaRhaC ₁₀ C ₁₀	20 mM TRIS + 5 mM MgCl ₂ (pH 7,4)	
DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/ Cholesterin (45:5:20:5:25)	+ 0,09 mg mL ⁻¹ RI-Mix	20 mM TRIS + 5 mM MgCl ₂ (pH 7,4)	
DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/ Cholesterin/HAA (40,5:4,5:18:4,5:22,5:10)	-	20 mM TRIS + 5 mM MgCl ₂ (pH 7,4)	3.5.4
DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/ Cholesterin/RhaC ₁₀ C ₁₀ (40,5:4,5:18:4,5:22,5:10)	-	20 mM TRIS + 5 mM MgCl ₂ (pH 7,4)	
DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/ Cholesterin/RhaRhaC ₁₀ C ₁₀ (40,5:4,5:18:4,5:22,5:10)	-	20 mM TRIS + 5 mM MgCl ₂ (pH 7,4)	

2.8.2 Methode

Die Rastersondenmikroskopie, zu der unter anderem die *Atomic Force Microscopy* (AFM) gehört, erlaubt eine direkte Abbildung von atomaren Dimensionen. Eine sehr feine Spitze fungiert dabei als zentrales Bauelement. Diese Spitze befindet sich in einem sehr geringen Abstand zur Probenoberfläche d . Durch piezoelektrische Bauteile kann dieser Abstand mit

einer Genauigkeit von 0,001 nm in der z -Richtung und mit 0,01 nm in der horizontalen Ebene, d.h. x - und y -Richtung, justiert werden. Somit ist ein rasterförmiges Abtasten der Oberfläche möglich. Durch eine weitere Spitze an der Tunnelspitze, die mittels Federkraft auf die Probe gedrückt wird, wird der unmittelbare Kontakt mit der Probenoberfläche hergestellt und nach Abrastern dieser ein Oberflächenprofil erhalten.

Heutzutage werden statt einer aufgesetzten Spitze optische Methoden verwendet, um eine Oberflächentopographie zu erhalten. Bei den optischen Methoden sendet ein Laser einen Lichtstrahl aus, der von einer mikroskopischen Blattfeder an der Spitze reflektiert und von einer viergeteilten Diode detektiert wird. Durch eine Bewegung der Feder und Spitze verändert sich der Reflexionswinkel α , was in einer veränderten Detektion an der Diode resultiert. Das Messsignal an den Dioden stellt dabei eine Differenz des Stromwertes der vier Dioden dar und kann direkt in eine Höheninformation umgerechnet werden. Diese Art der Höhendetektion wird als Modus mit konstanter z -Position bezeichnet. Bei einem anderen Modus, dem Modus der konstanten Kraft, wird die Federbiegung durch Rückkopplungsmechanismen des z -Piezo nachgeregelt und bleibt konstant. Das Steuersignal des z -Piezo kann anschließend in die Topographie-Information der Probenoberfläche umgerechnet werden. Dazu müssen die Proben weder mit einem leitfähigen Material bedampft noch einem Vakuum ausgesetzt werden und können somit unverfälscht und direkt gemessen werden.^[1]

Je nach Abstand zwischen Spitze und Probenoberfläche treten beim Abrastern sowohl attraktive VAN DER WAALS- als auch repulsive elektrostatische Wechselwirkungen auf. Näherungsweise können die auftretenden Wechselwirkungen daher durch ein LENNARD-JONES-Potenzial beschrieben werden. Nähert sich die Spitze der Probenoberfläche an, überwiegen die attraktiven VAN DER WAALS-Wechselwirkungen. Sobald der Gleichgewichtsabstand r_0 durchlaufen wurde, kommt es jedoch aufgrund repulsiver Wechselwirkungen sowie des PAULI-Verbots zu abstoßenden Interaktionen (Abbildung 2-11). Diese Eigenschaft macht sich ein im Kontaktmodus arbeitendes AFM zu Nutze. Dabei drückt es mit Kräften in der Größenordnung von pN bis nN auf die Oberfläche der Probe, wobei die atomare Auflösung durch die starke Abstandsabhängigkeit der repulsiven Kräfte erhalten bleibt. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch die relativ große Reichweite der VAN DER WAALS-Kräfte. Somit liegen neben den repulsiven auch immer anziehende Wechselwirkungen vor. Dies resultiert in einer Abnahme der maximalen Auflösung. Diese liegt jedoch immer noch im Bereich weniger ÅNGSTRÖM.

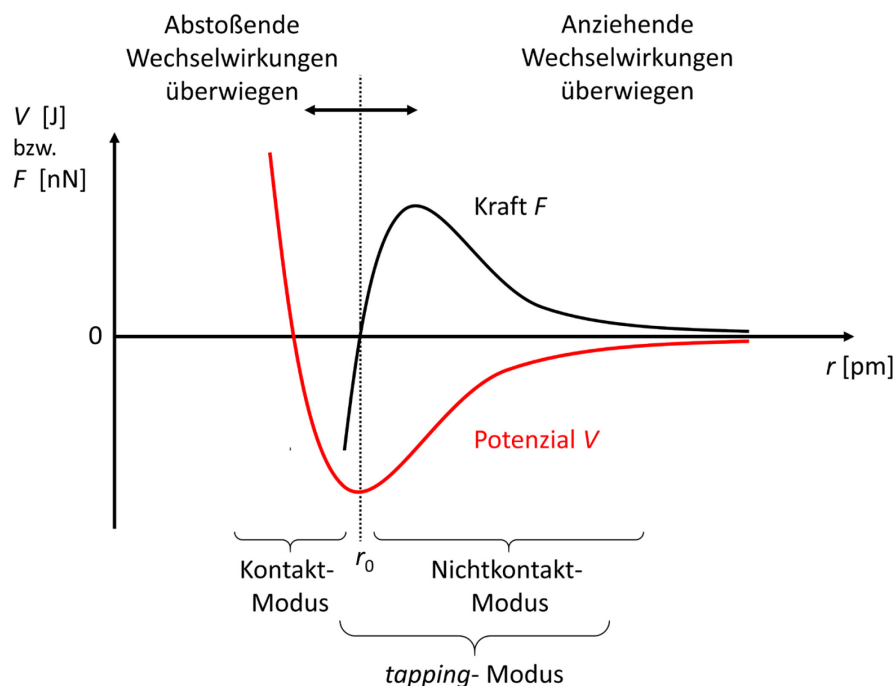


Abbildung 2-11: Kraft und LENNARD-JONES-Potenzials zwischen AFM-Spitze und Probe. Schematische Darstellung der Kraft $F(r)$ sowie des entsprechenden LENNARD-JONES-Potenzials $V(r)$ zwischen Spitze des AFM-Spitze und Probenoberfläche (Abbildung modifiziert aus Literatur ^[1]).

Durch Verwendung des Nichtkontakt-AFM sowie *tapping mode*-AFM (*tapping mode*: Markenzeichen der Firma Bruker AXS Inc., Madison, USA) ^[1] kann dieser Nachteil umgangen werden (Abbildung 2-12). Die Spitze berührt dabei nicht oder beim *tapping mode*-AFM nur kurzzeitig die Probenoberfläche. Gemessen wird hierbei die Schwingungsamplitude der AFM-Spitze, die mit einer eigenen Resonanzfrequenz ν_0 schwingt. Bei Annäherung der schwingenden AFM-Spitze an die Probenoberfläche kommt es zu einer Überlagerung des Spitzenpotenzials und des VAN DER WAALS-Potenzials. Dadurch nimmt die Resonanzfrequenz $\Delta\nu = \nu - \nu_0$ und die Schwingungsamplitude bei ν_0 ab. Durch die Schwingungsamplitude ist es somit möglich, den Abstand zwischen Spitze und Oberfläche der Probe zu bestimmen. Auch hier wird wieder die Amplitude mit einem viergeteilten Photodetektor gemessen, was eine dreidimensionale Darstellung des Oberflächenprofils sogar von weichen Proben erlaubt. Die laterale Auflösung ist im Vergleich zum Kontakt-AFM jedoch durch den größeren Abstand zwischen Probe und Spitze sowie der dazwischen befindlichen Luft etwas geringer, kann jedoch durch die Verwendung eines Vakuums bis zu einem Bereich von 10^{-9} m reduziert werden.^[1]

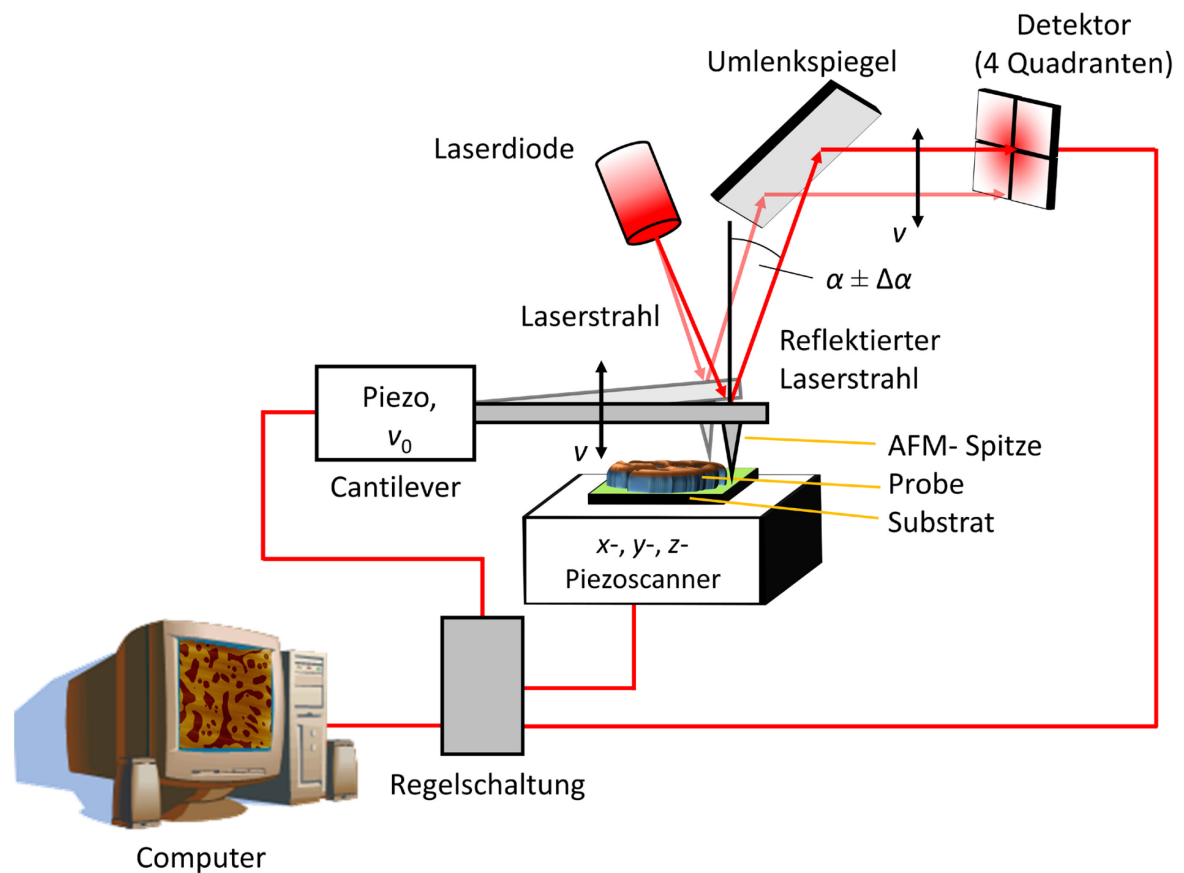


Abbildung 2-12: Darstellung eines Nichtkontakt-AFM. Schematische Darstellung eines Nichtkontakt-AFM mit den essentiellen Bestandteilen (Abbildung modifiziert aus Literatur^[1]).

Die Funktionsweise des *tapping*- oder auch *intermitted contact*-Modus ist ähnlich wie die des Nichtkontakt-AFM. Die in Schwingung versetzte Probenspitze berührt jedoch bei diesen beiden Modi einmal pro Schwingung die Probenoberfläche. Dies erlaubt neben der Topographie auch Informationen über weitere Eigenschaften, wie Elastizität und Zusammensetzung, zu erhalten. Die Auflösung ist auch durch den geringeren Abstand zwischen Spitze und Probe etwas höher und im Vergleich zum Kontakt-AFM können Scherkräfte, die zu Schäden der Probe oder Spitze führen können, vermieden werden.^[1]

2.9 DLS

2.9.1 Probenpräparation

Mittels der dynamischen Lichtstreuung (DLS) war es möglich, nebst der Partikelgrößenbestimmung, auch das Zeta-Potenzial der Vesikel zu ermitteln. Dazu wurden Vesikel unterschiedlicher Kompositionen hergestellt (s. 2.9.2). Die Gesamtlipidkonzentration betrug 10 mM und die Vesikel wurden, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, hergestellt. Anschließend konnte die Größenbestimmung durchgeführt werden. Für die Bestimmung des Zeta-Potenzials wurden die Vesikel nach ihrer Präparation noch 21-mal durch eine Polycarbonat-Membran (Nucleopore® Polycarbonate Track-Etch™, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) mit einer Porengröße von 100 nm extrudiert. Dadurch wurde eine homogene Größenverteilung sowie Unilamellarität sichergestellt. Zur Größenbestimmungs- sowie Zeta-Potenzial-Messung wurde ein ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) mit Kapillarzellen DTS 1070 (Malvern Instruments, Malvern, UK) bei 20 °C (Umgebungstemperatur) verwendet. Jede dargestellte Probe wurde dreimal in Folge mit mindestens 15 Scans vermessen und von jedem beschriebenen System wurden ebenfalls mindestens drei unabhängig voneinander präparierte Proben gemessen, ausgewertet und gemittelt.

2.9.2 Messungen

Tabelle 2-16: Durchgeführte Zeta-Potenzial Messungen.

Lipidsystem		Puffer	T / °C	Kapitel
⁵ DPPC		HBS (pH 7,4)	20	3.6.6
⁵ DPPC	+ 10 mol% C ₁₁ IMe	HBS (pH 7,4)	20	
⁵ DPPC	+ 10 mol% C ₁₁ IPr	HBS (pH 7,4)	20	
⁶ DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/ Cholesterin		HBS (pH 7,4)	20	
⁶ DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/ Cholesterin	+ 10 mol% C ₁₁ IMe	HBS (pH 7,4)	20	
⁵ DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/ Cholesterin	+ 10 mol% C ₁₁ IPr	HBS (pH 7,4)	20	

⁵ Diese Messungen wurden von S. Kriegler in seiner Bachelorarbeit „Einfluss von Imidazoliumsalzen auf Lipidmodellmembranen“ (2018) unter Anleitung von M. Herzog und S. Bornemann durchgeführt.

⁶ Diese Messungen wurden von D. Brandis in ihrer Bachelorarbeit „Untersuchung des Einflusses von imidazolium-basierten Lipiden auf das Phasenverhalten einer Fünf-Komponenten-Modellmembran“ (2018) unter Anleitung von M. Herzog und S. Bornemann durchgeführt.

2.9.3 Methode

Experimente, die auf der Streuung von Licht basieren, werden allgemein in inelastische, quasielastische (dynamische) sowie elastische (statische) Streuexperimente unterteilt. Entscheidend für die Einteilung ist dabei der Austausch von Energie zwischen dem einstrahlten Licht und der Materie.

Die DLS gehört zu den Streutechniken, die temporäre Fluktuationen des gestreuten Lichtes in Lösungen von Partikeln misst. Dabei kann die DLS Informationen über die Dynamik der gelösten Partikel, wozu Translations-, Rotations- und intramolekulare Bewegungen zählen, aufgrund ihrer BROWN'schen Molekularbewegung liefern.^[1] Diese Bewegungen hängen eng von der Form und Größe der Biomoleküle ab, wodurch eine indirekte Bestimmung struktureller Eigenschaften möglich wird. Eine wichtige Größe bei der Interpretation von DLS-Daten ist der Streuvektorbetrag Q_S :

$$Q_S = n \left(\frac{4\pi}{\lambda} \right) \sin \theta \quad 2-24$$

mit n = Brechungsindex, λ = Wellenlänge und θ = halber Streuwinkel. Bei großen Abständen in der Probe werden die Q -Werte klein und aus dem DLS-Signal können Informationen über Translationsbewegungen der Moleküle gewonnen werden. Bei kleinen Abständen hingegen, werden Fluktuationen in der Größenordnung der Makromoleküle aufgezeichnet und dem DLS-Signal können ebenfalls Informationen über Molekülrotationen und intramolekulare Bewegungen entnommen werden.^[1]

Für die DLS wird normalerweise eine monochromatische kohärente Lichtquelle, wie z.B. ein Laser, verwendet. Dabei passiert das Licht einen Polarisator, bevor es auf die Probe trifft, von der ein Teil in einem Winkel von 2θ gestreut und durch einen weiteren Polarisator auf einen Photomultiplier-Detektor gelenkt wird. Ein schematischer Aufbau einer DLS ist in Abbildung 2-13 dargestellt. Der Detektor registriert nun die Zahl der im Winkel von 2θ gestreuten Photonen pro Zeitintervall, wodurch sich ein von den relativen Positionen der Streuzentren im Streuvolumen bestimmtes Interferenzmuster ergibt.^[1] Die Zahl der detektierten Photonen fluktuiert jedoch mit der Zeit. Dies resultiert aus Veränderungen des Interferenzmusters Photonemittierender Streuzentren. Licht, das auf gelöste Teilchen trifft, wobei $\lambda \gg d$ gilt, wird in alle Richtungen elastisch gestreut. Dies wird als RAYLEIGH-Streuung bezeichnet.

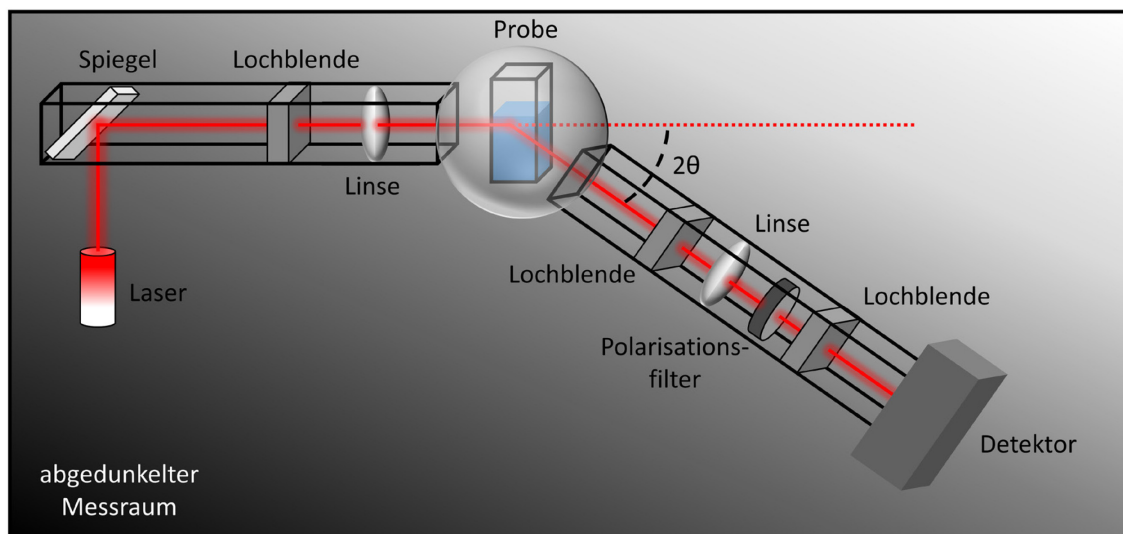


Abbildung 2-13: Schema einer DLS-Messapparatur (Abbildung modifiziert aus Literatur^[1]).

Der einfallende Strahl wechselwirkt mit den elektrischen Feldern der Teilchen und induziert so oszillierende Dipole in der Elektronenwolke und die Teilchen emittieren sekundäre elektromagnetische Wellen als Streulicht, welche je nach Winkel miteinander konstruktiv oder destruktiv interagieren können. Durch die BROWN'sche Molekularbewegung verändern sich die Abstände zwischen den streuenden Teilchen und somit verändert sich ebenfalls zeitlich das Interferenzmuster. Die Intensitätskorrelationsfunktion $C(\tau)$ des Streulichtes ermöglicht die Bestimmung von Informationen über verschiedene Bewegungsmoden sowie die Translation der makromolekularen Teilchen. Dazu wird die Photonenintensität des Streulichts zum Zeitpunkt t_i mit der Photonenintensität nach einer Korrelationszeit τ , $t_i + \tau$ multipliziert. Für n aufeinanderfolgende Streulichtsignale bei gleicher Korrelationszeit wird diese Multiplikation wiederholt, die Ergebnisse summiert und auf n normiert.^[1,48]

$$C(\tau) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I_s(t_i) \cdot I_s(t_i + \tau) \quad 2-25$$

Bei einer Korrelationszeit von 0 entspricht die Korrelationsfunktion der mittleren quadratischen Streuintensität $\langle I_s^2 \rangle$ und somit dem Maximum von $C(\tau)$. Bei hohen Korrelationszeiten werden die miteinander multiplizierten Photonenintensitäten immer unkorrelierter. Das heißt, sie werden immer verschiedener und die Korrelationsfunktion gibt das Quadrat der mittleren Intensität $\langle I_s \rangle^2$ an. Fluktuiert die Intensität nicht-periodisch, $I_s(t_i)$, kommt es zu einem monotonen Abfall von $C(\tau)$ von $\langle I_s^2 \rangle$ auf $\langle I_s \rangle^2$. Dies wird durch die SIEGERT-Gleichung ausgedrückt.^[1,48]

$$\frac{C(\tau)}{\langle I_s \rangle^2} = 1 + A |g_1(\tau)|^2 \quad 2-26$$

A stellt hierbei eine Konstante dar und für $g_1(\tau)$ kann in verdünnten, monodispersen Lösungen wie folgt betrachtet werden:^[1,48]

$$g_1(\tau) = e^{-DQ^2\tau} \quad 2-27$$

D entspricht dem Translationsdiffusionskoeffizienten des betrachteten Teilchens. Mit diesem kann über die STOKES-EINSTEIN-Beziehung der hydrodynamische Radius R_h eines sphärischen Makromoleküls ermittelt werden:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad 2-28$$

mit k_B = BOLTZMANN-Konstante, T = Temperatur und η = Viskosität.^[1,16,48] Mittels DLS können nicht nur die Partikelgröße und die Bewegungsmodi der Teilchen ermittelt werden, auch eine Bestimmung des Zeta (ζ)-Potenzials ist möglich. Dieses entspricht im Wesentlichen der „Nettoladung“ bzw. dem Oberflächenpotenzial des Teilchens in Relation zum umgebenden Lösungsmittel. An ein elektrisch geladenes Teilchen mit einem Oberflächenpotenzial Ψ_0 adsorbieren Ionen gegensätzlicher Ladung oder Dipole aus der Umgebung oberflächlich. Dadurch bildet sich eine relativ fest mit dem Teilchen verbundene elektrische Doppelschicht, die sogenannte STERN-Schicht, aus. Diese Schicht ist von einer beweglichen und diffusen Schicht, der GOUY-CHAPMAN-Schicht, umgeben, welche wiederum von dem elektrisch neutralen Lösungsmittelmedium umhüllt ist (Abbildung 2-14). Bei der Bewegung eines Teilchens im elektrischen Feld wird durch Reibungskräfte ein Teil der beweglichen, diffusen Schicht abgestreift und die Scherschicht bildet sich aus, deren elektrisches Potenzial als ζ -Potential bezeichnet wird. Eine ungefähre Bestimmung dieses Potenzials großer Teilchen, deren Radius wesentlich größer ist als die elektrische Doppelschichtdicke, kann über die Wanderungsgeschwindigkeit v im elektrischen Feld nach HELMHOLTZ-SMOLUCHOWSKI bestimmt werden, da neben der Reibungskraft weitere die Ionenwanderungsgeschwindigkeit verlangsamende Prozesse außer Acht gelassen werden:^[1]

$$\zeta = \frac{\eta v}{\varepsilon E} \quad 2-29$$

mit $\varepsilon = \varepsilon_r \cdot \varepsilon_0$ (Dielektrizitätskonstante), η = Viskositätskoeffizient des Lösungsmittels und E = elektrische Feldstärke. Eine Bestimmung der Teilchengeschwindigkeit wird in der DLS mittels eines Laser-Doppler-Messverfahrens vorgenommen. Dabei passieren die geladenen Teilchen einen Laserstrahl und streuen (wie zuvor beschrieben) Licht. Dieses gestreute Licht wird durch den Dopplereffekt in seiner Frequenz verschoben, was stark von der Teilchengeschwindigkeit und somit auch von der Ladung abhängt. Die gemessene Frequenzverschiebung des Lichtes ermöglicht nun die Geschwindigkeit und daraus die elektrophoretische Beweglichkeit zu bestimmen.

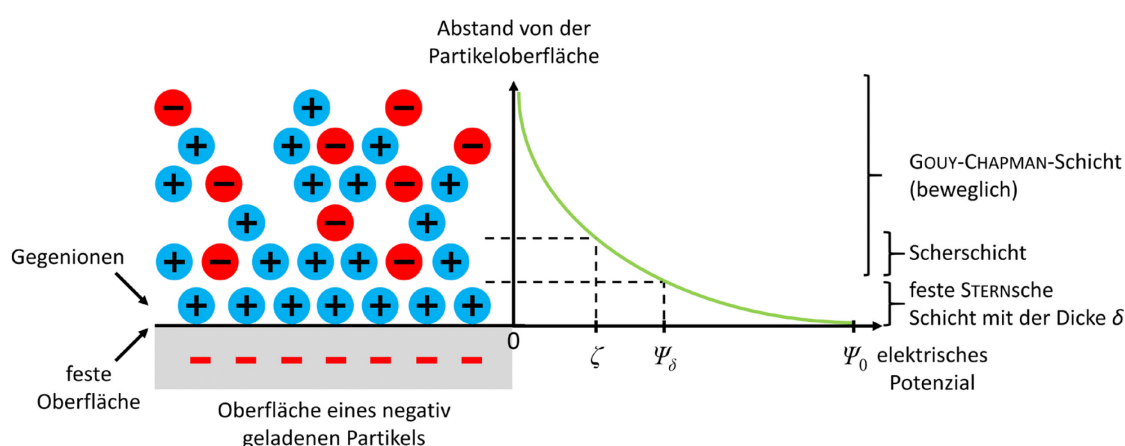


Abbildung 2-14: Schematische Darstellung des ζ -Potentials eines negativ geladenen Teilchens (Abbildung modifiziert aus Literatur ^[1]).

2.10 Kritische Mizellkonzentration

2.10.1 Probenpräparation

Zur Bestimmung der kritischen Mizellkonzentration (CMC) wurde eine 0,1 mM sowie eine 0,01 mM Stammlösung des C₁₁IPr in Chloroform gelöst hergestellt. Während der Messung wurde die Probe stets in Eislösung gelagert, um eine Konzentrationsveränderung durch Verdampfen des Chloroforms zu vermeiden. Der Oberflächendruck wurde insgesamt für vier unabhängige Probenansätze auf bidestilliertem Wasser mit einem Oberflächendrucksensor Typ PS4 (NIMA Technology Ltd., England) bestimmt. Die Messungen und Auswertungen wurden analog zu den Referenzen ^[49,50] vorgenommen, um eine Vergleichbarkeit gewährleisten zu können.

2.10.2 Messungen

Tabelle 2-17: Durchgeführte CMC-Messungen.

Lipidsystem	Medium	Temperatur [°C]	Kapitel
C ₁₁ IPr	Bidest. H ₂ O	20	3.6.2

2.10.3 Methode

Die CMC wurde in dieser Arbeit mittels der Filmwaagenmessung eines monomolekularen Lipidfilms bestimmt. Bei dieser Art von Messung steht vor allem das Kompressionsverhalten amphiphiler sowie oberflächenaktiver Moleküle im Vordergrund. Eine monomolekulare Schicht kann als quasi-zweidimensionales Schichtsystem bestehend aus einer Moleküllage betrachtet werden. Eine wichtige Voraussetzung für diese Art der Messungen ist die Schwerlöslichkeit der filmbildenden Komponente im Substrat, welches meist Wasser ist.^[1] POCKELS und LANGMUIR haben die Pionierarbeit auf diesem Gebiet geleistet und das Modell einer Filmwaage entwickelt. LANGMUIR hat diese Technik anschließend verfeinert und zur allgemein bekannten LANGMUIR-POCKELS-Filmwaage weiterentwickelt. Diese Filmwaage misst den Spreitungsdruck Π_S , der die treibende Kraft bei der Bildung der Monoschicht ist, der oberflächenaktiven Substanz an der Luft-Substrat-Grenzfläche. Der Spreitungsdruck kann als Differenz der Oberflächenspannung des Substrats σ_0 , im Fall von reinem Wasser $\sigma_0 = 72 \text{ mN m}^{-1}$ bei Raumtemperatur, und der filmbedeckten Oberfläche σ beschrieben werden:^[1]

$$\Pi_S = \sigma_0 - \sigma \quad 2-30$$

Der Spreitungsdruck kann mit einer in Abbildung 2-15 dargestellten Filmwaage bestimmt und somit die Kompressionseigenschaften einer Monoschicht ermittelt werden. Hierfür wird die oberflächenaktive Substanz auf der Monoschicht gespreitet und die Oberflächenspannung wird mittels eines WILHELMY-Plättchens gemessen. Aus der Oberflächenspannung kann nach Gleichung 2-30 der Spreitungsdruck bestimmt werden. Eine Kontrolle der Spreitungsfläche der Monoschicht wird durch die Barriere gewährleistet. Durch eine definierte Erhöhung der Konzentration der gespreiteten Substanz kann hingegen die kritische Mizellkonzentration ermittelt werden.^[1]

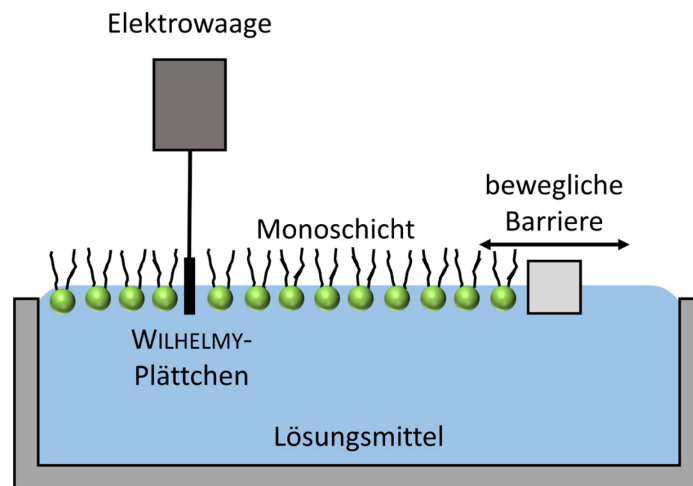


Abbildung 2-15: Schematischer Aufbau einer Filmwaage. Schematischer Aufbau einer Filmwaage zum Messen der Oberflächenspannung einer unlöslichen Monoschicht oder eines oberflächenaktiven Substrats (Abbildung modifiziert aus Literatur ^[1]).

Abbildung 2-16 zeigt exemplarisch den schematischen Verlauf einer Messung der Oberflächenspannung bei Konzentrationserhöhung des Substrats. Bei Zugabe geringer Mengen des Substrates sinkt die Oberflächenspannung zunächst deutlich. Ist die Lösungsoberfläche gesättigt, wird die kritische Mizellkonzentration überschritten und auch bei weiterer Zugabe des Substrats kommt es zu keiner Veränderung der Oberflächenspannung mehr. Je nach geometrischen Packungsfaktoren (s. Packungsparameter, Kapitel 1.1.2) kommt es nun zur Ausbildung von Kugelmizellen, Doppelschichten oder inversen Mizellen.^[1]

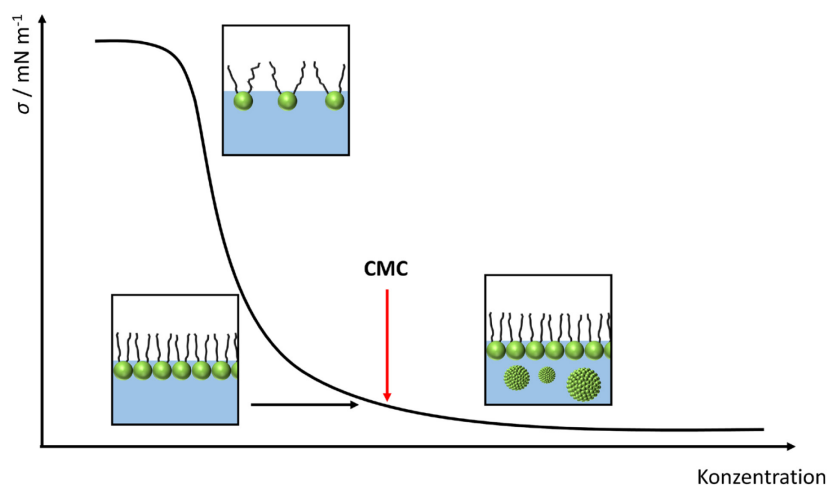


Abbildung 2-16: Schematische Darstellung der Bestimmung der kritischen Mizellkonzentration. Schematische Auftragung der Konzentration einer oberflächenaktiven Substanz gegen die Oberflächenspannung zur Bestimmung der kritischen Mizellkonzentration (Abbildung modifiziert aus Literatur ^[49,50]).

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Hochdruckfluoreszenzmikroskopie an Lipidmodellmembranen

Ein wichtiger, thermodynamischer Parameter, der zum Studium von Struktur- oder Dynamikänderung biologischer Systeme herangezogen werden kann, ist, neben der Temperatur, der Druck^[51], da nach LE CHÂTELIER hohe Drücke jede volumenreduzierende Zustandsänderung begünstigen. Unter den zellulären Bestandteilen haben sich biologische Membranen als besonders druckempfindlich hervorgetan.^[52,53] Die Applikation von Druck hat deutliche Auswirkungen auf das in Kapitel 1.1.2 beschriebene lyotrope Phasenverhalten und die Struktur von Lipidmembranen. Die Kompression einer Lipiddoppelschicht durch hohe hydrostatische Drücke hat eine Abnahme der Lipidquerschnittsfläche zur Folge, wodurch die Konformationsordnung der Alkylketten zunimmt, da diese eine gestreckte *all-trans* Konformation einnehmen, und die Membrandicke damit ansteigt.^[18] Somit bewirkt ein Druckanstieg den Übergang zu geordneteren Lipidphasenzuständen.^[53,54] Die Relevanz der Untersuchung des Einflusses hoher Drücke ist nicht nur der Induktion von Struktur- oder Dynamikveränderungen biologischer Systeme im Labor geschuldet, sondern hat auch einen wichtigen natürlichen Ursprung. In Ozeanen, die mehr als 70 % der Erdoberfläche einnehmen, herrscht im Mittel ein Druck von 38 MPa. Trotzdem ist es vielen Organismen möglich, bei so hohen Drücken nebst Temperaturen um null Grad Celsius^[55] zu überleben. Am tiefsten Punkt des Marianengrabs, in ca. 11.000 m Tiefe, herrscht ein Druck von 100 MPa.^[52,56–58] Die Art und Weise, wie sich Tiefseeorganismen diesen extremen Bedingungen anpassen, ist jedoch noch weitestgehend unbekannt. Um solche Untersuchungen durchzuführen, ist es zunächst notwendig, Lipidmembranen und Lipidmodellmembranen ohne Zusätze mittels Fluoreszenzmikroskopie zu charakterisieren.

Zur Konstruktion von Modellen biomimetischer Membranen bieten sich besonders GUVs an, da diese ein sehr naturähnliches Verhalten aufweisen und auch ein relativ simples Modellsystem sind.^[59–61] In dieser Arbeit wurden GUVs, aus einem heterogenen, anionischen 5-Komponenten-*raft*-System (5 KS; DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25 mol%)) bestehend, bei Drücken bis zu 1000 bar und verschiedenen Temperaturen untersucht. Die Präparation der GUVs wurde mittels PVA-gestützter Synthese durchgeführt, da so ein einfacher Transfer in die Druckzelle möglich war.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Hochdruckfluoreszenzmikroskopie an Lipidmodellmembranen

In den folgenden Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2 ist das Phasenverhalten dieses Systems bei 45 °C und 40 °C gezeigt. In Abbildung 3-3 ist ein schematischer Druckverlauf dargestellt. Die hier gezeigten Ergebnisse sind lediglich ein Einstieg in die Thematik und werden von Frau MAGILINY MANISEGARAN ausführlich weitergeführt.

Wie bei KAPOOR *et al.* gezeigt ^[62], befindet sich das 5 KS sowohl bei 40 °C als auch bei 45 °C in der $l_d + l_o$ -Phase. Da in den Abbildungen lediglich die l_d -Phase eingefärbt ist, sind die l_o -Phasen nur als schwarze Bereiche in den Vesikeln zu erkennen. Diese sind bei niedrigen Drücken jedoch nur schwerlich auszumachen, da diese Domänen noch relativ klein sind. Da jedoch bei 45 °C bei 100 bar schon dunkle Bereiche erscheinen, muss davon ausgegangen werden, dass auch bei 40 °C sowohl l_o - als auch l_d -Domänen vorhanden sind, die geordneten Domänen aber zu klein sind, um klar aufgelöst zu werden. Steigender Druck führt nun zu einer Zunahme der l_o -Domänen, was durch eine höhere Zahl von größeren nicht fluoreszenten Bereichen zu erkennen ist. Dies geschieht durch eine Erhöhung der Alkylkettenordnung. M. MANISEGARAN war in der Lage zu zeigen, dass mit der Zeit auch eine Vergrößerung der l_o -Domänen zu beobachten ist, diese jedoch durch Druck nochmal gefördert und mehr ausgeprägt wird. Die zeitabhängige Koaleszenz kleiner Domänen zu größeren Bereichen erfolgt durch eine Reduzierung der Grenzlinienenergie an den Domänengrenzen. Variierendes Phasenverhalten von unterschiedlichen Vesikeln in derselben Probe resultiert aus den Inhomogenitäten der Vesikel, ausgelöst durch die PVA-gestützte Vesikelpräparation. ^[15,38] Auch die Domänenform ist abhängig von der Membranzusammensetzung, die je nach Vesikel leicht unterschiedlich sein kann. So können sowohl die l_d - als auch l_o -Domänen zirkuläre Strukturen aufweisen. ^[63,64] Durch diese kleinen Unterschiede in der Zusammensetzung sowie durch die Komplexität dieses 5 KS ist eine genaue Bestimmung von Phasenübergangsdrücken nicht möglich und es kann lediglich ein ungefährender Übergangsbereich bei der jeweiligen Temperaturen angegeben werden. Bei den hier gezeigten Messungen befanden sich die Vesikel über den gesamten gemessenen Druckbereich in dem $l_d + l_o$ -Koexistenzgebiet.

3.1 Hochdruckfluoreszenzmikroskopie an Lipidmodellmembranen

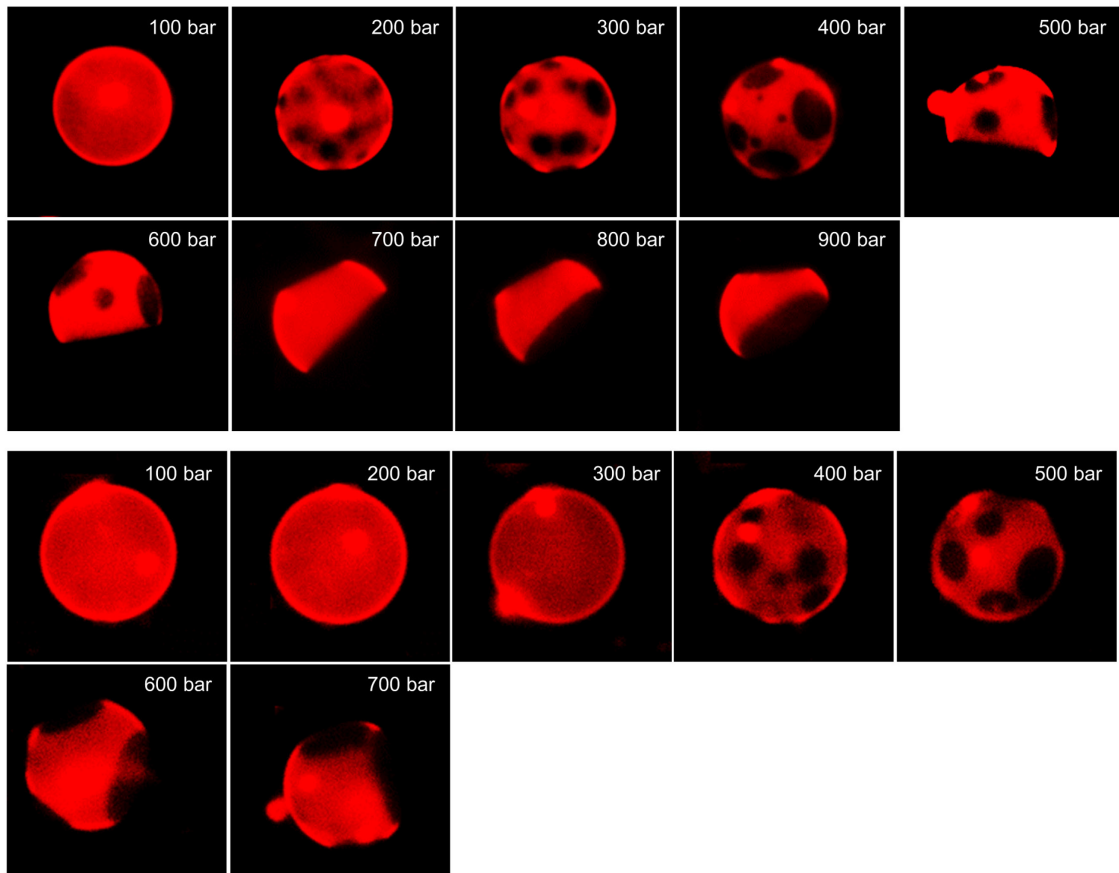


Abbildung 3-1: Phasenverhalten von 5 KS GUVs unter Druckapplikation bei 45 °C. Aufnahmen des Verhaltens zweier GUVs des 5 KS bei Druckerhöhung mit rot markierter I_q-Phase. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 45 °C durchgeführt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Hochdruckfluoreszenzmikroskopie an Lipidmodellmembranen

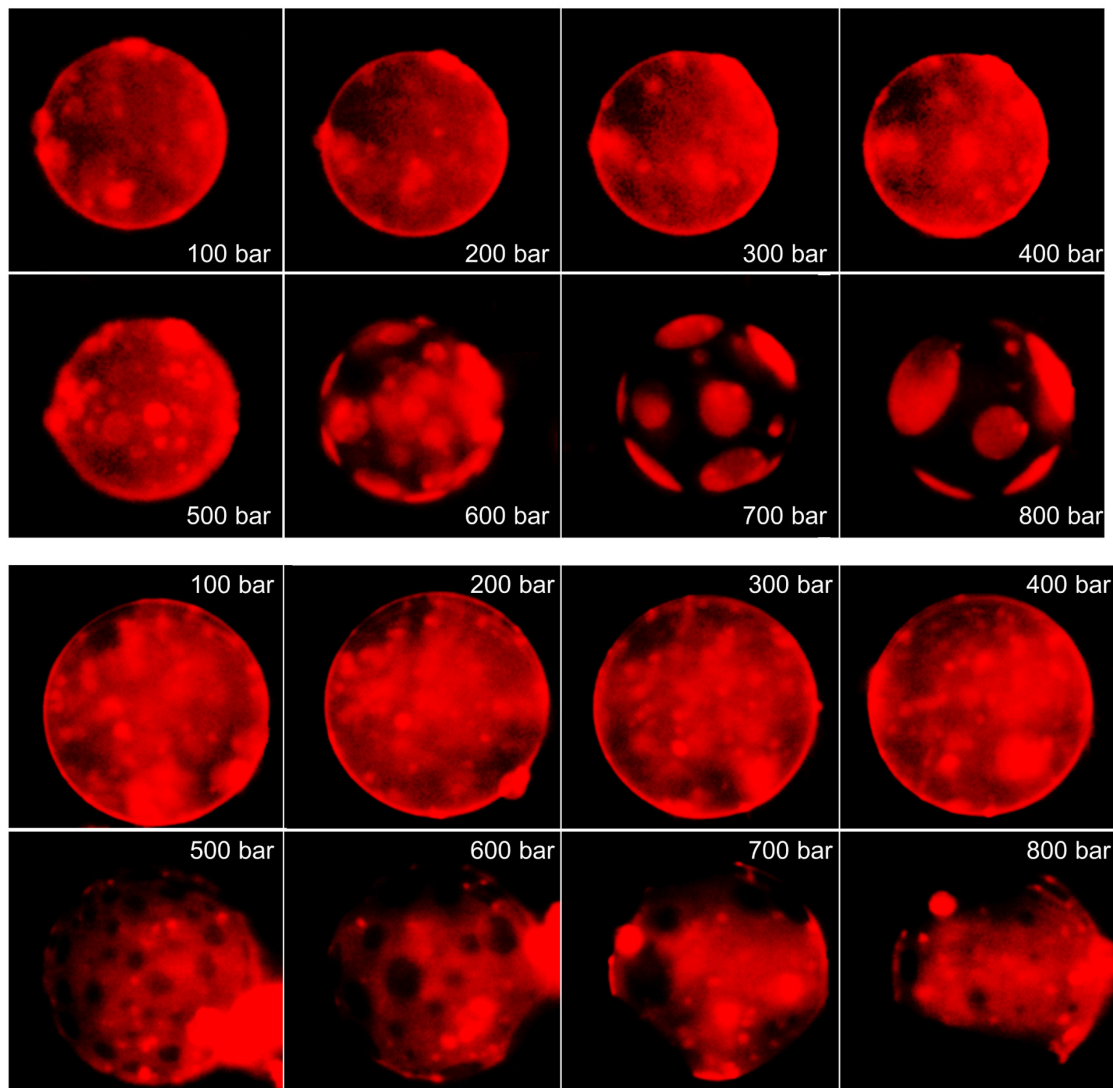


Abbildung 3-2: Phasenverhalten von 5 KS GUVs unter Druckapplikation bei 40 °C. Aufnahmen des Verhaltens zweier GUVs des 5 KS bei Druckerhöhung mit rot markierter l_q -Phase. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 40 °C durchgeführt.

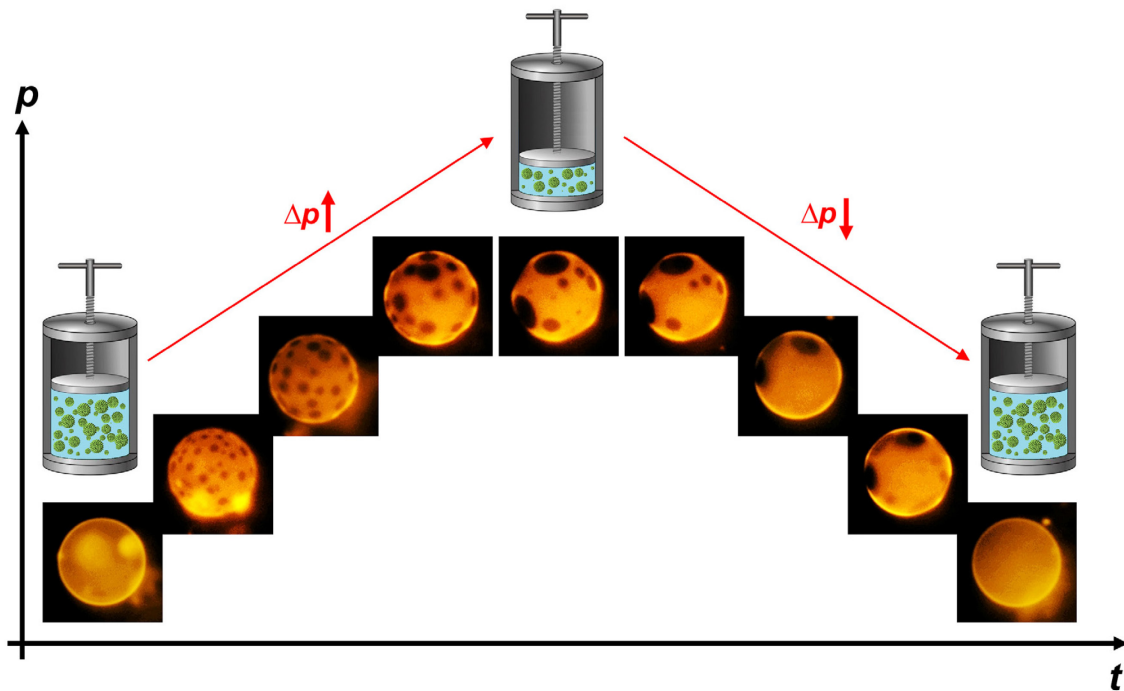


Abbildung 3-3: Phasenverhalten von 5 KS GUVs unter Druckapplikation und -Absenkung. Schematische Darstellung des Verhaltens von GUVs unter Hochdruck bestehend aus einer anionischen 5 KS-raft Mischung bei Druckaufbau (100 – 1000 bar), Druckkonstanz (1000 bar) und Drucksenkung (1000 – 100 bar) bei 50 °C aufgenommen mit der CCD-Kamera. Der verwendete Fluorophor war *N*-Rh-DHPE.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.2 Untersuchung des Einflusses verschiedener Glykansysteme auf das barotrope und thermotrope Phasenverhalten verschiedener Modellmembranen

3.2 Untersuchung des Einflusses verschiedener Glykansysteme auf das barotrope und thermotrope Phasenverhalten verschiedener Modellmembranen

3.2 A) Einfluss von Hyaluronsäure auf das thermotrope Verhalten einer DPPC-Modellmembran

Die hier präsentierten Ergebnisse wurden in *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 173 (2019), 327-334 publiziert.

In der Masterarbeit „Untersuchung des Einflusses von Hyaluronsäure (HA) auf Lipidmembranen und Proteine“ (M. Herzog, 2017) wurde der Einfluss von HA auf eine DPPC- sowie auf eine DPPC/DOPC/Cholesterin- Lipidmembran untersucht. Dabei kamen verschiedene Methoden (AFM, SAXS, IRRA-Spektroskopie, Fluoreszenzspektroskopie, ATR-IR und DSC) zum Einsatz. Mit keiner der verwendeten Methoden konnte ein Einfluss auf temperatur- oder druckinduzierte Phasenübergänge sowie das Phasenverhalten festgestellt werden. Daher wurden als Grundlage des positiven Einflusses der HA auf die Reibung zwischen Gelenken ein synergistischer Effekt mit anderen in der Synovialflüssigkeit enthaltenen Substanzen, wie z.B. Proteoglykanen oder weiteren Lipiden, sowie eventuell ein entropiebasierter Mechanismus (*excluded volume*-Effekt), wie er zum Beispiel für Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO) nachgewiesen wurde, vermutet.^[65–67]

Als fortführende Untersuchungen zu der Masterarbeit wurden noch weitere Messungen durchgeführt. Die in der damaligen Arbeit verwendete HA besaß ein Molekulargewicht von ≥ 1000 kDa. WIELAND *et al.* konnten in ihrer Publikation (2016) zeigen, dass der Einfluss der HA mit abnehmendem Molekulargewicht steigt.^[68] Ferner diskutierte und untersuchte M. KREUZER (2011) in seiner Dissertation den Einfluss von 1 M NaCl auf die Wechselwirkungen zwischen einer Lipidmodellmembran und HA. Diese Untersuchungen ließen die Vermutung zu, dass zusätzliche Salz-Ionen in Lösung die Ladungen entlang der Polymerkette der HA abschirmen und so die Wechselwirkungen mit einer Lipidmembran inhibieren können. Ferner wurde angenommen, dass durch die Anwesenheit des Salzes die Polymerkette von einer gestreckten in eine geknäulte Struktur übergeht und somit die Möglichkeit von Interaktionen weiter verringert wird.^[69] Da in der Masterarbeit ein 155 mM NaCl-Puffer sowie eine recht große HA verwendet wurden, wurden zur Überprüfung dieser

3.2 A) Einfluss von Hyaluronsäure auf das thermotrope Verhalten einer DPPC-Modellmembran

beiden Thesen nochmals weitere DSC- und Fluoreszenzspektroskopie-Messungen mit einer etwa 10 kDa großen HA in Wasser sowie 155 mM NaCl-Lösung durchgeführt, und die Auswirkungen auf DPPC-MLVs untersucht.

3.2.1 Hyaluronsäure

Die Hyaluronsäure wurde 1934 von K. MEYER und J. PALMER aus dem Glaskörper eines Kuhauges das erste Mal als zunächst unbekannte Substanz isoliert und beschrieben. Nachfolgende Untersuchungen ergaben, dass es sich um ein Polysaccharid bestehend aus zwei Zuckermolekülen handelt, von denen eines als Uronsäure identifiziert werden konnte. Die Kombination aus Fundort (griechisch: „*hyalos*“ = Glas) und identifizierter Substanz ergab schließlich den Namen *Hyaluronsäure*. Gewonnen wurde die HA zunächst nur aus Hahnenkämmen und menschlichen Nabelschnüren in hochaufgereinigter Form mit hohem Molekulargewicht und kam als Ersatz für Hühnereiweiß in Bäckereiprodukten und in der menschlichen Augenheilkunde zum Einsatz. Erst 16 Jahre später gelang es K. MEYER, die gesamte chemische Struktur aufzuklären. Bis zur vollständigen Identifikation der physiochemischen Eigenschaften und biologischen Rolle dauerte es weitere 45 Jahre. Auch war es nun möglich, die HA aus bakteriellen Quellen, wie z.B. Streptokokken-Kulturen, zu gewinnen.^[70]

Die HA ist ein Polysaccharid aus der Gruppe der Glykosaminoglykane bestehend aus makromolekularen Ketten der beiden Monomere D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin, die über eine β -1,3-glykosidische Bindung miteinander verknüpft sind. Das nächste Disaccharid hingegen schließt über eine β -1,4-glykosidische Bindung an. Die typische Länge eines Polymers besteht aus etwa 250-50000 Disaccharideinheiten. Aufgrund dieser in allen Säugetieren konservierten Struktur wird der HA eine hohe biologische Bedeutung zugeschrieben.^[70,71]

Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carboxyl- und N-Acetylgruppen der HA bildet sich bei globaler Betrachtungsebene eine *Random Coil*-Struktur aus und auf lokaler Ebene eine vierfache Helix. Da es zur fast vollständigen Dissoziation der Carboxylgruppen unter physiologischen Konditionen kommt, liegt sie bei diesen Bedingungen anionisch vor und besitzt einen pK_s -Wert von 3.21. Die *in vivo* gefundene Größe beträgt üblicherweise zwischen 5 und 20000 kDa.^[72]

3 Ergebnisse und Diskussion

3.2 A) Einfluss von Hyaluronsäure auf das thermotrope Verhalten einer DPPC-Modellmembran

Hohe Konzentrationen der HA sind in weichen Bindegewebe wie Nabelschnur, Gelenkflüssigkeiten, dem Glaskörper des Auges und Haut zu finden, in denen sie als Hyaluronat ein Bestandteil der extrazellulären Matrix bildet. Des Weiteren kann sie im Körper in Niere, Gehirn, Lunge und Muskelgewebe sowie verschiedenen Körperflüssigkeiten wie Kammerwasser des Auges, Urin und im Serum des Blutplasmas gefunden werden. Bei einem Körpergewicht von etwa 70 kg besitzt ein durchschnittlicher Mensch ca. 15 g HA im Körper, die von integralen Membranproteinen, den sogenannten HA-Synthasen, durch Aneinanderknüpfen der Disaccharideinheiten synthetisiert wird. ABC-Transporter exportieren sie anschließend aus der Zelle.^[70]

Zu den zentralen Aufgaben der HA im Körper gehören die Wasserspeicherung und Schmierung von Gelenken und Bandscheiben. Dabei ist 1 g HA in der Lage, bis zu 6 L Wasser zu speichern. Der Glaskörper des Auges z.B. besteht aus 98 % Wasser, welches an nur 2 % HA gebunden ist.^[70]

Aktuelle Anwendungsgebiete der HA sind Medizin, Schönheitschirurgie und Kosmetika. In der medizinischen Behandlung wird sie vor allem zur „Schmierung“ Arthrose geschädigter Gelenke genutzt. Dies geschieht mittels gezieltem Spritzen einer HA-Lösung in den geschädigten Gelenkspalt. Belege für einen wirklichen Vorteil dieser Methode blieben bislang jedoch aus.^[73] In Augenoperationen, beispielsweise zur Behandlung des Grauen Stars, wird sie zum Schutz der Endothelzellschicht der Hornhaut und in Nasensprays und Halstabletten die Schleimhäute schützend eingesetzt. Die Schönheitschirurgie verwendet HA zur Brustvergrößerung, Faltenunterspritzung und Modellierung der Lippen. Aufgrund der schlechten Resorption der HA in voller Größe durch die Haut kommen in der Kosmetik Abbaufragmente der HA (50-130 kDa) zum Einsatz.^[70-72,74,75]

3.2.2 DSC-Messungen

Zuerst wurden auch hier wieder DSC-Messungen zur kalorimetrischen Bestimmung der Phasenübergänge des Phospholipids DPPC durchgeführt. In den damaligen Messungen mit einem 155 mM NaCl-Puffer und HA mit einem Molekulargewicht von ≥ 1000 kDa konnten keine Verschiebungen des Vorübergangs von der $L_{\beta'}$ - zur $P_{\beta'}$ -Phase und des Gel- zu flüssigkristallinen Hauptübergangs ($P_{\beta'}$ – L_{α}) festgestellt werden. Ein Einbau der HA in die Membran würde, wie am Beispiel des Cholesterins zu sehen ist, eine Veränderung der DPPC-

3.2 A) Einfluss von Hyaluronsäure auf das thermotrope Verhalten einer DPPC-Modellmembran

spezifischen DSC-Thermogramme hervorrufen. Dabei kann der Vorübergang je nach Konzentration sogar komplett verschwinden und der Hauptübergang von der Gel- in die flüssig-kristalline Phase verbreitert sich, bis er bei einer Cholesterin-Konzentration von 50 mol% gar nicht mehr auszumachen ist.^[76] Dies konnte hier nicht beobachtet werden und somit konnte ein Einbau der HA in die Membran ausgeschlossen werden. In den nun durchgeführten Messungen wurde der 155 mM NaCl-Puffer gegen MilliQ-Wasser ausgetauscht und eine HA mit einem Molekulargewicht von < 10 kDa verwendet. Zum Vergleich wurde auch die < 10 kDa schwere in einem 155 mM NaCl-Puffer und die ≥ 1000 kDa HA in Wasser sowie NaCl-Puffer vermessen. Die Konzentration der HA betrug immer 5 mg mL^{-1} . In der folgenden Abbildung 3-4 sind sechs ausgewählte und reproduzierte DSC-Thermogramme aufgetragen.

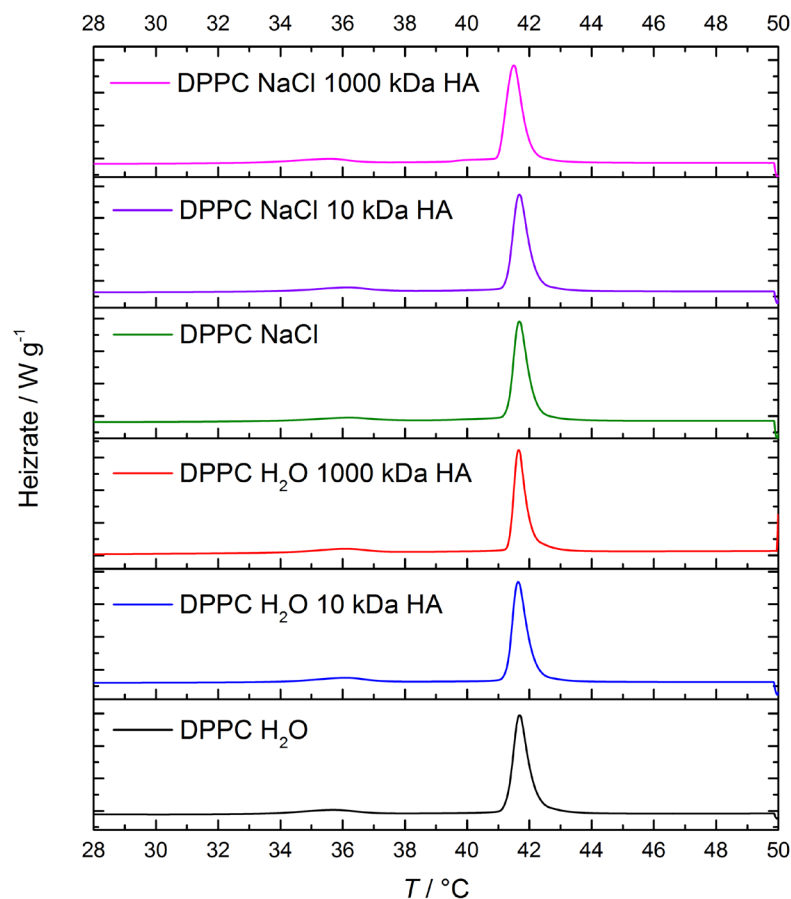


Abbildung 3-4: DSC-Thermogramme von DPPC mit und ohne HA. Auftragung ausgewählter DSC Thermogramme für DPPC in H_2O (schwarz), in H_2O mit HA < 10 kDa (blau), in H_2O mit HA ≥ 1000 kDa (rot) und DPPC in 155 mM NaCl-Puffer (grün), in 155 mM NaCl-Puffer mit HA < 10 kDa (lila), in 155 mM NaCl-Puffer mit HA ≥ 1000 kDa (pink). Die Konzentration der HA betrug in jeder Messung 5 mg mL^{-1} .

3 Ergebnisse und Diskussion

3.2 A) Einfluss von Hyaluronsäure auf das thermotrope Verhalten einer DPPC-Modellmembran

Wie in Abbildung 3-4 zu erkennen ist, weisen alle erhaltenen Kurven zwei endotherme Phasenübergänge auf. Demzufolge musste der Probe in Relation zum eingesetzten Referenzsystem mehr Energie zugeführt werden, um dieselbe Temperatur aufrechterhalten zu können. In den Thermogrammen sind leichte Schwankungen in der Übergangstemperatur des Vorübergangs zu erkennen. Diese liegen allerdings im Rahmen der Messgenauigkeiten und weisen keinerlei Tendenz bezüglich der HA-Konzentration oder Größe auf. Die Hauptübergangstemperaturen hingegen bleiben unter den verschiedenen Bedingungen jedoch jederzeit konstant. Dies wird durch eine Auftragung der jeweiligen Übergangstemperaturen nochmal verdeutlicht (Abbildung 3-5). Die genauen Werte können der Tabelle 3-1 entnommen werden. Ferner sind dort literaturbekannte Werte für die Phasenübergangstemperaturen des reinen DPPC und von DPPC mit 1 mg mL^{-1} HA angegeben. In den Messungen von T. ZANDER (2016) konnten ebenfalls keinerlei Einflüsse der HA auf die Phasenübergänge der Lipidsysteme festgestellt werden^[73] und stehen somit im Einklang mit den hier erhaltenen Ergebnissen.

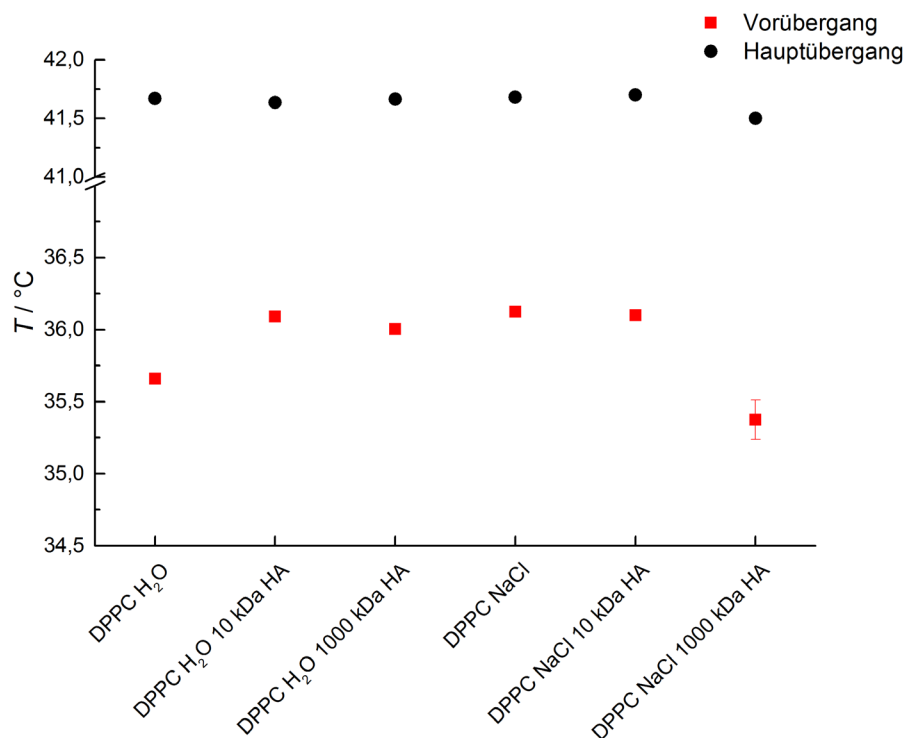


Abbildung 3-5: Ermittelte Vor- und Hauptphasenübergangstemperaturen aus der DSC. Auftragung der Vor- und Hauptübergangstemperatur von DPPC unter verschiedenen Lösungsbedingungen. Die Konzentration der HA betrug in jeder Messung 5 mg mL^{-1} .

3.2 A) Einfluss von Hyaluronsäure auf das thermotrope Verhalten einer DPPC-Modellmembran

Tabelle 3-1: Gemessene Vor (T_p)- und Hauptübergangstemperatur (T_m) von DPPC unter verschiedenen Bedingungen und Vergleich mit einem Literaturwert. Die Konzentration der HA betrug in jeder Messung 5 mg mL^{-1} .

DPPC	$T_p / ^\circ\text{C}$	$T_m / ^\circ\text{C}$
in H_2O	$35,66 \pm 0,03$	$41,67 \pm 0,02$
in $\text{H}_2\text{O} < 10 \text{ kDa}$	$36,09 \pm 0,03$	$41,64 \pm 0,01$
in H_2O mit $\text{HA} \geq 1000 \text{ kDa}$	$36,01 \pm 0,02$	$41,67 \pm 0,01$
in 155 mM NaCl -Puffer	$36,13 \pm 0,03$	$41,68 \pm 0,00$
in 155 mM NaCl -Puffer mit $\text{HA} < 10 \text{ kDa}$	$36,10 \pm 0,00$	$41,70 \pm 0,02$
in 155 mM NaCl -Puffer mit $\text{HA} \geq 1000 \text{ kDa}$	$35,38 \pm 0,14$	$41,50 \pm 0,00$
Literaturwert ^[1]	33,85	40,85
Literatur DPPC + 1 mg mL^{-1} HA ^[77]	$33,8 \pm 0,5$	$41,8 \pm 0,02$

3.2.3 Fluoreszenzspektroskopie

Zur weiteren Untersuchung wurden fluoreszenzspektroskopische Messungen mit denselben Probenansätzen vorgenommen. Als Fluoreszenzsonde wurde LAURDAN verwendet. Nach Gleichung 2-10 wurde dann aus den erhaltenen und gemittelten Werten im blauen (I_B , 440 nm) und im roten (I_R , 490 nm) Wellenlängenbereich der GP -Wert für jede Probe bestimmt und gegen die jeweilige Temperatur aufgetragen. Der Wendepunkt in den Kurvenverläufen entspricht dabei der Temperatur, bei der 50 % der Lipidmembran in der Gel- und ebenso 50 % in der flüssig-kristallinen Phase vorliegen, also der Hauptphasenübergangstemperatur. Abbildung 3-6 zeigt die erhaltenen Kurven. Die HA wurde auch hier wieder in einer Konzentration von 5 mg mL^{-1} eingesetzt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.2 A) Einfluss von Hyaluronsäure auf das thermotrope Verhalten einer DPPC-Modellmembran

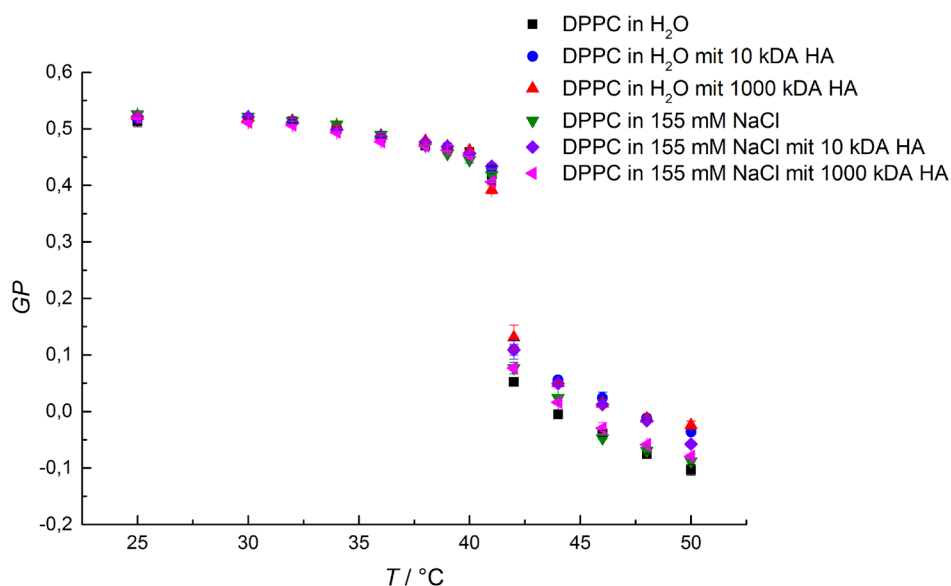


Abbildung 3-6: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen des Einflusses der HA auf DPPC-Vesikel. *GP*-Werte von DPPC in An- und Abwesenheit von < 10 kDa bzw. ≥ 1000 kDa großer HA sowie in Wasser und 155 mM NaCl-Puffer in Abhängigkeit der Temperatur (DPPC in H₂O (schwarz), in H₂O mit HA < 10 kDa (blau), in H₂O mit HA ≥ 1000 kDa (rot) und DPPC in 155 mM NaCl-Puffer (grün), in 155 mM NaCl-Puffer mit HA < 10 kDa (lila), in 155 mM NaCl-Puffer mit HA ≥ 1000 kDa (pink)).

Hierbei ist zu sehen, dass die Kurvenverläufe nahezu sigmoidal verlaufen. Die Phasenübergangstemperatur wurde hierbei nicht bestimmt, da offensichtlich ist, dass sie wie schon in den DSC-Messungen zu sehen war, durch verschieden große HA in unterschiedlichem Milieu nicht signifikant beeinflusst wird. In der Gelphase sinken die *GP*-Werte nur geringfügig bis zu einer Temperatur von etwa 42 °C und ein Unterschied zwischen den verschiedenen Proben ist nicht zu erkennen. Nach dem Phasenübergang in die flüssig-kristalline Phase weisen die Proben jedoch mit der kleineren HA etwas größere *GP*-Werte auf. Ebenso sind die *GP*-Werte für die ≥ 1000 kDa große HA in Wasser erhöht. Die Ordnung der Lipidketten wird hier geringfügig erhöht. Der Kurvenverlauf der größeren HA in einem 155 mM NaCl-Puffer hingegen ist vergleichbar mit denen für das reine DPPC in Wasser oder im 155 mM NaCl-Puffer. Der beschriebene ordnende Effekt für die anderen Proben ist jedoch nur sehr gering ausgeprägter und lässt lediglich auf schwache Interaktionen unter diesen Bedingungen schließen. Somit lässt sich schlussfolgern, dass HA unter physiologischen Bedingungen nicht signifikant mit DPPC-Membranen interagiert. Wie schon in der Einleitung dieses Kapitels beschrieben, ist die „Schmierung“ natürlicher Gelenke ein synergistischer Effekt

3.2 A) Einfluss von Hyaluronsäure auf das thermotrope Verhalten einer DPPC-Modellmembran

aller Bestandteile der Gelenkflüssigkeit. Proteoglykane und andere Lipide könnten einen wesentlich größeren Einfluss haben und sollten weiterführend dahingehend untersucht werden. Wie einleitend auch schon erwähnt, muss die „Schmierung“ natürlicher Gelenke nicht unbedingt auf einem auf attraktiven Membraninteraktionen beruhenden Prinzip basieren. Entropiebasierte Vorgänge, wie z.B. der *excluded volume*- Effekt (s. Abbildung 3-7) der HA könnten einen großen Einfluss haben. Von vielen stabilisierenden Osmolyten, wie unter anderem Trimethylamin-*N*-oxid, ist bekannt, dass sie Nukleinsäuren oder Proteine in der nativen, kompakten Form durch Volumenausschluss stabilisieren, indem sie stark mit den Wassermolekülen in der Volumenphase interagieren^[65] und so die Hydrodynamik, d.h. Viskosität, Elastizität und Kompressionssteifigkeit, kontrollieren. Dies könnte in der Synovialflüssigkeit ebenfalls der Fall sein.

3.2.4 Zusammenfassung

Die nachträglichen Untersuchungen stützen die am Anfang aufgestellte These, dass Einflüsse der HA auf eine Lipidmembran eher in Abwesenheit von Salz-Ionen und für kleinere HA beobachtet werden können. In den DSC-Experimenten war keine Veränderung der Phasenübergänge zu erkennen, allerdings zeigte sich in den fluoreszenzspektroskopischen Auftragungen des *GP*-Wertes gegen die Temperatur eine geringfügige Zunahme des *GP*-Wertes oberhalb von 42 °C, d.h. in der fluiden bzw. flüssig-kristallinen Phase für die HA mit < 10 sowie ≥ 1000 kDa in reinem Wasser. Demzufolge kann ein leichter Anstieg der Konformationsordnung der Lipide postuliert werden. Dieser Effekt ist zwar gering, kann jedoch als Indiz für schwache Wechselwirkungen der HA mit der Lipidoberfläche unter diesen Bedingungen gesehen werden. Diese Ergebnisse konnten durch Epifluoreszenz-Experimente an einer DPPC-Monoschicht bestätigt werden, da auch dort nur der fluide Zustand durch die HA beeinflusst wurde.^[78]

Schließlich zeigen auch diese Experimente jedoch, dass die HA unter physiologischen Bedingungen nicht mit den Lipiden symbiotisch interagiert. Somit bleiben als Theorie des Wirkmechanismus die oben genannten Hypothesen eines synergistischen Effektes von Proteoglykanen, Ionen und weiteren Bestandteilen der Synovialflüssigkeit sowie Entropie-basierte Mechanismen bestehen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.2 A) Einfluss von Hyaluronsäure auf das thermotrope Verhalten einer DPPC-Modellmembran

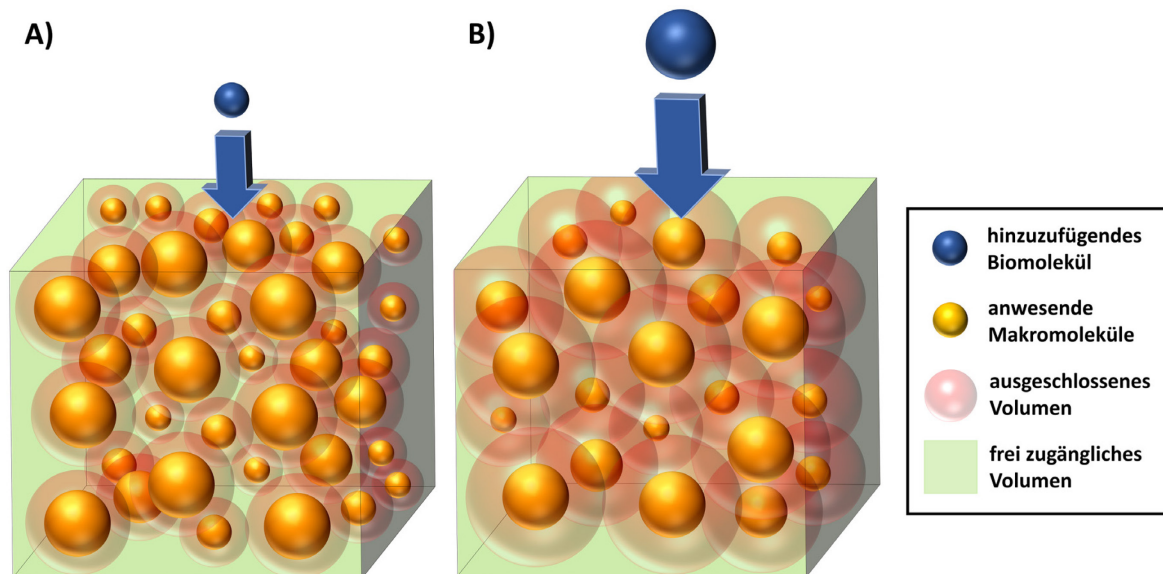


Abbildung 3-7: Schematische Darstellung des *excluded volume*-Effektes. Schematische Erklärung des *excluded volume*-Effektes. Die roten Bereiche der anwesenden Makromoleküle (orange) sind für das hinzuaddierende Biomoleküle (blau) nicht zugänglich. Eine Vergrößerung der Makromoleküle bewirkt eine drastische Vergrößerung des ausgeschlossenen Volumens (modifiziert aus Literatur ^[79]).

3.2 B) Einfluss von Dextran auf die Organisation einer heterogenen anionischen 5
Komponenten-Modellmembran**3.2 B) Einfluss von Dextran auf die Organisation einer heterogenen anionischen 5
Komponenten-Modellmembran****3.2.5 Glykane**

Als Glykane oder Polysaccharide werden Ketten von Monosacchariden verschiedener Länge, von wenigen bis hunderten Zuckereinheiten bezeichnet. Somit gehören diese zur Klasse der Kohlenhydrate.^[80] Kohlenhydrate sind definiert als Polyhydroxyaldehyde bzw. Polyhydroxyketone und ihre einfachen Derivate oder größere Verbindungen, die zu solchen Einheiten hydrolysiert werden können. Dabei ist ein Monosaccharid ein Kohlenhydrat, das nicht in eine einfachere Form hydrolysiert werden kann und am Ende der Kohlenstoffkette oder an einem inneren Kohlenstoff eine potentielle Carbonylgruppe besitzt. Diese wird dann als Aldehyd- bzw. Ketongruppe bezeichnet und die daraus zugehörigen Monosaccharide resultierend als Aldosen bzw. Ketosen. Freie Monosaccharide können offenkettig oder ringförmig vorliegen. Ringförmig angeordnete Monosaccharide sind vor allem bei Oligosacchariden anzutreffen, bei denen es sich um glykosidisch verbundene lineare oder verzweigte Ketten von Monosacchariden handelt. Ein Glykokonjugat ist eine Verbindung, in dem eine oder mehrere Monosaccharid- oder Oligosaccharideinheiten kovalent an eine Nichtkohlenhydrateinheit gebunden sind.^[81] In natürlich vorkommenden Glykokonjugaten kann der Teil des Moleküls, der die Glykane umfasst, in seinem Beitrag zur Gesamtgröße stark variieren. In vielen Fällen machen die Glykane einen wesentlichen Teil der Masse des Glykokonjugats aus, wodurch die Oberfläche von natürlichen Zellen mit einer dichten Schicht von Zuckern bedeckt ist, die als Glykokalyx bezeichnet wird.^[81,82]

Kohlenhydrate sind vor allem beim Aufbau komplexer Organismen und Organe von essentieller Bedeutung, die Interaktionen zwischen den Zellen und der umgebenden Matrix benötigen. Alle Zellen und zahlreiche Makromoleküle in der Natur tragen eine Reihe von kovalent gebundenen Monosacchariden oder Oligosacchariden, die im Allgemeinen als *Glykane* bezeichnet werden können.

Neben ihrer bekannten Rolle bei der Energieerzeugung und dem Stoffwechsel, einschließlich der Speicherung von Nährstoffen, haben Glykane offensichtlich zahlreiche strukturelle und biophysikalische Aufgaben in vielen Systemen.^[82] Da sich viele Glykane auf der äußeren Oberfläche von intra- und extrazellulären Makromolekülen befinden, können sie eine Vielzahl von Zell-Zell-, Zell-Matrix- sowie Zell-Molekül-Wechselwirkungen modulieren

3 Ergebnisse und Diskussion

3.2 B) Einfluss von Dextran auf die Organisation einer heterogenen anionischen 5 Komponenten-Modellmembran

oder vermitteln, die für die Entwicklung und Funktion eines komplexen, mehrzelligen Organismus nötig sind.^[81] Ferner können sie auch als Vermittler von Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Organismen wirken, z. B. zwischen einem Wirtsorganismus und einem Parasiten oder einem Symbionten.^[83] Darüber hinaus sind einfache, proteingebundene Glykane im Zellkern und im Zytoplasma in großer Zahl vorhanden, wo sie unter anderem als regulatorische Schalter dienen können.^[81] Abhängig von dem Glykantypen und unter anderem dem beteiligten Glykan-bindenden Protein gibt es viele verschiedene Möglichkeiten zur Glykanklassifizierung. Eine einfache aber umfassende Klassifizierung nach VARKI und LOWE unterteilt Glykan-Funktionen in vier unterschiedliche Kategorien.^[84] Die erste ist die strukturelle und modulatorische Funktion, die auch die Nährstoffbindung einschließt. Dazu zählen unter anderem die Schmierung von Gelenken^[85–87], die Elastizität von Geweben^[88] sowie eine struktur- und funktionsgebende Rolle für Zellwände^[89–92]. Die zweite und dritte Kategorie umfasst die extrinsische und intrinsische Erkennung von Glykanen. Durch die intrinsische Erkennung können z.B. die Faltung und der Abbau von Glykoproteinen^[93–98] sowie die Endozytose^[99,100] eingeleitet und intrazelluläre Signale^[101–103] weitergeleitet werden. Die extrinsische Erkennung hingegen umfasst die hochspezifische Identifikation zahlreicher Krankheitserreger aber auch Symbionten anhand ihrer Glykan-Sequenzen sowie die Wechselwirkung mit Zelloberflächenglykanen der Wirtsspezies, welche unter anderem bakterielle, mykotische und parasitäre Adhäsine^[83,104–107] sowie Pflanzen- und Bakterientoxine^[108–115] einschließt.^[82] Die letzte Kategorie umfasst das molekulare Mimikry von Wirtsglykanen.^[82]

Im Vordergrund dieser Arbeit stehen vor allem die hydrierten Glykan-Netzwerke in Form der Zellwände, des Periplasmas oder der gelähnlichen Matrix, welche allgegenwärtig in direkter Nähe zu Plasmamembranen anzutreffen sind.^[116–119] Doch trotz dieser Häufigkeit ist ihre Funktion im extrazellulären Milieu noch weitestgehend unbekannt.^[120] SUBRAMANIAM *et al.* haben für homogene und inhomogene Glykan-Netzwerke verschiedene Auswirkungen auf die Lipidphasenseparation gefunden. Inhomogene Glykan-Netzwerke zeigten einen stabilisierenden Effekt der Lipidphasentrennung, wohingegen homogene Glykan-Netzwerke die Phasentrennung unterdrückten.^[35] Dieser strukturierende Effekt auf Lipidphasen resultiert wahrscheinlich aus einer bevorzugten Wechselwirkung von Glykanen mit geordneten Lipidphasen. Daher ist die Etablierung der Präparation von homogenen und

3.2 B) Einfluss von Dextran auf die Organisation einer heterogenen anionischen 5
Komponenten-Modellmembran

inhomogenen Glykan-Netzwerken sowie die Untersuchung des strukturierenden Effekts auf die Lipidphasenseparation ein Ziel dieser Arbeit, um zu einem späteren Zeitpunkt diese Vorgänge nicht nur temperaturabhängig, sondern auch unter Hochdruck untersuchen zu können.

3.2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Ähnlich wie bei SUBRAMANIAM *et al.* [35] beschrieben, wurde zur Untersuchung eines möglichen Effektes biologisch relevanter Glykane auf das Verhalten von Lipidmodellmembranen ein *in vitro* Experiment durchgeführt, welches auf einer festen Trägerplatte vorgenommen wurde. Mittels Fluoreszenzmarkierung und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurden das Glykan-Netzwerk sowie die Lipidmembranen visualisiert. Stellvertretend für die Glykan-Systeme wurde hierbei Dextran mit einem Molekulargewicht von 10 kDa gewählt. Die erste Herausforderung stellte die Präparation von sowohl homogenen als inhomogenen stabilen Dextranschichten in der Pufferlösung dar, die sich zeitlich und temperaturabhängig nicht veränderten. Als homogenes Netzwerk werden die Bereiche der Dextranschicht aufgefasst, welche eine einheitliche Verteilung des Dextrans mit Inhomogenitäten unterhalb der Auflösung des Mikroskops aufwiesen (Abbildung 3-8). [35] Nachdem die rehydratisierten Dextran-Netzwerke in sämtlichen Experimenten die gewünschte Stabilität auf den verwendeten Deckgläsern aufwiesen, wurden im nächsten Schritt GUVs aus dem anionischen heterogenen fünf Komponenten *raft*-System (DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin 45:5:20:5:25) bei einer Temperatur von 70 °C zu den zuvor präparierten Glykan-Netzwerken zugegeben. Wie bei SUBRAMANIAM *et al.* beschrieben, sollten dann durch spontanes Aufbrechen der GUVs Lipidmembranschichten stellenweise mit dem Glykan-Netzwerk interagieren und so innerhalb von 10 min eine zweidimensionale Schicht auf dem Netzwerk bilden. [35] Jedoch konnte selbst nach 24 Stunden nur an sehr wenigen Stellen eine Adsorption der Vesikel auf dem Glykan-Netzwerk festgestellt werden (Abbildung 3-9).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.2 B) Einfluss von Dextran auf die Organisation einer heterogenen anionischen 5 Komponenten-Modellmembran

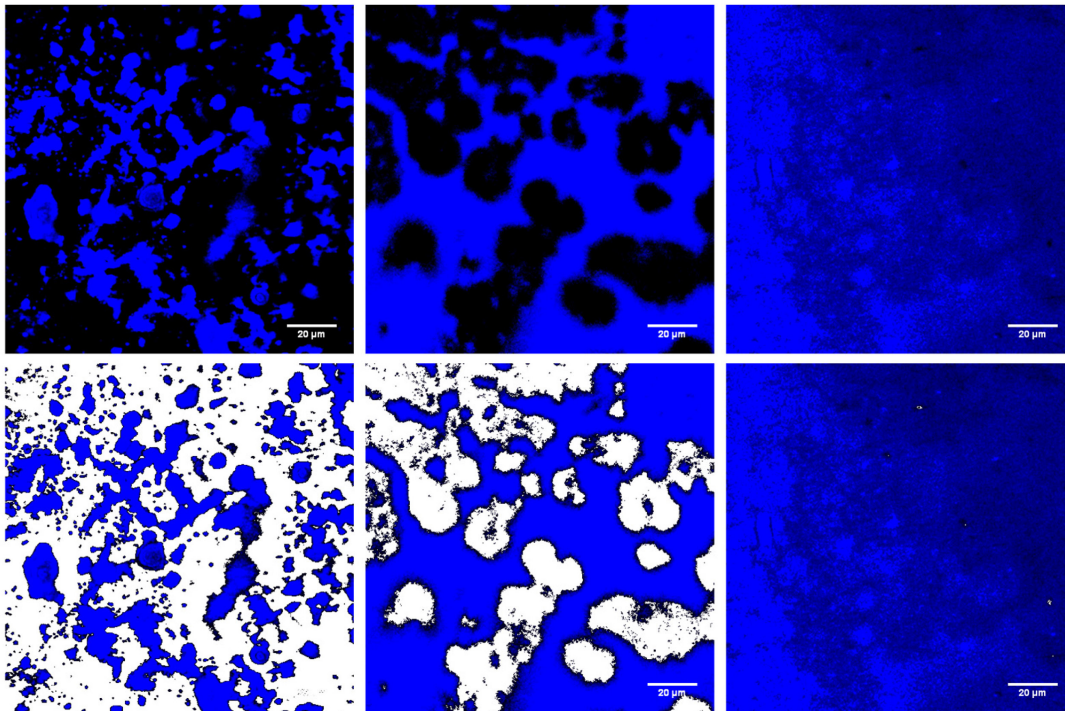


Abbildung 3-8: Stabile homogene und inhomogene Dextran-Netzwerke. Ausgewählte Aufnahmen stabiler inhomogener (links und Mitte) und homogener (rechts) Dextran-Netzwerke (markiert mit Dextran ATTO Fluor™ 647; blau). Zur besseren Visualisierung der Inhomogenitäten wurden in der zweiten Reihe Bereiche, in denen keine Dextran ATTO Fluor™ 647-Fluoreszenz detektiert werden konnte, in allen Bildern weiß eingefärbt. Die Skala entspricht 20 µm.

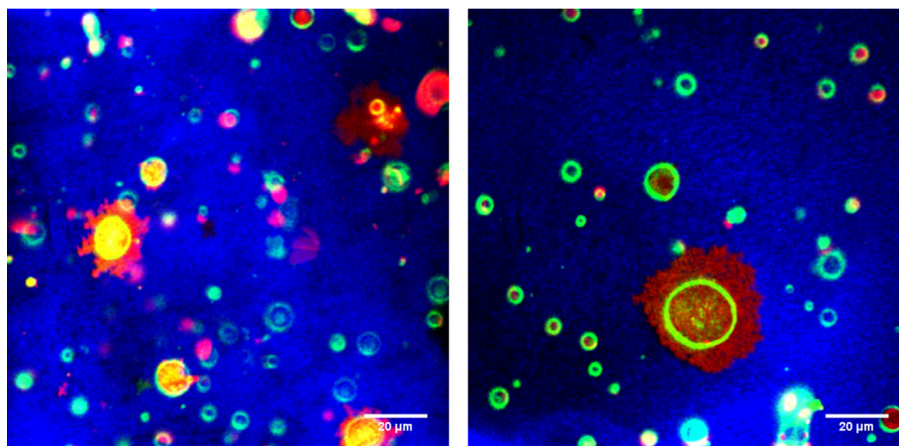


Abbildung 3-9: 5 KS GU-Adsorption an einer Dextran-Schicht nach 24 Stunden. Auch nach 24 Stunden war noch keine ausreichende Bedeckung des Dextran-Netzwerkes gegeben. Die meisten Vesikel des 5 KS lagen immer noch stabil in Lösung vor. Die unscharfe Darstellung der Vesikel resultiert aus einer Fokussierung auf die Dextranschicht. Dass die l_o - und l_d -Phase nicht deckend übereinanderliegen, resultiert aus der immer noch vorhandenen Diffusionsbewegung der GUVs. Die Skala entspricht 20 µm. Die verwendeten Membran-Fluorophore waren NBD-DHPE (grün; l_o -Phase) und *N*-Rh-DHPE (rot; l_d -Phase). Zur Visualisierung der Glykanschicht wurde Dextran ATTO Fluor™ 647 (blau) eingesetzt.

3.2 B) Einfluss von Dextran auf die Organisation einer heterogenen anionischen 5
Komponenten-Modellmembran

Förderlich für eine schnelle Adsorption erwies sich lediglich ein Verdampfen des Puffers und Einengen der Probe, wobei darauf geachtet werden musste, dass die Probe nicht vollständig eintrocknete. Die Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen zeigten dann, wie auch bei SUBRAMANIAM *et al.*, eine durch das Glykan-Netzwerk koordinierte flächige Verteilung der geordneten (l_o) und ungeordneten (l_d) Lipidphasen (Abbildung 3-10). Die unregelmäßigen Formen der Lipidphasen sind ungewöhnlich, da diese normalerweise ohne die Anwesenheit von Glykanen stark durch die Grenzlinienspannung beeinflusst werden und daher die Grenzfläche durch Ausbildung großer kreisförmiger Domänen reduziert wird.^[121] Eine mögliche Erklärung dafür liefert das *kinetic trapping*^[64,122–124], bei welchem sich die Moleküle selbstorganisiert assemblieren und einen geordneten Gleichgewichtszustand mit minimaler freier Energie des Systems ausbilden.^[125,126]

Weiterhin ist auffällig, dass vor allem in Bereichen hoher Dextrankonzentration die l_d -Phase weniger auftritt als die l_o -Phase. Eine genaue Auswertung der Intensitätsverteilung im Bildquerschnitt mittels *imageJ* spiegelt diese Aussage auch quantitativ wider, da der Fluoreszenzintensitätsverlauf der l_o -Phasen im ausgewerteten Bildausschnitt Maxima aufweist, die deckungsgleich mit Maxima der Intensitätsverläufe der l_d -Phase und des Dextran-Netzwerkes sind. Die Fluoreszenz ausgehend von der l_d -Phase verhält sich jedoch deutlich konträr zu der Fluoreszenzintensitätsverteilung des Dextran-Netzwerkes (Abbildung 3-11). Damit kann auch hier eine Co-Lokalisation von l_o -Phase und glykanreichen Domänen beobachtet werden.^[35]

3 Ergebnisse und Diskussion

3.2 B) Einfluss von Dextran auf die Organisation einer heterogenen anionischen 5 Komponenten-Modellmembran

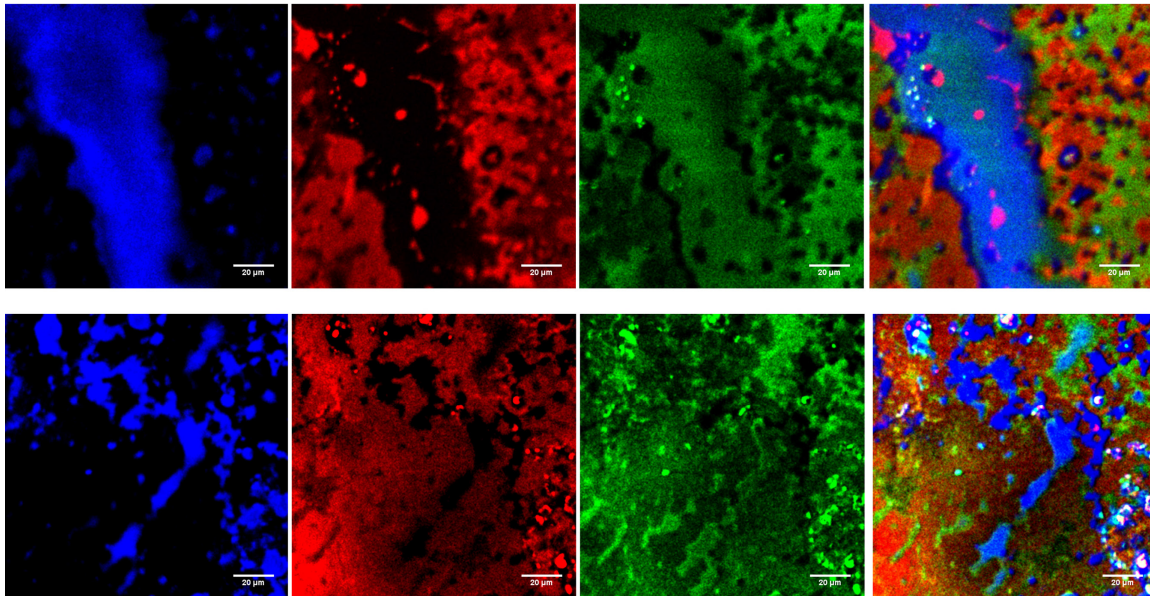


Abbildung 3-10: Glykan-kodierte Lipidphasenseparation. Die Abbildung zeigt die Fluoreszenzintensitätsverläufe der l_o - (grün) und l_d - (rot) Phase des 5 KS sowie des Dextran-Netzwerkes (blau) zweier ausgewählter Probenbereiche. Dabei ist zu beobachten, dass die l_d -Phase hauptsächlich in Bereichen geringer Dextran-Konzentration vorliegt, wohingegen die l_o -Phase nahezu komplett überall auftritt. Die Skala entspricht 20 μm .

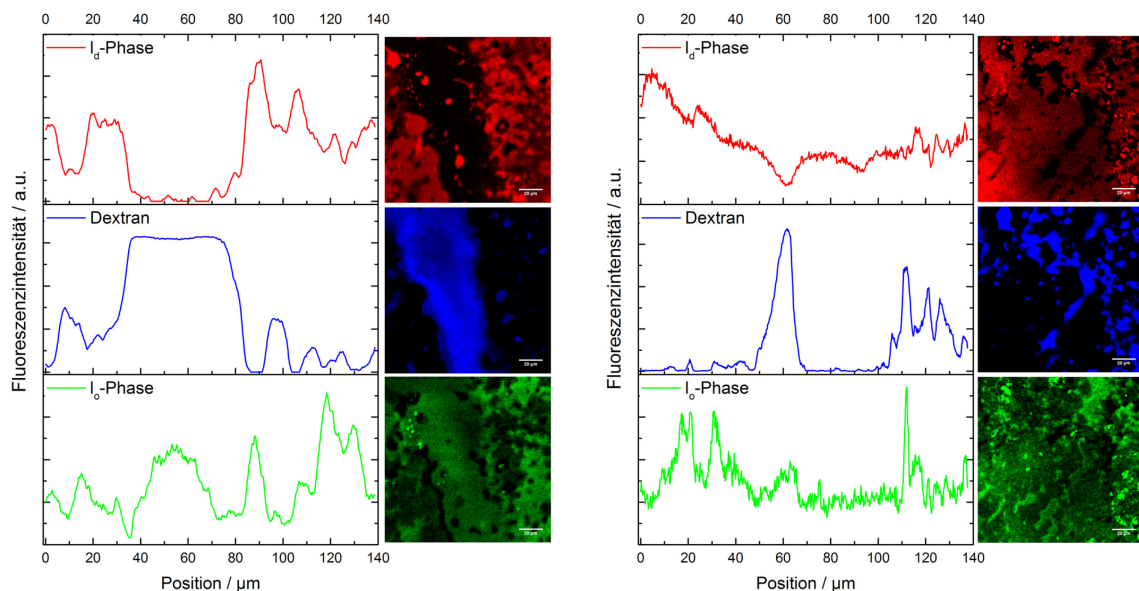


Abbildung 3-11: Fluoreszenzintensitätsverteilungen des Dextran-Netzwerkes und der l_o - sowie l_d -Phasen des 5 KS. Die Abbildung zeigt die Fluoreszenzintensitätsverläufe der l_o - (grün) und l_d - (rot) Phase sowie des Dextran-Netzwerkes (blau). Dabei ist sichtbar, dass Maxima im Intensitätsverlauf des Dextran-Netzwerkes mit Intensitätsminima des Kurvenverlaufs der l_d -Phase einhergehen. Die l_o -Phase hingegen weist Maxima sowohl von der l_d - als auch Dextran-Fluoreszenzintensität auf.

3.2 B) Einfluss von Dextran auf die Organisation einer heterogenen anionischen 5 Komponenten-Modellmembran

Die beobachteten Lipiddomänen erwiesen sich als zeitstabil und unterlagen keinerlei Veränderungen während des untersuchten Zeitraums von drei Stunden. Es waren weder Fluktuationsprozesse noch Bewegungen aufgrund der BROWN'schen Molekularbewegung der Domänen auszumachen, wodurch sich diese Lipidschichten in ihrer Dynamik deutlich von Lipidvesikeln und *solid-supported* Lipiddoppelschichten, wie sie in der AFM zum Einsatz kommen, unterscheiden.^[64,127-130] In Bereichen homogener Dextran-Netzwerke war eine Durchmischung und Aufhebung der Lipidphasenseparation zu beobachten (Abbildung 3-12). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch hier eine Phasenseparation resultierend aus Inhomogenitäten des Glykan-Netzwerkes vorlag, die jedoch unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops lag.

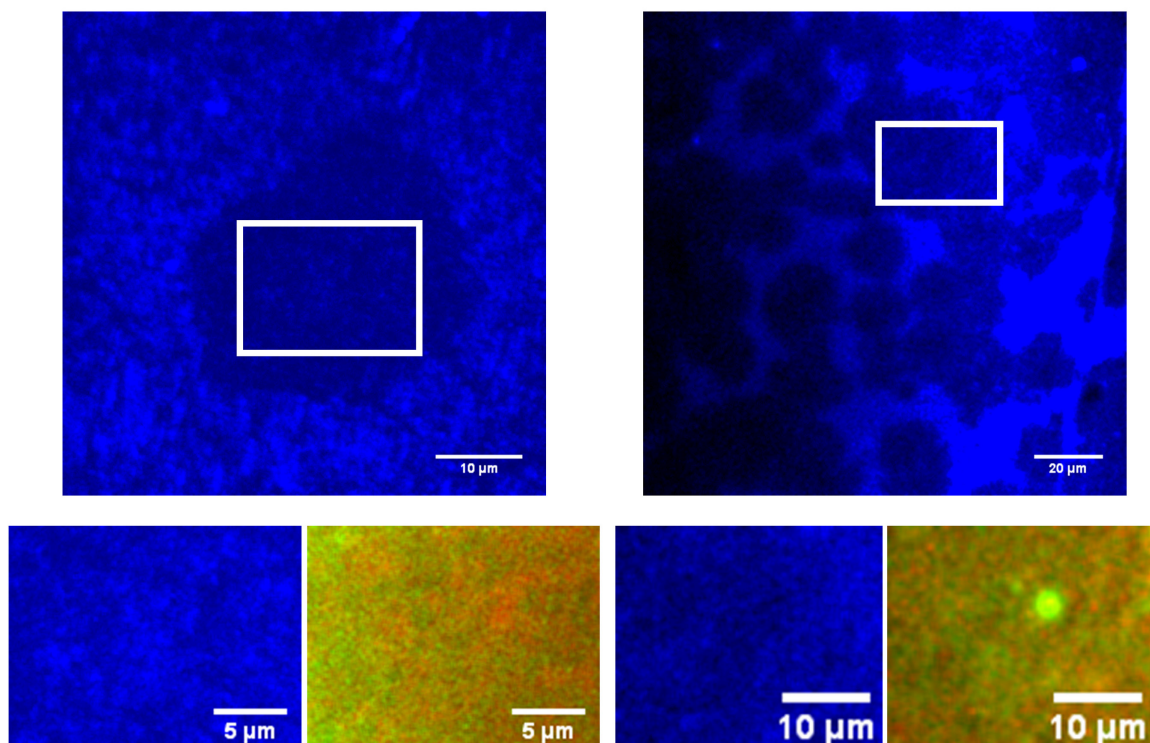


Abbildung 3-12: Homogene Lipidphasenverteilung des 5 KS auf homogenem Dextran-Netzwerk. Ausgewählte Aufnahmen, die eine aufgehobene Lipidphasenseparation des 5 KS (gelb) auf einer homogen verteilten Dextranschicht (blau) zeigen. Die weißen Rechtecke in den oberen Abbildungen markieren den ausgewählten Bereich, der in den unteren Abbildungen größer dargestellt ist. Des Weiteren zeigen die unteren jeweils rechten Abbildungen die aufgehobene Lipidphasenseparation.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.2 B) Einfluss von Dextran auf die Organisation einer heterogenen anionischen 5 Komponenten-Modellmembran

Ferner beschreiben SUBRAMANIAM *et al.* ein reversibles Schmelzen der Lipidphasen bei Temperaturerhöhung und eine damit einhergehende einheitliche Verteilung der beiden Lipidomänen auf den inhomogenen Glykan-Netzwerken.^[35] Dieses Verhalten konnte hier nicht beobachtet werden. Die Phasenseparation, welche durch das Glykan-Netzwerk vorgegeben war, blieb auch bei einer Temperaturerhöhung oberhalb von T_m erhalten (Abbildung 3-13). Eine Immobilisation der Lipidphasen auf Glas mittels „kinetic trapping“ beschrieben auch STOTTRUP *et al.*, was auf eine zu dünne Dextranschicht unterhalb der Lipidschicht schließen lässt.^[122] Da jedoch in Bereichen mit hoher Dextrandichte kaum Lipidphasen beobachtet werden konnten, muss die Verwendung eines anderen Deckglasmaterials oder der Einsatz einer Beschichtung geprüft werden.

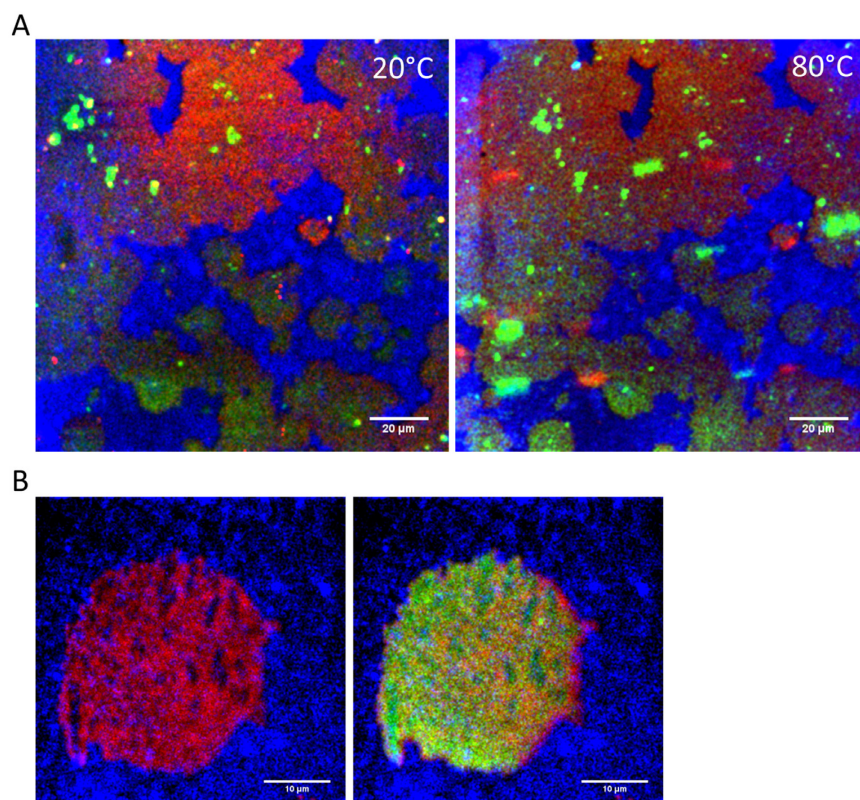


Abbildung 3-13: Temperaturabhängiges Phasenverhalten von Lipidschichten des 5 KS auf Dextran-Netzwerken. In (A) ist das Verhalten der Lipidschicht auf dem Dextran-Netzwerk großflächig bei 20 und 80 °C gezeigt. Hierbei sind keine signifikanten Unterschiede auszumachen. (B) zeigt eine durch das Glykan-Netzwerk phasenseparierte Lipidschicht bei 75 °C, bei der es zu keiner Aufhebung der Phasenseparation in Bereichen hoher Dextrankonzentration trotz Temperaturerhöhung gekommen ist. Die Skala entspricht 20 µm in (A) und 10 µm in (B). Die verwendeten Membran-Fluorophore waren NBD-DHPE (grün; l_o-Phase) und N-Rh-DHPE (rot; l_a-Phase). Zur Visualisierung der Glykanschicht wurde Dextran ATTO Fluor™ 647 (blau) eingesetzt.

3.2 B) Einfluss von Dextran auf die Organisation einer heterogenen anionischen 5
Komponenten-Modellmembran**3.2.7 Zusammenfassung**

Wie hier gezeigt, kann der Einfluss von Glykanen die Diskrepanz zwischen früheren Beobachtungen von Modelllipidmembranen, die keine Glykane enthielten, und den verschiedenen Beobachtungen von Domänen oder deren Fehlen in Plasmamembranen erklären. Plasmamembranen von Säugetierzellen, bei denen Nanodomänen vermutet werden^[131,132], sind von einer gelartigen extrazellulären Matrix^[119] oder Glykan-Beschichtungen^[117] umgeben. Ein Fehlen dieser makroskopischen Phasentrennung der Membranen entspricht dem Verhalten von Lipidmembranen in Kontakt mit homogenen Glykan-Netzwerken, wohingegen Lipiddomänen in der Nähe von inhomogenen Glykan-Netzwerken große stabile *raft*-Strukturen ausbilden.^[133,134] Glykane initiieren die Phasentrennung von Membranen entweder durch Stabilisierung der geordneten Lipidphasen oder durch Verringerung der Linienspannung zwischen koexistierenden Lipidphasen.^[35] Durch die Verwendung eines anderen Deckglasmaterials oder einer geeigneten hydrophileren Beschichtung könnte das „*kinetic trapping*“ aufgehoben werden und Temperatur-induzierte Phasenvermischungen erreicht werden.^[35,122] Dies ist auch essentiell für geplante druckabhängige Untersuchungen, bei der ein geeignetes Fenstermaterial gefunden werden muss.

3.2 C) Einfluss eines wässrigen Zweiphasensystems auf die Organisation und das thermotrope Verhalten einer heterogenen, anionischen Modellmembran

3.2.8 Wässrige Zweiphasensysteme

Wässrige Zweiphasensysteme (ATPS: *aqueous two phase system*) wurden 1896 durch BEIJERINCK zufällig bei der Mischung von Stärke und Gelatine entdeckt. Allerdings entdeckte erst ALBERTSSON die eigentlichen Anwendungsmöglichkeiten von ATPS, woraufhin diese für viele Anwendungen eingesetzt wurden.^[135–138] Neben der einfachen Herstellung der ATPS, wobei zwei Substanzen lediglich zusammen in Wasser gelöst werden müssen, weisen sie noch viele weitere Vorteile gegenüber konventionellen Extraktionsmöglichkeiten, wie geringe Kosten, Umweltfreundlichkeit und eine gute Effizienz für viele verschiedene Experimente, unter anderem vor allem für die Konzentration und Aufreinigung von Biomolekülen, auf.^[136,137,139,140] Im Allgemeinen wird zwischen zwei Arten von ATPS differenziert, einer Polymer-Polymer-Mischung (z.B. PEG und Dextran) oder einer Polymer-Salz-Mischung (z.B. PEG/Phosphat).^[135] In biologischen Anwendungen weist die Polymer-Salz-Mischung jedoch den Nachteil auf, dass sie mit einer hohen Ionenstärke einhergeht.^[141] Daher wird in dieser Arbeit auf erstere Mischungsart zurückgegriffen und eine PEG/Dextran-Mischung verwendet. Dabei trennen sich die Polymer-Polymer-Systeme aufgrund sterischer Exklusionseffekten in zwei Phasen auf. Dasselbe gilt für Polymer-Salz-Gemische, wobei hier jedoch die Exklusion aus einer starken Wasserbindung der Salze resultiert.^[140,142] Die Phasentrennung von ATPS wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, unter anderem durch die Konzentration und das Molekulargewicht des Polymers sowie die Konzentration und die Zusammensetzung des Salzes.^[143,144] Je größer das Molekulargewicht des Polymers ist, desto geringer sollte die Konzentration gewählt werden, damit eine Phasenbildung erreicht werden kann. Auch ist es von Vorteil, zwei Polymere mit ähnlichem Molekulargewicht zu wählen, da dies die Phasenbildung begünstigt. Im Allgemeinen wirken drei Kräfte, die Gravitation, die Flotation und die Reibung während der Phasentrennung auf einen Tropfen. Das Gleichgewicht zwischen diesen Kräften bestimmt seine Bewegung. Die Gravitationskraft hängt von der Masse des Tropfens ab, während die Flotations- und Reibungskräfte von den Fließeigenschaften der Phasen abhängen.^[140,145] Die Oberflächeneigenschaften der als ATPS verwendeten Substrate bestimmen die Verteilung beider Phasen, deren Verständnis große Fortschritte im kommerziellen Einsatz von

3.2 C) Einfluss eines wässrigen Zweiphasensystems auf die Organisation und das thermotrope Verhalten einer heterogenen, anionischen Modellmembran

ATPS bietet.^[146] Jedes ATPS weist ein fingerabdruckähnliches Phasenverhalten unter bestimmten Bedingungen, wie Temperatur und pH-Wert, auf, welches in einem Phasendiagramm sichtbar gemacht werden kann, um die bestmöglichen Arbeitsbedingungen eines ATPS anzuzeigen. Das Phasendiagramm wird von einer binodalen (Koexistenz-) Kurve in den Bereich, in welchem die beiden Substrate sich nicht vermischen und einem Bereich der Mischbarkeit getrennt. Letzterer befindet sich dabei unterhalb der binodalen Kurve.^[139,147] Der Kurvenverlauf kann unter anderem mittels Trübungspunktbestimmungsmethode ermittelt werden.^[139,147]

Da die natürlichen Zellen ein extrem gefüllter Raum sind, bieten wässrige ATPS eine gewisse Simulation des *makromolekularen crowdings* in riesigen, unilamellaren Vesikeln^[135,148], welche als biomimetische Zellmodelle und repräsentativ zur Untersuchung von natürlichen Zellen herangezogen werden.^[59–61,148] Jedoch weisen diese naturähnlichen Vesikel keinerlei Interaktion mit verschiedenen Makromolekülen, wie Nukleinsäuren, Polysacchariden oder Proteinen auf der zytosolischen Membranseite, auf, welche in einer makromolekularen Kondensation sowie durch hydrophobe und *excluded volume*-Effekte ausgelösten Phasenseparierung resultieren.^[44,148–151] Dabei wird vor allem die Mikrokompartimentierung als sehr bedeutend für die Zellfunktion angenommen.^[152,153] Ein gut charakterisiertes System, welches schon öfter zur Nachahmung phasenseparierter und makromolekular kondensierter Zustände verwendet wurde, ist das PEG-Dextran-System.^[44,135,148,152,154–158] Die Separation dieses Systems wird durch Aggregation und daraus resultierender sterischer Exklusion begründet.^[140,142] Eine umfassende theoretische Beschreibung der Separation von ATPS ist trotz intensiver Forschung aktuell noch nicht möglich und die Vorhersage des Verhaltens unterschiedlicher Modelle beruht meist auf einer Kombination diverser Theorien.^[146,159–164]

3.2.9 Fluoreszenzmikroskopie

Die GUVs wurden nach dem vorgeschlagenen Protokoll von KEATING *et al.*^[165] in einer Polymer-Polymer-Lösung bei einer Temperatur von 75 °C hergestellt. Das ATPS wurde zu 11,5:8 Gew.-% PEG/Dextran angesetzt und anschließend durch Zugabe von PEG, Dextran oder Wasser so eingestellt, dass es bei 75 °C einphasig vorlag und sich bei Raumtemperatur wieder ein Zweiphasensystem ausbildete.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.2 C) Einfluss eines wässrigen Zweiphasensystems auf die Organisation und das thermotrope Verhalten einer heterogenen, anionischen Modellmembran

Nach erfolgter Vesikelpräparation wurden die Vesikel in ein PEG-reiches Medium überführt, wodurch die Dextran-Konzentration im Vesikelinneren höher als in der Umgebung ist und sich so nach Phasenseparation Bereiche mit hoher Dextran-Konzentration im Vesikelinneren ausbildeten. Dies resultiert allerdings auch in Schwankungen der SBA-ALEXA-Fluoreszenzintensität je nach betrachtetem Bereich der Probe, wobei hohe Intensitäten Bereichen mit hoher Dextrankonzentration entsprechen. Die folgende Abbildung 3-14 zeigt exemplarisch den Einfluss der PEG/Dextran-Phasenseparation auf ausgewählte Vesikel des 5 KS. Rote Fluoreszenz entspricht dabei der l_d -Phase, grüne der l_o -Phase und blaue Dextran-reichen Gebieten.^[157] Zusätzlich zu den drei übereinandergelegten Kanälen ist noch der blaue Kanal des Dextrans explizit dargestellt.

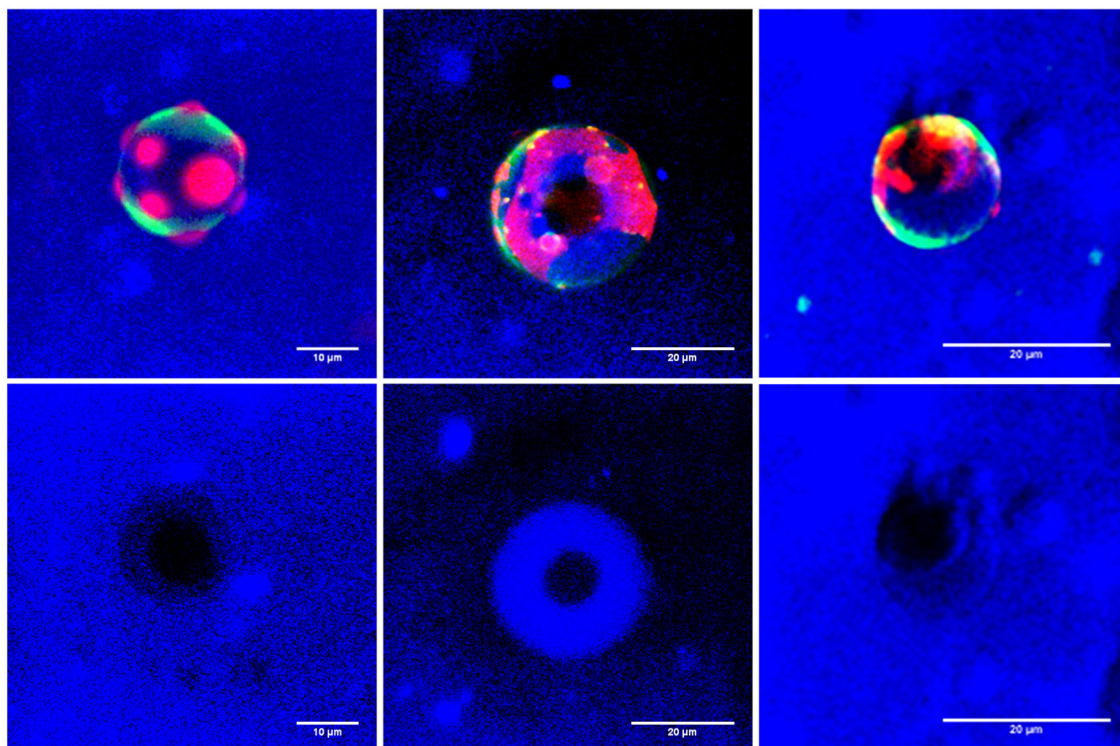


Abbildung 3-14: Einfluss des zweiphasigen PEG/Dextran-Systems auf GUVs aus dem 5 KS. Ausgewählte Bilder, die den Einfluss der Phasenseparation des gewählten ATPS auf GUVs des anionischen 5 KS veranschaulichen. In der oberen Reihe sind die l_o - (grün), l_d - (rot) Phase sowie die Dextran-Umgebung (blau) zu erkennen, wohingegen in den Abbildungen der unteren Reihe lediglich die zugehörige Dextran-Verteilung gezeigt ist. Dabei sind innerhalb der Vesikel Bereiche mit hoher und niedriger Dextran-Konzentration auszumachen. Die Skala entspricht 10 μm (links) und 20 μm (Mitte und rechts).

3.2 C) Einfluss eines wässrigen Zweiphasensystems auf die Organisation und das thermotrope Verhalten einer heterogenen, anionischen Modellmembran

Dabei sind sowohl die Vesikel als auch das ATPS eindeutig phasensepariert. Letzteres zeichnet sich hierbei durch verschieden starke Fluoreszenzintensitäten innerhalb der Vesikel aus. Bereiche hoher Intensität sind dabei mit viel Dextran angereichert, welches besonders gut in der mittleren Abbildung zu erkennen ist. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Intensitäten dieser Bereiche noch explizit ausgewertet und in Abbildung 3-15 aufgetragen.

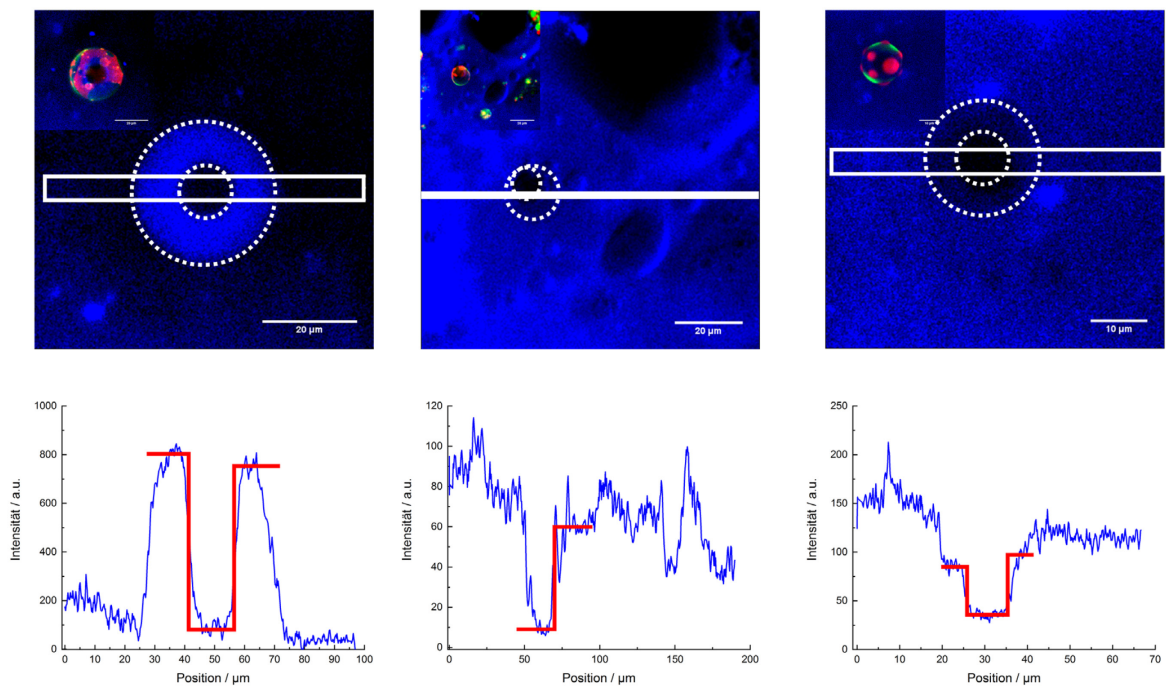


Abbildung 3-15: Dextran-Verteilung innerhalb ausgewählter GUVs. Auswertung der Dextran-Verteilung ausgewählter GUVs des 5 KS. Die Aufnahmen der oberen Reihe zeigen die Verteilung des SBA-ALEXA-647 markierten Dextrans innerhalb der Probe und Vesikel. Die Diagramme in der unteren Reihe zeigen die Intensitätsverläufe im ausgewerteten weiß markierten Bereich. Die gestrichelten Linien in der oberen Reihe dienen zur besseren Visualisierung der Bereiche mit hoher und niedriger Dextran-Konzentration, wohingegen die roten Linien die Dextran-Verteilungen innerhalb der Vesikel in den Intensitätsauftragungen veranschaulichen. Die Skala entspricht 10 µm (rechts) und 20 µm (Mitte und links).

Der ausgewertete und gemittelte Bereich der einzelnen Bilder ist durch ein weißes Kästchen markiert und zur besseren Visualisierung sind die Bereiche hoher und niedriger Dextran-Konzentration mittels gestrichelter Linien voneinander abgetrennt. Die Intensitätsauswertung der Kurven zeigt eindeutig Bereiche mit hoher und niedriger Dextran-Konzentration innerhalb der drei ausgewählten Vesikel. Das erste Vesikel, welches sich in

3 Ergebnisse und Diskussion

3.2 C) Einfluss eines wässrigen Zweiphasensystems auf die Organisation und das thermotrope Verhalten einer heterogenen, anionischen Modellmembran

Dextran-armer Umgebung befindet, weist bei einer Position von etwa 25 μm einen sprunghaften Anstieg der ALEXA-Fluoreszenzintensität auf, die zwischen 40 und 60 μm wieder abfällt und dann anschließend wieder ansteigt. Die intravesikuläre Dextran-Konzentration ist in direkter Membrannähe am höchsten und sinkt zum Zentrum des Vesikels. Ähnliches ist auch für das letzte Vesikel in der Reihe zu sehen, welches sich jedoch in einer Dextranreichen Umgebung befindet. Auch hier nimmt die Intensität des ALEXA 647 bei Annäherung an das Zentrum des Vesikels immer weiter ab. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität geschieht hierbei über Zwischenstufen, die das Dextran innerhalb des GUVs an der Membran repräsentiert. Auch das mittlere GUV befindet sich in einer Dextran-reichen Umgebung. Bei diesem Vesikel ist das Dextran jedoch nicht vollständig um das PEG innerhalb des Vesikels verteilt, daher ist hier nur eine Stufe zu erkennen. Durch diese Ergebnisse ist der erfolgreiche Einbau des ATPS in die GUVs des 5 KS eindeutig gezeigt. Allerdings sollte hierbei auch darauf hingewiesen werden, dass nicht alle Vesikel beide Phasen des ATPS intravesikulär aufwiesen.

Die hier erhaltenen Ergebnisse stimmen gut mit dem von KEATING *et al.* publizierten Separationsverhalten des PEG/Dextran-ATPS in deutlich einfacheren Membransystemen überein. KEATING *et al.* beschreiben ebenfalls die intravesikuläre Benetzung der Membranninnenseiten sowie die Ausknospung separierter Phasen, aus denen sich multivesikuläre aggregierte Strukturen ausbilden.^[148,155,157] Die Anreicherung der Dextran-reichen Phase an der Membranninnenseite ist auf unspezifische Interaktionen zwischen dem Polymer und den zum Teil anionisch geladenen Lipidkopfgruppen zurückzuführen. Dies wurde ebenfalls für homogene Membransysteme beschrieben.^[44,148,154,166] Aufgrund der höheren Fluidität und Flexibilität der l_d -Phase konnte in heterogenen Membransystemen eine Vorliebe der Dextran-reichen Phasen für l_d -Domänen gezeigt werden, da diese durch ihre im Vergleich zur l_o -Phase geringere Rigidität eher eine Umschließung und damit einhergehende Membrankrümmung toleriert.^[157,167] Jedoch wurde auch schon gezeigt, dass das auch hier eingesetzte Dextran mit einem Molekulargewicht von 10 kDa die intravesikuläre Membranseite vollständig benetzt.^[155] Aufgrund der erhöhten Membrankrümmung konnten, auch in der hier durchgeführten Studie, Ausstülpungen beobachtet werden (Abbildung 3-16). Dabei war auffällig, dass diese vor allem in Bereichen mit einer hohen extravasikulären Dextran-

3.2 C) Einfluss eines wässrigen Zweiphasensystems auf die Organisation und das thermotrope Verhalten einer heterogenen, anionischen Modellmembran

Konzentration auftraten. GUVs mit geringer extravesikulärer Dextran-Konzentration (Abbildung 3-14, Mitte) hingegen wiesen keinerlei Ausstülpungen auf. Somit kann geschlossen werden, dass Konzentrationsunterschiede des Dextrans zwischen Membraninnen- und Außenseite aufgrund osmotischer Druckunterschiede sowie die Deflation der GUVs Ausknospungen der l_d -Phase durch Entstehung von Membranüberschussfläche fördern.^[166,167] Die Ausbildung von Ausstülpungen bewirkt eine Reduktion der Grenzflächenenergie zwischen den beiden Phasen des ATPS und die Bildung eines energetisch günstigeren, quasi-sphärischen GUVs.^[167]

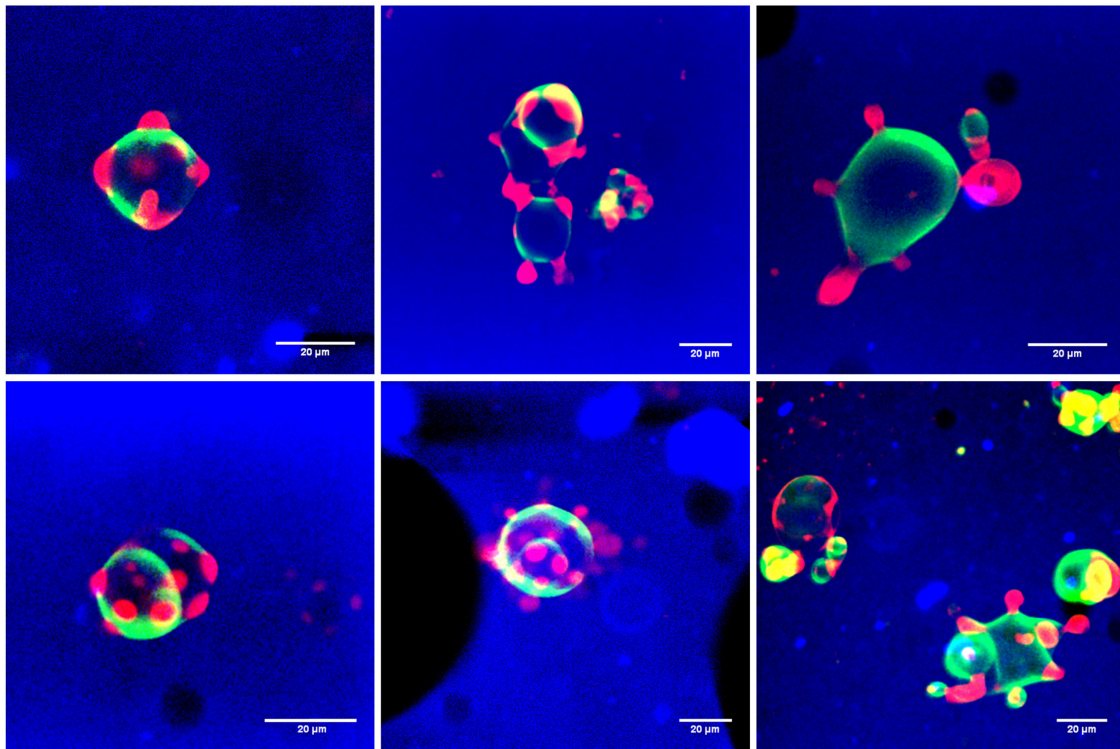


Abbildung 3-16: Beobachtete Ausstülpungen der l_d -Phase in Dextran-reicher Umgebung. Ausgewählte Mikroskopie-Aufnahmen, die die Bildung von Ausstülpungen aus GUVs des 5 KS in Dextran-reichen Umgebungen zeigen. Die Skala entspricht 20 μm . Die verwendeten Membran-Fluorophore waren NBD-DHPE (grün; l_o -Phase) und *N*-Rh-DHPE (rot; l_d -Phase). Zur Visualisierung des Dextrans wurde SBA-ALEXA-647 markiertes Dextran (blau) eingesetzt.

3.2.10 Zusammenfassung

Ein erfolgreicher Einschluss des wässrigen ATPS in komplexe GUVs des anionischen heterogenen fünf Komponenten-raft Systems sowie die Ausbildung von phasenseparierten Bereichen des ATPS konnten in dieser Studie durch die Verwendung des Fluorophors SBA-ALEXA 647, welcher Dextran-reiche Bereiche markiert, gezeigt werden.^[157] Innerhalb der GUVs waren eindeutig Bereiche hoher und niedriger Dextran-Konzentration zu erkennen, wie schon durch KEATING *et al.* in diversen Studien mit einfacheren Membransystemen berichtet wurde.^[148,152,154,155,157] Hierbei war eine Benetzung der Membranınnenseite vor allem durch die Dextran-reiche Phase des ATPS zu beobachten (schematisch dargestellt in Abbildung 3-17). In Bereichen mit einer höheren extravesikulären Dextran-Konzentration kam es zu mehrfachen Ausstülpungen der Ia-Domänen der GUVs, ausgehend von dem Konzentrationsunterschied, der osmotisch getriebenen Deflation der Vesikel und der damit einhergehenden Reduzierung der Grenzflächenenergie zwischen beiden Polymeren des ATPS.^[167] Der daraus resultierende energetisch günstigere, quasi-sphärische Vesikelkörper bestand fast ausschließlich aus geordneten, rigideren Phasen, da sich durch unspezifische Membran-Polymer-Wechselwirkungen die einzelnen Lipide neu sortieren.^[87-89]

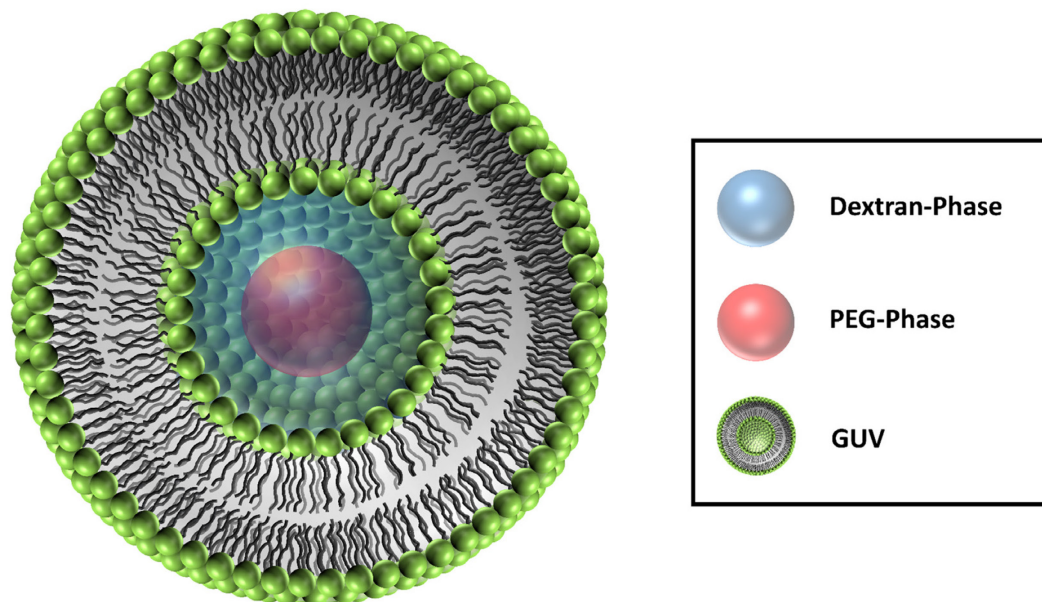


Abbildung 3-17: Schematische Darstellung der Benetzung der intravesikulären Membranseite durch ein ATPS aus Dextran und PEG bestehend.

3.3 Einfluss verschiedener Osmolyte auf Lipidmodellmembranen

Die hier präsentierten Ergebnisse stammen aus einem Kooperationsprojekt mit der Firma bitop AG und wurden in *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 178 (2019), 404-411 publiziert.

3.3.1 Osmolyte und Extremolyte

Osmolyte sind meist kleine organische Moleküle, die den nativen Zustand von Biomolekülen stabilisieren und das osmotische Gleichgewicht innerhalb einer Zelle aufrechterhalten. Natürliche Osmolyt-Verbindungen, die von extremophilen Mikroorganismen unter extremen Situationen synthetisiert werden, werden im Allgemeinen als Extremolyte bezeichnet. Chemisch gesehen handelt es sich dabei um organische Osmolyte, d.h. osmotisch-aktive Substanzen, die aus Aminosäuren, Betain, Zucker oder aus Heterosid-Derivaten aufgebaut sind.^[168] Durch die Präsenz dieser Verbindungen wird es Organismen ermöglicht, unter extremen Bedingungen, wie drastischen Temperaturveränderungen oder hohen Salzkonzentration, zu überleben.^[168,169] Da diese Stoffe biologisch inert sind und in hohen Konzentrationen im Zytoplasma akkumulieren ohne die zellulären Funktionen zu beeinträchtigen, werden sie auch als *compatible solutes* bezeichnet.^[170]

3.3.2 Ectoin, Hydroxyectoin und β -Hydroxybutyrat

Ectoin und Hydroxyectoin, beides zyklische Tetrahydropyrimidine, sind lang bekannte (Entdeckung 1985^[171] bzw. 1988^[172]) *compatible solutes*, die in anaeroben chemoheterotrophen und halophilen bzw. halotoleranten Bakterien (erste Entdeckung in *Ectothiorhodospira halochloris* sowie *Streptomyces parvulus*) nachgewiesen worden sind^[170-173] und sich durch ihr geringes Molekulargewicht sowie eine starke Wasserbindung und -löslichkeit auszeichnen.^[174-176] Durch eine gesteigerte Ectoin-Produktion und -Einlagerung in den Zellen schützen die Organismen ihre Biopolymere, wie u.a. Biomembranen, Proteine, Enzyme und Nukleinsäuren, vor Austrocknung.^[169] Sowohl Ectoin als auch Hydroxyectoin verhalten sich amphoter, sind zwitterionisch und weisen eine hohe Affinität zur Wasserbindung auf.^[173] Der vermutete Schutzmechanismus beider Moleküle beruht auf dem *Exclusion-Modell*. Dabei sind die gelösten Stoffe aufgrund ungünstiger Wechselwirkungen mit der z.B. Polymeroberfläche von der unmittelbaren Hydratationsschicht ausgeschlossen. Dadurch wird die native Konformation des Polymers stabilisiert, da es bevorzugt hydratisiert wird. Eine Beeinflussung der generellen Eigenschaften und Funktionen des Polymers erfolgt nicht, da Ectoin und Hydroxyectoin als *compatible solutes* nicht direkt mit der Po-

3 Ergebnisse und Diskussion

3.3 Einfluss verschiedener Osmolyte auf Lipidmodellmembranen

lymeroberfläche interagieren.^[177,178] Aus diesem Grund setzen halophile Organismen Ectoin als Schutz ihrer zytoplasmatischen Biomoleküle gegen Trockenheit, Hitze, Einfrieren und osmotischen Stress ein.^[179] Aufgrund dieser Eigenschaften haben Ectoin und Hydroxyectoin andere hygroskopische Substanzen, wie z.B. Harnstoff, aus Hautpflegeprodukten verdrängt, in welchen sie zum Schutz der Hautzellen eingesetzt werden.^[169,180]

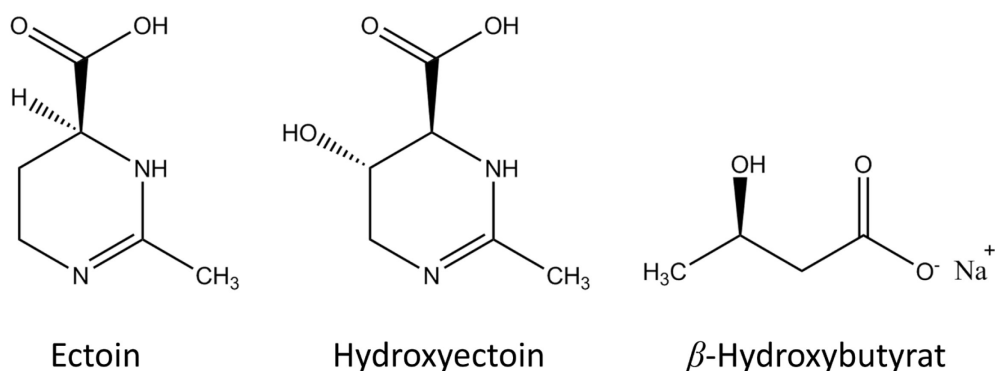


Abbildung 3-18: Chemische Struktur der untersuchten Osmolyte Ectoin, Hydroxyectoin und β -Hydroxybutyrat.

β -Hydroxybutyrat ist ein wichtiger Ketonkörper, der vom menschlichen Organismus in der Leber aus Fettsäuren während des katabolen Stoffwechsels, also Hungerphasen oder kohlenhydratarmer Ernährung, gebildet wird und während dieser Hungerzeiten als Energielieferant dient.^[181,182] Des Weiteren wurde eine Anreicherung des β -Hydroxybutyrats in Zellen vom *Photobacterium profundum*, die unter hohen hydrostatischen Drücken herangewachsen waren, gefunden. Ebenso konnte ein gewisser Schutz gegen Hitzedenaturierung, oxidative Schäden und Aggregationen von Proteinen nachgewiesen werden.^[183–185]

Aktueller Forschungsstand

Bisher wurden schon die Auswirkungen von Ectoin auf Lipidmonoschichten mittels Fluoreszenzmikroskopie, Langmuir-Filmbalance-Messungen und Infrarot-Reflektions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS)^[186–188] und auf Lipiddoppelschichten mittels DSC und Rasterkraftmikroskopie-Messungen untersucht^[186,187]. Einige wenige weiterreichende *in-vivo* Studien wurden auch an Erythrozyten durchgeführt. Dabei wurde eine Schutzwirkung des Ectoins gegen die durch Natriumdodecylsulfat initiierte Lyse gezeigt.^[169] Die Fluoreszenzmikroskopie von DPPC-Monoschichten zeigte bei niedrigen Oberflächendrücken (5 – 7 mNm⁻¹), dass durch Ectoin-Zugabe ein Schrumpfen der L_c-Domänen sowie ein Verlust

ihrer in Wasser auftretenden typischen Bohnenform verursacht wird.^[186,188] Monoschichten bei Oberflächendrücken oberhalb von 30 mN m^{-1} und Doppelschichten generell scheinen nur geringfügig von Ectoin beeinflusst zu werden.^[186] Messungen der Oberflächenaktivität von verschiedenen Lipid-Monoschichten zeigten in Gegenwart von Ectoin eine Ausdehnung der Druckflächenisotherme, was ein Hinweis auf eine Vergrößerung der Lipidkopfgruppenfläche ist.^[187,189] Die Anwesenheit von Ectoin und Hydroxyectoin führte in IRRA-Spektren zu einer Abnahme der Wellenzahl der $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ Schwingungsbande bei hohen Oberflächendrücken. Dies kann durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen des Sauerstoffatoms mit der PO_2^- -Gruppe erklärt werden. Durch die zusätzliche Hydroxylgruppe wies das Hydroxyectoin einen signifikant ausgeprägteren Effekt im Vergleich zum Ectoin auf, der auf einen direkten Interaktionsmechanismus schließen lässt.^[189] Darauf basierend wurde ein *Exclusion*-Modell vorgeschlagen, wobei die kompatiblen Solute an der Lipid-Monoschichtoberfläche zu einer Expansion und Fluidisierung der Lipide führten und Ectoin-Wasser-Komplexe formten, die in einer Zunahme der hydrophilen Wechselwirkungen an der Lipidmembranoberfläche resultieren.^[186] Dieses *Exclusion*-Modell steht in sehr guter Übereinstimmung mit Ergebnissen für Lipid-Monoschichten und bei geringen Konzentrationen der Osmolyten, während bei höheren Konzentrationen, neben dem *Exclusion*-Modell noch direkte Interaktionen zwischen den Osmolyten und der Lipid-Kopfgruppe stattfinden können.^[189]

3.3.3 Fluoreszenzspektroskopie

Dieser Abschnitt fasst die Ergebnisse der temperatur- und druckabhängigen Fluoreszenzspektroskopie-Messungen zusammen. Es wurden MLVs aus DPPC allein und in Gegenwart von 1 M Ectoin, 1 M Hydroxyectoin und 1 M Hydroxybutyrat mit LAURDAN als Fluorophor vermessen. In Abbildung 3-19 sind die erhaltenen *GP*-Werte gegen die Temperatur (A) und gegen den Druck (B) aufgetragen. Der *GP*-Wert gibt Auskunft über den Phasenstatus und die Fluidität der Lipiddoppelschicht. Für reines DPPC nimmt der *GP*-Wert im gemessenen Temperaturbereich von 25-50 °C von etwa 0,55 bei 25 °C auf ca. -0,1 bei 50 °C ab. Dies entspricht dem Phasenübergang von der dicht gepackten, geordneten Gelphase bei niedrigen Temperaturen in die flüssig-kristalline Phase bei höheren Temperaturen. Die Hauptphasenübergangstemperatur konnte mit $41,05 \pm 0,36 \text{ °C}$ ermittelt werden und ist damit in guter Übereinstimmung mit der Literatur.^[190] Im Vergleich mit dem reinen

3 Ergebnisse und Diskussion

3.3 Einfluss verschiedener Osmolyte auf Lipidmodellmembranen

DPPC-Puffer-System ist in Gegenwart von 1 M Ectoin und 1 M Hydroxyectoin der Hauptphasenübergang leicht zu höheren Temperaturen verschoben, wogegen 1 M β -Hydroxybutyrat einen signifikanteren Effekt aufweist.

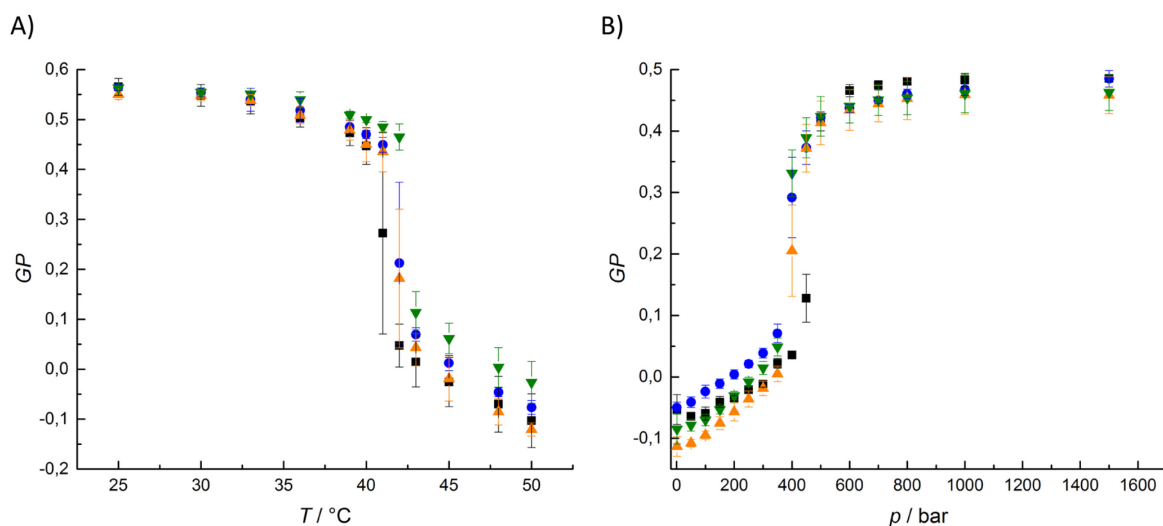


Abbildung 3-19: Druck- und temperaturabhängige Untersuchung des Einflusses der Osmolyte auf DPPC-Vesikel. Temperatur- (A) und druckabhängige (B) LAURDAN-GP-Werte von DPPC in reinem 50 mM Phosphat-Puffer (pH 7,4) (schwarz) und einem Zusatz von 1 M Ectoin (blau), 1 M Hydroxyectoin (orange) und 1 M β -Hydroxybutyrat (grün).

Daraus kann auf eine stabilisierende Wirkung des Ectoins, Hydroxyectoins und β -Hydroxybutyrats auf die geordnete Gelphase geschlossen werden, wobei letzteres den wohl größten Effekt aufweist. Der analoge Effekt wurde bei den druckabhängigen Messungen bei 50 °C sichtbar (Abbildung 3-19B). Alle Osmolyte induzieren einen um etwa 50 – 75 bar geringeren Hauptphasenübergangsdruck von der flüssig-kristallinen Phase zur geordneten Gelphase im Vergleich zum reinen DPPC-Puffer-System. Zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse zeigt Abbildung 3-20 die aus den Kurven erhaltenen Hauptübergangstemperaturen (bei 1 bar) und -drücken (bei 50 °C) für die jeweiligen Proben mit und ohne Osmolyten.

3.3 Einfluss verschiedener Osmolyte auf Lipidmodellmembranen

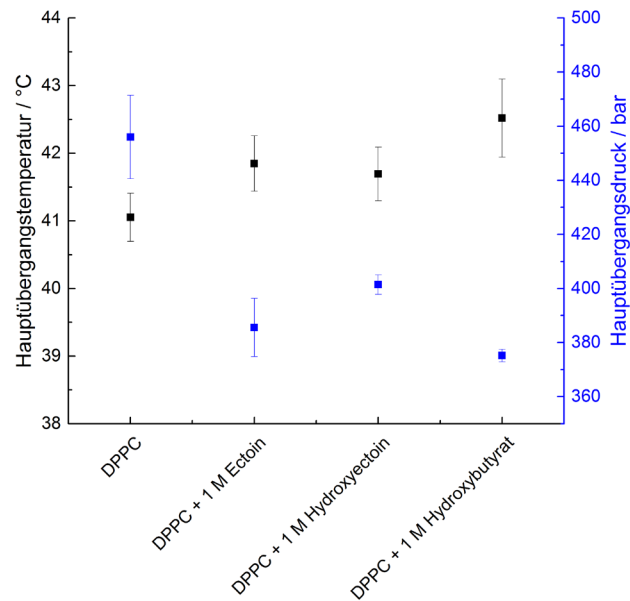


Abbildung 3-20: Fluoreszenzspektroskopisch ermittelte Hauptübergangstemperaturen sowie -Drücke für DPPC unter Einfluss der verschiedenen Osmolyte. Auftragung der fluoreszenzspektroskopisch ermittelten Hauptübergangstemperatur bei einem 1 bar und des Hauptübergangsdrucks bei 50 °C für DPPC-Lipiddoppelschichten in reinem 50 mM Phosphat-Puffer (pH 7,4) und einem Zusatz von 1 M Ectoin, 1 M Hydroxyectoin und 1 M β -Hydroxybutyrat.

3.3.4 DSC- und PPC-Messungen

Zur weiteren Untersuchung der MLVs in Ab- und Anwesenheit der drei Osmolyten wurden DSC- und PPC- Messungen im Temperaturbereich von 25-55 °C vorgenommen (Abbildung 3-21 und Abbildung 3-22). In Vergleich zu den DPPC-Vesikeln im reinen Puffer wird der Hauptphasenübergang nur geringfügig durch Ectoin und Hydroxyectoin beeinflusst, wohingegen β -Hydroxybutyrat eine Verschiebung der Übergangstemperatur von etwa 1 °C bewirkt. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung zu den fluoreszenzspektroskopischen Erkenntnissen. Der L_{β} -zu- P_{β} - (Gel-zu-Gel) Vorübergang hingegen wird wesentlich stärker von den Extremolyten beeinflusst. Dabei kommt es nicht nur zu einer Verschiebung der Vorübergangstemperatur, sondern auch zu einer Verbreiterung des Peaks in den jeweiligen Thermogrammen. Dies wurde unter anderem auch schon bei HARISHCHANDRA *et al.* (2019) beschrieben.^[186]

3 Ergebnisse und Diskussion

3.3 Einfluss verschiedener Osmolyte auf Lipidmodellmembranen

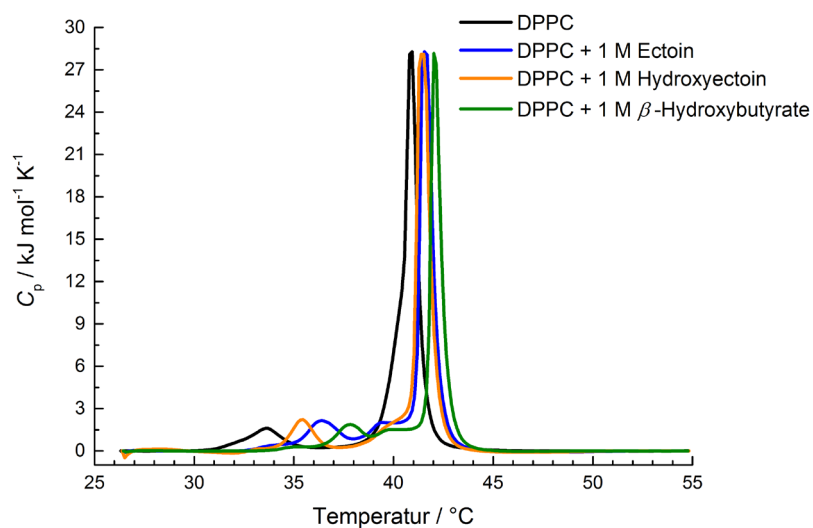


Abbildung 3-21: DSC-Thermogramme von DPPC mit den verschiedenen Osmolyten. DSC-Thermogramme von DPPC in reinem 50 mM Phosphat-Puffer (pH 7,4) (schwarz) und einem Zusatz von 1 M Ectoin (blau), 1 M Hydroxyectoin (orange) und 1 M β -Hydroxybutyrat (grün).

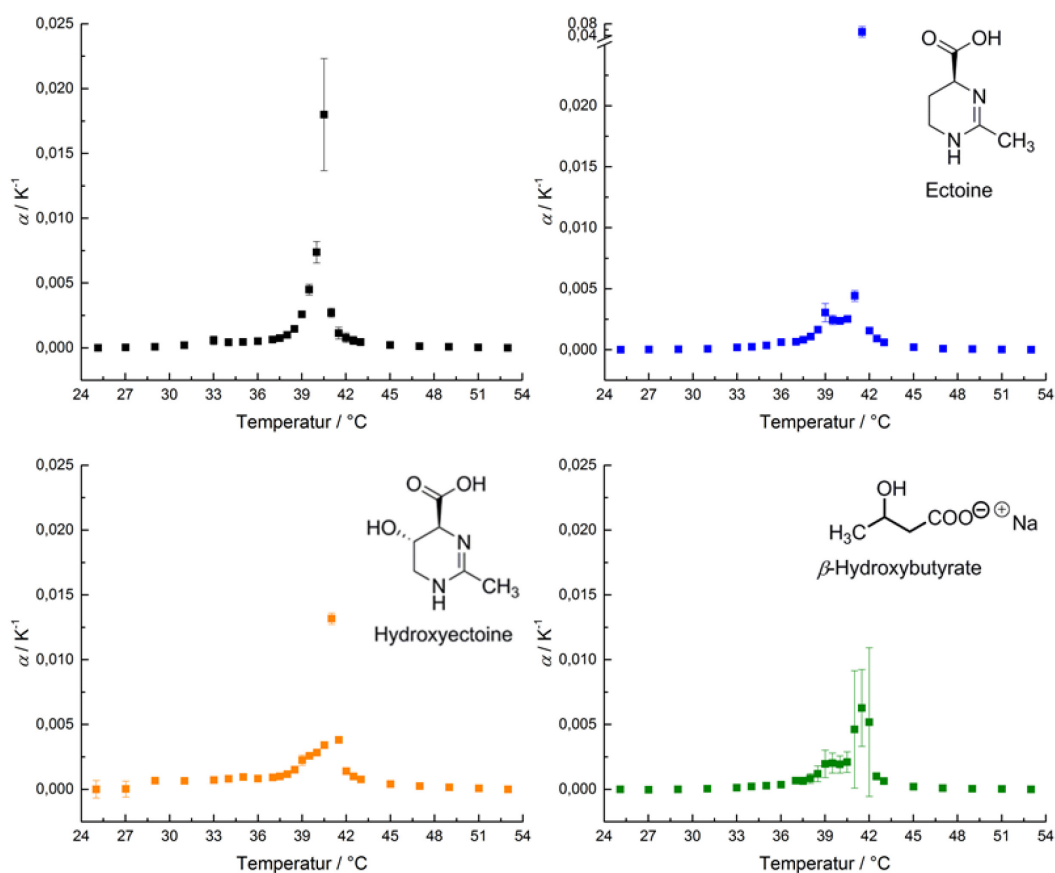


Abbildung 3-22: PPC-Thermogramme von DPPC mit den verschiedenen Osmolyten. Erhaltene PPC-Daten für DPPC in reinem 50 mM Phosphat-Puffer (pH 7,4) (schwarz) und einem Zusatz von 1 M Ectoin (blau), 1 M Hydroxyectoin (orange) und 1 M β -Hydroxybutyrat (grün).

Für die Messungen in Gegenwart von 1 M Hydroxyectoin und 1 M β -Hydroxybutyrat tritt zudem noch eine Schulter unterhalb der Hauptübergangstemperatur in den DSC-Thermogrammen auf. Dies kann als ein Hinweis auf eine verbreiterte Gel-zu-flüssig-kristalline Phasentrennungsregion gedeutet werden. Wie zu erwarten, haben die DSC- und PPC-Kurven dieselbe Kurvenform und ähnliche Übergangstemperaturen. Auch die PPC-Daten offenbaren eine Schulter unterhalb des Hauptphasenübergangspeaks für 1 M Hydroxyectoin und 1 M β -Hydroxybutyrat. In allen Kurven ist für den thermischen Expansionskoeffizienten α eine sprunghafte Zunahme im Bereich des Hauptphasenüberganges zu erkennen, die ihr Maximum bei T_m erreicht und anschließend bei weiterer Temperaturerhöhung abnimmt. Wie in den PPC-Kurven und Tabelle 3-2 zu sehen ist, unterscheidet sich die thermische Ausdehnung vor und nach dem Hauptphasenübergang nicht signifikant.

Aus den DSC- und PPC- Kurven wurden mittels Integration die Übergangsenthalpien ΔH_m und die absolute Volumenänderungen ΔV_m des Vor- und Hauptüberganges bestimmt. Aus der ermittelten Übergangsenthalpien ΔH_m konnte anschließend die Übergangsentropie bestimmt werden. Die berechneten Werte sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst.

Tabelle 3-2: Aus den PPC-Kurven bestimmte, thermische Expansionskoeffizienten α für DPPC in Ab- und Anwesenheit von 1 M Ectoin, 1 M Hydroxyectoin und 1 M β -Hydroxybutyrat bei 29 und 45 °C sowie die ermittelten Vor (T_p)- und Hauptübergangstemperaturen (T_m).

	System	$\alpha / 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ bei 30 °C	$\alpha / 10^{-3} \text{ K}^{-1}$ bei 45 °C	$T_p / \text{°C}$	$T_m / \text{°C}$
	DPPC	$1,01 \pm 0,18$	$1,24 \pm 0,22$	33	40,5
+ 1 M	Ectoin	$1,71 \pm 0,05$	$1,51 \pm 0,05$	36	41,5
	Hydroxyectoin	$1,19 \pm 0,02$	$1,15 \pm 0,04$	35	41
	β -Hydroxybutyrat	$1,09 \pm 0,13$	$1,17 \pm 0,08$	37	41,5 - 42

3 Ergebnisse und Diskussion

3.3 Einfluss verschiedener Osmolyte auf Lipidmodellmembranen

Tabelle 3-3: DSC- und PPC- basierte thermodynamische Parameter der Vor- und Hauptübergänge von DPPC in Ab- und Anwesenheit von 1 M Ectoin, 1 M Hydroxyectoin und 1 M β -Hydroxybutyrat sowie ein Vergleich der Hauptübergangstemperatur mit den fluoreszenzspektroskopischen Daten.

			DPPC	DPPC + 1 M Ec- toin	DPPC + 1 M Hyd- roxyectoin	DPPC + 1 M β -Hydro- xybutyrat
DSC / PPC	Vorüber- gang	$T_m /$ $^{\circ}\text{C}$	33,70 $\pm 0,09$	36,63 $\pm 0,19$	35,27 $\pm 0,33$	37,83 $\pm 0,19$
		$\Delta H_m /$ kJ mol^{-1}	5,81 $\pm 2,15$	5,07 $\pm 0,26$	2,77 $\pm 0,41$	4,75 $\pm 0,48$
		$\Delta S_m /$ $\text{kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}$	18,94 $\pm 0,41$	16,38 $\pm 0,61$	8,98 $\pm 1,07$	15,29 $\pm 0,61$
		$\Delta V_m /$ mL mol^{-1}	1,57 $\pm 0,14$	4,93 \pm 0,67	1,91 $\pm 0,88$	3,67 $\pm 0,42$
	Haupt- übergang	$T_m /$ $^{\circ}\text{C}$	40,95 $\pm 0,12$	41,65 $\pm 0,08$	41,37 $\pm 0,04$	41,99 $\pm 0,11$
		$\Delta H_m /$ kJ mol^{-1}	34,67 $\pm 4,19$	30,74 $\pm 0,65$	24,60 $\pm 3,21$	24,97 $\pm 1,74$
		$\Delta S_m /$ $\text{kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}$	110,38 $\pm 1,52$	97,65 $\pm 0,32$	78,21 $\pm 0,81$	79,22 $\pm 0,56$
		$\Delta V_m /$ mL mol^{-1}	17,25 $\pm 0,77$	26,85 $\pm 3,32$	14,09 $\pm 0,53$	8,77 $\pm 0,56$
Fluoreszenz- Spektr.	Haupt- übergang	$T_m /$ $^{\circ}\text{C}$	41,05 $\pm 0,36$	41,85 $\pm 0,41$	41,69 $\pm 0,40$	42,52 $\pm 0,58$

3.3.5 Zusammenfassung

Wie bereits bekannt, üben Ectoin und Hydroxyectoin einen fluidisierenden Effekt auf Monoschichten aus. Dieser beruht auf einer Vergrößerung der flüssig-expandierten Region und einer Reduzierung der Grenzspannung zwischen verschiedenen Phasen der Lipidmonoschicht. Die Absicht dieser Studie war es, den Einfluss dieser Osmolyte nun auch auf eine Lipiddoppelschicht zu untersuchen. Die Untersuchungen der Lipiddoppelschicht mittels DSC, PPC und Fluoreszenzspektroskopie zeigten allgemein, allerdings in verschiedenen Ausmaßen, eine Stabilisierung der geordneten Gelphase der Lipiddoppelschicht. Dieses wurde durch eine Zunahme der Gel- zu flüssig-kristallinen Übergangstemperatur in Gegenwart von Ectoin, Hydroxyectoin und β -Hydroxybutyrat gezeigt. Der Ordnungsparameter der Lipidketten, welcher durch die GP -Werte repräsentiert wird, blieb bei Zugabe der Osmolyte im Vergleich zum reinen Lipidsystem nahezu gleich, wodurch eine Einlagerung der

Osmolyte in die Lipiddoppelschicht ausgeschlossen werden kann. Vielmehr resultieren die hier beobachteten Effekte der Osmolyte aus einer Änderung der Hydratationseigenschaften an der Lipidphasengrenzfläche sowie Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatischen Interaktionen der Kopfgruppenregion. Die ausgeprägtesten Effekte wurden hierbei für das β -Hydroxybutyrat beobachtet.

Fortführende Untersuchungen des Einflusses von Ectoin und Hydroxyectoin der Arbeitsgruppe GALLA an GUVs aus DSPC/DOPC/Cholesterin (1:1:1) mittels Fluoreszenzmikroskopie dienten zur Untersuchung der lateralen Domänenorganisation. Die Größe der l_o - und l_d -Phasen war nahezu unverändert, wohingegen eine vermehrte Vesikeladhäsion zu beobachten war. Ferner war nach Zugabe der beiden Osmolyte eine Zunahme des Anteils der *liquid-disordered*- in Vergleich zur *liquid-ordered*-Phase festzustellen. Zur Untersuchung dieses fluidisierenden Effektes wurden *Fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) -Messungen durchgeführt. Diese wurden an GUVs aus POPC bestehend vorgenommen, da diese im Gegensatz zu GUVs aus DSPC/DOPC/Cholesterin in Anwesenheit von Ectoin und Hydroxyectoin weniger zur Adhäsion neigen. Dadurch ist es einfacher, einen selektiven homogenen Bereich zum Bleichen zu finden. Dabei wurde durch die Zugabe von 500 mM Hydroxyectoin ein um 50 % höherer Wert des Diffusionskoeffizienten im Vergleich zu Vesikeln im reinen 1 mM HEPES-Puffer gefunden. Somit konnte quantitativ gezeigt werden, dass Hydroxyectoin die laterale Mobilität der Lipide erhöht.

Auch wenn diese Studien an künstlichen Modellen durchgeführt worden sind, kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass Ectoin und Hydroxyectoin Zellen und Zellsysteme gegen verschiedene Stressfaktoren durch ihre Wirkung auf die Zellmembran stabilisieren.

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Die hier präsentierten Ergebnisse stammen aus einem Kooperationsprojekt mit der RWTH Aachen, Arbeitsgruppe Prof. Dr. L. BLANK, und wurden in BBA-Biomembranes 1862 (2020), 183431 publiziert.

3.4.1 Rhamnolipide

Chemische oberflächenaktive Verbindungen werden seit langem in einer Vielzahl von Anwendungen eingesetzt, beispielsweise in Körperpflegeprodukten sowie als Bestandteile von Emulsionen, Weichspülern und vielem mehr.^[191] Die vielfältigen Anwendungen und die breite Verwendung von oberflächenaktiven Verbindungen sind auf ihren amphiphilen Charakter zurückzuführen. Chemische oberflächenaktive Verbindungen weisen jedoch zwei große Nachteile auf: ihre fehlende Nachhaltigkeit und die Risiken ihres biologischen Abbaus aufgrund potentiell umweltschädlicher Abbauprodukte.^[192] Ein möglicher „grüner“ Ersatz dieser chemischen Tenside können die erstmals 1949 beschriebenen Rhamnolipide sein, die eine Klasse von Biotensiden bilden und von Mikroorganismen hergestellt werden.^[193] Biotenside sind, wie chemische Tenside, amphiphile Moleküle, bei denen jedoch die hydrophobe Alkylkette verzweigt ist. Obwohl die biologische Abbaubarkeit von verzweigten Ketten schwieriger als die linearer Ketten ist ^[192], weisen Biotenside einen großen Vorteil im Vergleich zu chemischen Tensiden auf: Sie werden von erneuerbaren Ressourcen produziert. Des Weiteren besitzen sie eine geringe Toxizität, potenziell hohe Aktivitäten und eine gute Stabilität bei hohen pH-, Temperatur- und Salzgehaltsbereichen.^[194–198] Aus diesem Grund sollten Biotenside als umweltfreundliche Alternative zu chemischen Tensiden erwogen werden. Die Einteilung der Biotenside erfolgt nach ihrer Molekülstruktur in verschiedene Gruppen, z. B. Glykolipide, Lipopeptide, Saponine ^[199], polymere Biotenside, Fettsäuren und Phospholipide ^[194,200]. Rhamnolipide gehören zur Gruppe der oberflächenaktiven Glykolipide und bestehen aus einem Glykon-Teil, der sich aus einer oder zwei Rhamnose-Einheiten zusammensetzt, und einem Aglykon-Anteil, der aus ein bis drei Alkylketten besteht, welche über eine α -1,2-glykosidische Bindung verbunden sind (Abbildung 3-23).^[195,201–203]

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC10C10 auf verschiedene Lipidmodellmembranen

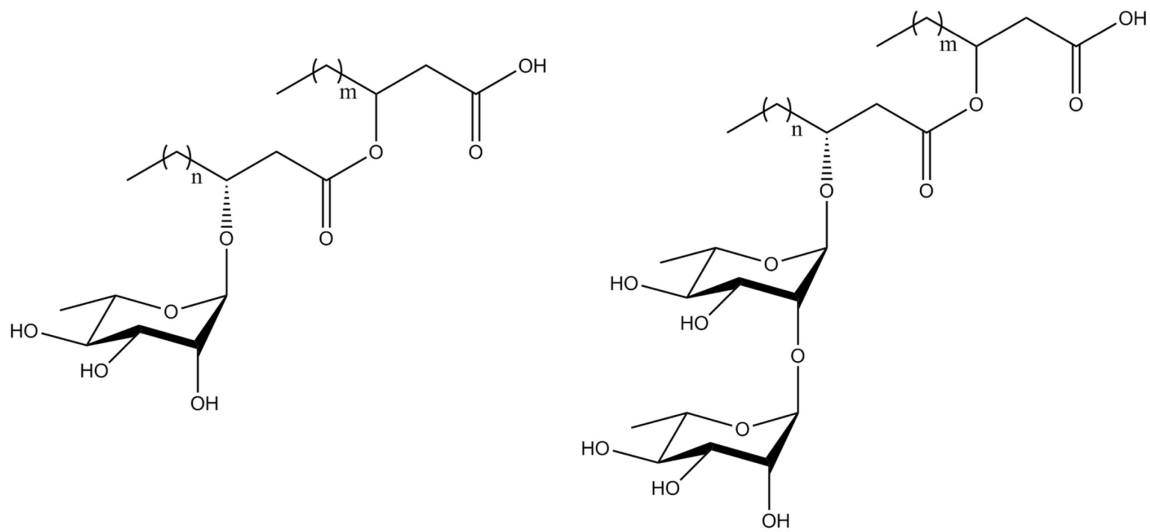


Abbildung 3-23: Chemische Struktur von Mono- und Dirhamnolipiden. Schematische Struktur eines Mono- und Dirhamnolipids. Für $m, n = 6$ ergibt sich RhaC₁₀C₁₀ bzw. RhaRhaC₁₀C₁₀.

Jüngste Fortschritte in Analysetechniken wie Hochleistungsflüssigchromatographie und Massenspektrometrie haben die Aufklärung und Entdeckung von über 60 strukturell unterschiedlichen Rhamnolipiden ermöglicht. Diese strukturellen Unterschiede resultieren nicht nur in Änderungen der Anzahl der Rhamnose-Einheiten, sondern auch in der Variation der Anzahl der aliphatischen Kohlenwasserstoffketten (1 bis 3), der Anzahl der Kohlenstoffatome in den Alkylketten (C₆ bis C₂₄, meistens zwischen 8 und 16 Kohlenstoffatomen) sowie im Sättigungsgrad.^[204–214] ABALOS *et al.* (2001) identifizierten einige mehrfach ungesättigte Monorhamnolipide.^[215] Für die biophysikalischen Eigenschaften sind die strukturellen Unterschiede von großer Bedeutung, da z.B. die Rhamnolipidstruktur einen großen Einfluss auf die kritische Mizellkonzentration (CMC), die Fähigkeit zur Insertion in Membranen, die Oberflächenspannung und die biologische Aktivität, wie z.B. die Induktion der Zytokinproduktion, hat.^[216–218] Das Phasenverhalten von Rhamnolipiden erweist sich als sehr empfindlich gegenüber der Menge der Rhamnose-Einheiten, da mit zunehmender Anzahl an Rhamnose-Einheiten das Molekül voluminöser und so die Packung schwieriger wird, was zur Bildung kugelförmiger Mizellen bei niedrigen Konzentrationen und größeren Mizellen bei hohen Konzentrationen von Dirhamnolipiden führt. Im Gegensatz zu Dirhamnolipiden bilden Monorhamnolipide in geringen Konzentrationen große Mizellen und in hohen Konzentrationen planare vesikelartige Strukturen aus.^[219]

3 Ergebnisse und Diskussion

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC10C10 auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Wie zuvor erwähnt, sind Bakterien, vor allem die Klasse der Beta- und Gammaproteobakterien, die Hauptbezugsquelle von Rhamnolipiden.^[220] Heutzutage wird das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* am häufigsten zur Rhamnolipidproduktion genutzt, wobei es auch einige andere Bakterien gibt, aus denen Rhamnolipide isoliert werden können, wie *Pseudomonas glumae*^[220,221], *Burkholderia pseudomallei*^[216,222], *Burkholderia plantarii*^[218], *Burkholderia thailandensis*^[223] und weitere. Die Bakterien produzieren jedoch aufgrund unterschiedlicher Substratspezifitäten der Acyltransferase RhlA sowie verschiedenen Kultivierungsbedingungen und stammbedingten Unterschieden immer eine Mischung aus verschiedenen Rhamnolipid-Kongeneren.^[206–209,215,218,220,223–226] Eine detaillierte Übersicht über mögliche Rhamnolipidproduzenten mit ihren zugehörigen Syntheseprodukten kann in Literatur^[227] gefunden werden. In *Ps. Aeruginosa* sind drei Enzyme und zwei Vorstufen für die Rhamnolipidsynthese essentiell. Die beiden Vorstufen sind Rhamnose und β -Hydroxyfettsäure. Rhamnose wird dabei in mehreren Schritten aus Glucose-6-Phosphat gebildet und die Hydroxyfettsäure nach *de novo*-Fettsäuresynthese durch Bindung an ein *Acyl Carrier Protein* aktiviert. Mithilfe des Enzyms RhlA werden zwei Hydroxyalkyl-ACP-Moleküle zu einem (3-(3-Hydroxyalkanoyloxy)alkanoat) (HAA)-Molekül dimerisiert. Die Rhamnosyltransferase I (RhlB) fusioniert anschließend die aktivierte dTDP-L-Rhamnose mit dem HAA-Molekül zu einem Monorhamnolipid. Die Bildung eines Dirhamnolipids wird über die Rhamnosyltransferase II (RhlC) durch Übertragung einer zweiten Rhamnose-Einheit gewährleistet (Abbildung 3-24).^[198]

Trotz der lange zurückliegenden Entdeckung der Rhamnolipide konnte ihre Bedeutung für das Leben des produzierenden Organismus nicht vollends aufgeklärt werden und wurde lediglich auf theoretischem Wege von den physiko-chemischen Eigenschaften dieser Moleküle abgeleitet. Einige der vorgeschlagenen Funktionen von Rhamnolipiden sind das Wirken als Promotor für die Aufnahme und den biologischen Abbau schwerlöslicher, hydrophober Substrate^[205,228–232] und als Immunmodulatoren^[205,228–232]. Des Weiteren wurde eine Relevanz als möglicher Virulenzfaktor^[218,222,233–239] und als antimikrobieller sowie exzellenter antifungaler Wirkstoff^[203,215,240–247] beschrieben.

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC10C10 auf verschiedene Lipidmodellmembranen

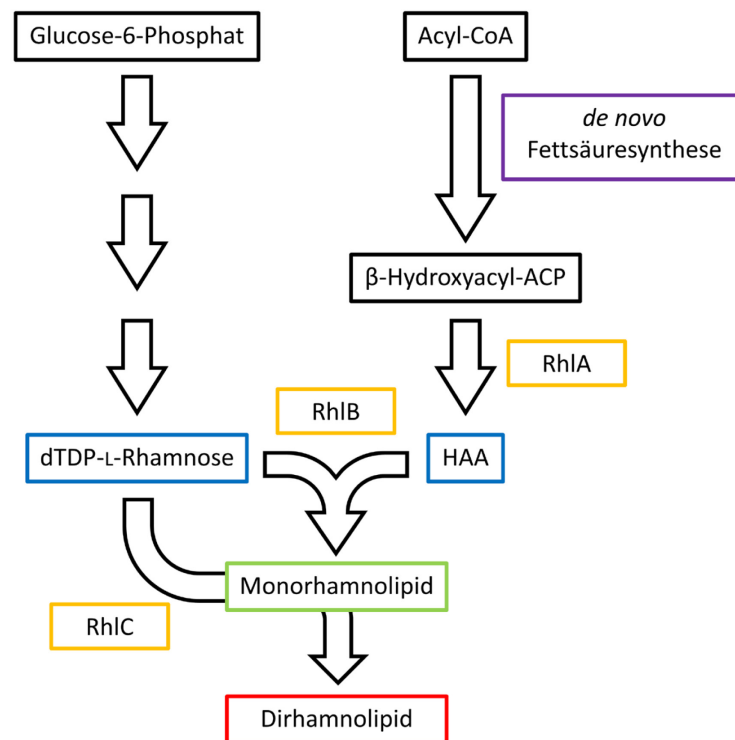


Abbildung 3-24: Vereinfachte, schematische Darstellung der enzymatischen Rhamnolipidsynthese aus den Vorstufen Glucose-6-Phosphat und Acyl-CoA.

In den letzten Jahren hat die Anzahl möglicher Anwendungsbereiche von Rhamnolipiden aufgrund verstärkter Forschung und neuer Erkenntnisse zugenommen, vor allem durch das Aufkommen neuer Strategien zur mikrobiellen Produktion von Rhamnolipiden aus *Ps. aeruginosa*, sodass eine Produktion im kommerziellen Maßstab möglich wurde.^[248,249] Dazu wurde zumeist der nicht pathogene Stamm *Ps. Putida* KT2440 als Wirtsorganismus für die rekombinante Rhamnolipidsynthese eingesetzt, da keinerlei Wachstumsinhibierungen aufgetreten sind.^[250] Wie andere Bakterien auch, produziert *Ps. aeruginosa* immer eine Mischung von Rhamnolipiden, die sich in ihrer Anzahl an Rhamnose-Einheiten und ihren Alkylkettenlänge unterscheiden.^[208,215] HABA *et al.* (2003) wiesen eine differenzierte antimikrobielle Wirkung unterschiedlicher Rhamnolipid-Gemische auf verschiedene Bakterien nach.^[208] Rhamnolipide sind in der Lage, das Wachstum von *Bacillus pumillus* und anderen Bakterienspezies in Konzentrationen unter 1,6 mM zu hemmen und können ferner eine Freisetzung von Bakterienbiofilmen von Polystyrol-Mikrotiterplatten und Glasoberflächen bei Konzentrationen unter der MIC (minimale Hemmkonzentration) sehr effizient induzie-

3 Ergebnisse und Diskussion

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC10C10 auf verschiedene Lipidmodellmembranen

ren.^[240,251,252] Ferner wurde eine Prävention adhäsiver Zell-Zell- und Zelloberflächen-Interaktionen mit nachfolgender Biofilmbildung von *Ps. Aeruginosa* sowie *Yarrowia lipolytica* berichtet.^[251,253–256] Darüber hinaus zeigen Dirhamnolipide aus *Lysinibacillus sphaericus* BV152.1 eine bessere Hemmung der Biofilmbildung sowie der Zelladhäsion als kommerziell erhältliche Rhamnolipide.^[257] SOTIROVA *et al.* (2009) zeigten für *Ps. Aeruginosa*, dass Rhamnolipide im Wachstumsmedium sowohl in Konzentrationen unterhalb als auch oberhalb der CMC das Wachstum und die Lebensfähigkeit dieses Bakteriums nicht beeinflussen, jedoch eine Erhöhung der Zellhydrophobie durch Verringerung des Lipopolysaccharid- (LPS-) Gehalts der bakteriellen Außenmembran verursachen.^[258] Das Ausmaß der LPS-Reduktion hängt signifikant von der Rhamnolipidkonzentration ab, beginnt jedoch auch schon bei Konzentrationen unterhalb der CMC.^[231] Eine solche LPS-Abnahme führt aufgrund einer höheren Zellpermeabilität zu einer erhöhten Menge an extrazellulären Proteinen^[259] und einer Änderung der Zusammensetzung der Außenmembranproteine. Die Kombination dieser beiden Ereignisse resultiert in einer Veränderung der Membranmorphologie zu einer glatten und dünnen Membran mit sichtbaren Störungen auf der Oberfläche.^[258]

Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann die Entwicklung von Rhamnolipiden für zukünftige Anwendungen als Antihaft- und Biofilm-störende Mittel vorangetrieben werden.^[252] ARAUJO *et al.* (2016) schlugen basierend auf ihren Forschungsergebnissen die Verwendung von Rhamnolipiden als Schutzmittel für Lebensmittel vor, da Rhamnolipide selbst auf Oberflächen aus rostfreiem Stahl und Polystyrol eine antimikrobielle Aktivität aufweisen.^[260,261] Weitere potenzielle Anwendungen von Rhamnolipiden liegen in der Öl- und Lebensmittelindustrie, in der Pharmakologie, in der Biomedizin, in der Umweltreinigungstechnologie und bei der Reinigung von Ölverschmutzungen der Meere.^[201,262–270] In der Kosmetikindustrie werden Rhamnolipide aufgrund ihrer geringen Reizwirkung und hohen Hautverträglichkeit bereits als Zusatzstoffe eingesetzt.^[271–273] Auch im Gesundheitswesen werden inzwischen Rhamnolipide genutzt, da beispielsweise eine Rhamnolipidkonzentration unterhalb der CMC einen signifikanten Effekt gegen z.B. *B. pumillus* und bei Konzentration oberhalb der CMC eine antibakterielle Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* und *Klebsiella pneumoniae* zeigte. Dabei wies das Rhamnolipid eine störende Wirkung auf

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC10C10 auf verschiedene Lipidmodellmembranen

die Zellmembran sowie eine signifikante Erhöhung der Membranpermeabilität auf und induzierte Verformungen in der Membran.^[274] Weitere Studien zeigten eine biofilmreduzierende Wirkung von Rhamnolipiden bei einer Konzentration um die CMC, eine Freisetzung von Lipopolysacchariden aus der Außenmembran sowie eine Abnahme der Kohlenhydrat- und Proteinkonzentrationen bestehend aus extrazellulären polymeren Substanzen^[275] und einen Gesamtverlust an Fettsäuren der Zelle.^[231] Neben der antimikrobiellen Wirkung von Rhamnolipiden wurden in der Literatur auch hervorragende antimykotische Eigenschaften, unter anderem gegen *Aspergillus niger* und *Gliocadium virens*, beschrieben.^[215] Aufgrund dieser Resultate beginnen die Rhamnolipide sich als wirtschaftliche und vielversprechende Alternativen zu chemischen Tensiden hervorzutun.^[276] Eine umfassende Übersicht über die möglichen Anwendungen bietet die Literatur^[271].

Eine synthetische Vorstufe der Rhamnolipide bildet das HAA, welches ebenfalls in dieser Arbeit untersucht wurde. Dieses wichtige Intermediat in der Biosynthese der Rhamnolipide wird in mehreren enzymatischen Reaktionen aus 3-Hydroxyfettsäuren gebildet. Bisher ist über dieses Molekül, bis auf eine schlechte Emulsionsstabilität und starke Herabsetzung der Oberflächenstabilität, noch nicht viel bekannt.^[198]

Trotz der zahlreichen bisher beschriebenen Kenntnisse über Rhamnolipide ist ein tieferes Verständnis des zugrunde liegenden Mechanismus der Wechselwirkung zwischen Rhamnolipiden und Zellmembranen für die weitere Entwicklung und Forschung erforderlich. Dazu ist es unabdingbar, die Wechselwirkungen von Monorhamnolipiden, Dirhamnolipiden sowie ihrer Synthesestufen auf Modellbiomembranen unterschiedlicher Zusammensetzung zu untersuchen, um so weitere Aussagen zu ihrer Funktion und Wirkung treffen zu können. Dazu soll zunächst ein genereller Überblick über den aktuellen Forschungsstand gegeben werden.

Aktueller Forschungsstand

In den letzten 15 Jahren wurden mehrere Studien, die sich mit den Wechselwirkungen von Rhamnolipiden und Lipidmodellmembranen beschäftigten, veröffentlicht. Die CMC eines aufgereinigten Dirhamnolipids wurde mittels ITC (isotherme Titrationskalorimetrie) und Oberflächenspannungsmessungen zu 110 μM bzw. 71,5 mg L^{-1} bestimmt.^[277] Generell wurden je nach untersuchtem Rhamnolipid CMC-Werte zwischen 50 und 230 mg L^{-1} erhalten.^[215,224,242]

3 Ergebnisse und Diskussion

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC10C10 auf verschiedene Lipidmodellmembranen

2006 untersuchten SÁNCHEZ *et al.* den Einfluss des Dirhamnolipids RhaRhaC₁₀C₁₀ auf das Phasenverhalten einer DEPE-Modellmembran.^[278] Diese ist insoweit relevant, da die zytosomatische Membran von Bakterien hauptsächlich aus Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG), Cardiolipin und Monoacylglycerophospholipiden (lyso-PG, lyso-PE) besteht.^[197] Bei *Escherichia coli* können bis zu 82 Gewichts-% der Membran auf PE-Lipidmoleküle entfallen.^[278] Turbiditätsmessungen zur Überprüfung der Dispergierbarkeit von DEPE und Dirhamnolipiden bei 25 und 50 °C, die somit der L_β- sowie der L_α-Phase des DEPE entsprechen, ergaben, dass bei Konzentrationen von bis zu 35 mol% Dirhamnolipid keine wesentlichen Unterschiede in der Trübung zwischen den Suspensionen vorlagen. Bei weiterer Erhöhung der Dirhamnolipidkonzentration nahm die Trübung jedoch ab. Nach 12 Stunden Inkubationszeit waren lediglich die Proben ohne Dirhamnolipid und die Proben mit geringen Konzentrationen des Glykolipids sedimentiert. Ein wesentlicher Einfluss der Temperatur konnte nicht festgestellt werden.^[278] Messungen der dynamischen Lichtstreuung (DLS) zeigten, dass die Größe der gebildeten Vesikel mit zunehmender Rhamnolipidkonzentration abnimmt. Diese Abnahme ist jedoch nicht proportional zur Konzentrationszunahme, sondern weist zwei abrupte konzentrationsabhängige Größenänderungen auf. Durch eine Temperaturerhöhung wurden diese beiden Sprünge zu geringeren Konzentrationen verschoben. Daraus kann eine vesikelstabilisierende Funktion des Dirhamnolipids auf DEPE-Vesikel abgeleitet werden.^[278] Vesikel, die nur aus Rhamnolipiden bestehen, weisen eine bimodale Größenverteilung im Bereich von 80 bis 150 nm bzw. 300 bis 700 nm auf.^[279] PORNUNTHORNTAWEE *et al.* (2009) berichteten über eine konzentrationsabhängige Größenverteilung, bei der Konzentrationen von bis zu 1200 mg ml⁻¹ Rhamnolipid eine bimodale Verteilung bildeten, während Konzentrationen über 1200 mg mL⁻¹ zu einer monomodalen Verteilung mittelgroßer Vesikel führten.^[280] Hohe Konzentrationen an Monorhamnolipid bilden uni- oder bilamellare Vesikel, während Dirhamnolipide kugelförmige, aggregierende Vesikel bilden.^[219,281,282] Gemische von mono- und dirhamnolipidhaltigen Vesikeln unterliegen bei einem Übergang von niedrigen zu hohen Konzentrationen einer Strukturveränderung von globulären Mizellen zu lamellaren Vesikeln.^[219] Das Phasenverhalten einer DEPE-Dirhamnolipid-Mischung wurde mittels DSC-Messungen untersucht. Reines DEPE weist zwei kooperative endotherme Pha-

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC10C10 auf verschiedene Lipidmodellmembranen

senübergänge auf, einen lamellaren Gel-zu-fluiden-Übergang bei etwa 37 °C und einen lamellar fluiden-zu-invers-hexagonal- H_{II} -Phasenübergang bei ca. 65 °C. Das Einbringen von zunehmenden Konzentrationen des Dirhamnolipids bewirkt eine fortschreitende Verbreiterung und Verschiebung zu geringeren Temperaturen des lamellaren Gel-zu-fluiden Phasenüberganges, wohingegen der thermotrope Phasenübergangsbereich von der fluiden lamellaren Phase zu der invers hexagonalen H_{II} -Phase immer kleiner wird, sich zu höheren Temperaturen verschiebt und ab einer Konzentration von 3 mol% Dirhamnolipid in der Mischung nicht mehr zu detektieren ist. Bei dieser Konzentration erscheint bei etwa 20 °C ein neuer kleiner Peak, der mit weiterem Anstieg der Dirhamnolipidkonzentration immer ausgeprägter wird. Dies deutet zum einen auf ein recht komplexes Phasenverhalten dieser Mischung hin und zum anderen auf eine Unmischbarkeit in der Gelphase ab 3 mol% Dirhamnolipid. Bei höheren Konzentration, ab 20 mol% Dirhamnolipid in der Mischung, sind keinerlei Phasenübergänge im untersuchten Temperaturbereich von -10 – 85 °C mehr ersichtlich.^[278] Interessanterweise ist das Phasenverhalten einer DEPE/Monorhamnolipid-Mischung nicht mit der DEPE/Dirhamnolipid-Mischung vergleichbar. Das Monorhamnolipid bewirkt eine Verschiebung beider Phasenübergänge zu geringeren Temperaturen und ferner sind keine neu auftauchenden Peaks zu erkennen.^[283] SAXD-Experimente zeigten ebenfalls, dass das Dirhamnolipid eine die hexagonale H_{II} -Phase unterdrückende Wirkung hat^[278], wohingegen das Monorhamnolipid auch hier wieder die Ausbildung der hexagonalen H_{II} -Phase förderte^[283]. Für eine DOPE/Dirhamnolipid-Mischung wurde eine hohe Stabilität der Vesikel dieser Mischung beobachtet, wodurch ein Nutzen dieser als pH-abhängige Wirkstofflieferanten vorgeschlagen wurde.^[284] Dirhamnolipide wirken dem Bestreben der PE-Lipide entgegen, große vesikuläre Aggregate zu bilden und fördern die Ausbildung kleiner Vesikel mit einem geringeren lamellaren Index und komplexen Phasenverhalten. Die Verhinderung der Bildung der hexagonalen H_{II} -Phase und das Stabilisieren der Doppelschichtstrukturen kann damit begründet werden, dass PE-Lipidmoleküle eine konische Molekülstruktur aufweisen, die bevorzugt nicht-lamellare Phasen mit negativer Membrankrümmung ausbilden.^[11] Das Dirhamnolipid hingegen weist eine invertierte konische Struktur auf, die eine positive Membrankrümmung bewirkt, wodurch lamellare Strukturen bevorzugt ausgebildet werden.^[278] Dies wird durch Ergebnisse gestützt, die zeigen, dass das Dirhamnolipid eher in eine POPC/POPE-Membran als in Membranen mit

3 Ergebnisse und Diskussion

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC10C10 auf verschiedene Lipidmodellmembranen

positiver Membrankrümmung interkaliert ^[277] und dass Surfactin ebenfalls eine destabilisierende Wirkung auf die hexagonale H_{II}-Phase des DEPE-Systems besitzt. ^[285] Der destabilisierende Effekt des Monorhamnolipids auf lamellare Membranen kann durch eine konische Struktur, ähnlich der des DEPE-Moleküls, begründet werden (Abbildung 3-25). ^[283] Ähnliche Effekte wurden auch für Mono- und Diglukosyldiglyceride ^[286] und Mono- und Digalaktosyldiglyceride ^[287] beobachtet. FT-IR-Experimente an Mono- und Dirhamnolipid-DEPE-Mischungen ergaben eine generelle Zunahme an *gauche*-Konformeren und Unordnung der Alkylketten mit zunehmender Rhamnolipidkonzentration. ^[278,283] Die Analyse der Hydratation anhand der CO-Streckschwingungen ergaben, dass das Dirhamnolipid unterhalb der Gel-zu-fluid Phasenübergangstemperatur die Hydratation der Kopfgruppe des DEPEs erhöhte, wohingegen bei Temperaturen oberhalb die Hydratation erniedrigt wurde. ^[278] Das Monorhamnolipid hingegen übte einen temperaturunabhängigen Dehydratisierungseffekt aus, welcher durch Umorganisation der Wasserstoffbrückenbindungen an der Lipidgrenzfläche ausgelöst wurde. ^[283]

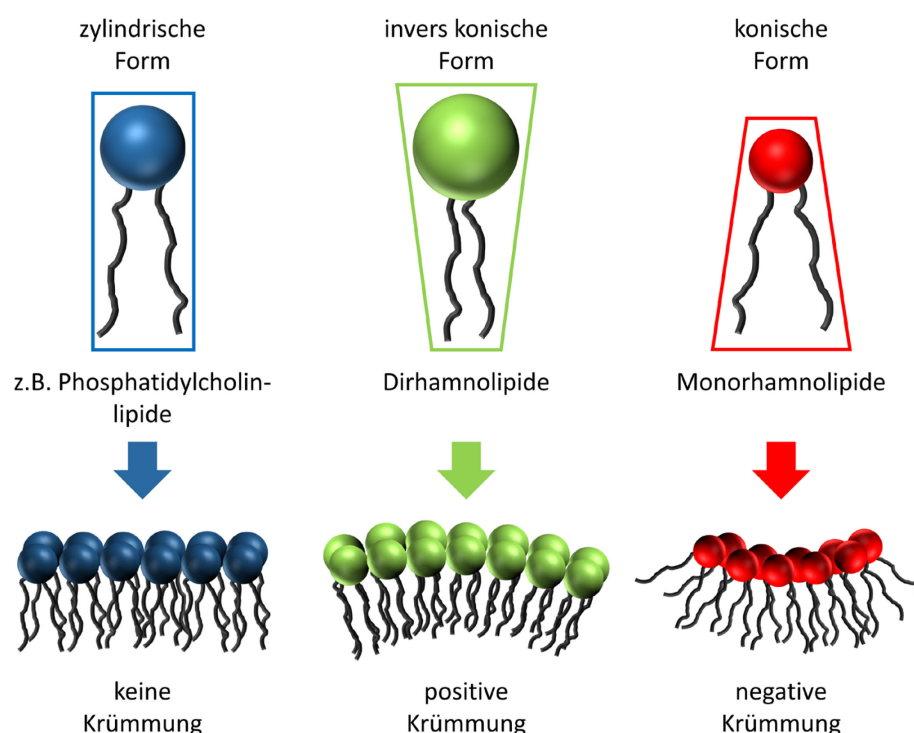


Abbildung 3-25: Schematische Darstellung der geometrischen Form von Mono- und Dirhamnolipiden sowie Phospholipiden, und der induzierten Membrankrümmung. Die Abbildung zeigt die vorgeschlagenen verschiedenen Strukturformen der Mono- und Dirhamnolipide im Vergleich zu Phospholipiden und den daraus resultierenden Effekt auf die Membrankrümmung.

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC10C10 auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Ähnliche Experimente mit Mono- und Dirhamnolipiden wurden auch mit Phosphatidylcholin (PC)-haltigen Lipidmembranen durchgeführt. Dabei wurden vor allem DMPC, DPPC und DSPC untersucht, die sich lediglich durch ihre Alkylkettenlänge (14, 16, 18) unterscheiden. DSC-Messungen mit PC/Rhamnolipid-Mischungen zeigten eine Verbreiterung des Phasenübergangsbereiches sowie eine Verschiebung der Hauptphasenübergangstemperatur, T_m , zu niedrigeren Temperaturen. Der Gel-zu-Gel-Vorübergang war schon bei geringsten Rhamnolipideinlagerungen (1 mol%) vollständig verschwunden, was durch eine signifikante Störung der Ausrichtung und Packung der Alkylketten bewirkt worden sein kann. Das Auftreten eines dritten zusätzlichen Peaks bei niedrigen Temperaturen ist durch die Ausbildung Rhamnolipid-angereicherter Regionen zu erklären. Zusätzlich wurde noch die Aufspaltung des Hauptüberganges in zwei Peak-Maxima beobachtet.^[288,289] Auch dies kann durch die Ausbildung von Rhamnolipid-angereicherten und Rhamnolipid-ärmeren Regionen erklärt werden^[290], wie es für ein Molekül zu erwarten ist, welches in den hydrophoben Kernbereich der Lipiddoppelschicht vordringt und dort *Mismatches* aufgrund der unterschiedlichen Alkylkettenlängen initiiert.^[291] SAXD-Messungen ergaben eine Zunahme der interlamellaren Schichtdicke d , die sich sowohl aus der Lipiddoppelschicht als auch aus einer umgebenden Wasserschicht zusammensetzt, sowie eine Abnahme der multilamellaren Ordnung bei hohen Rhamnolipidkonzentrationen.^[288,292–295] Der störende Effekt auf die Alkylkettenlänge nimmt mit zunehmender Alkylkettenlänge der PC-Moleküle ab^[288,289], was darauf hindeutet, dass die Rhamnolipide nicht tief in die Membran eindringen, sondern vor allem mit den oberen zehn Kohlenstoffatomen wechselwirken.^[296] TMA-DPH Fluoreszenzspektroskopie sowie FT-IR-Messungen ergaben, dass sowohl das Mono- als auch das Dirhamnolipid einen dehydratisierenden Effekt, durch die Ausbildung einer großen Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen und Immobilisierung der umgebenden Wassermoleküle, auf die PC-Lipidmoleküle ausübt. Die so gebundenen Wassermoleküle stehen damit den PC-Lipiden nicht mehr als Wechselwirkungspartner zur Verfügung, wodurch die Membranoberflächenhydrophobizität zunimmt.^[296] Dies erklärt auch, warum der beobachtete Dehydratationseffekt für das Dirhamnolipid im Vergleich zum Monorhamnolipid stärker auftritt, da dieses aufgrund der zusätzlichen Hydroxylgruppen mehr Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann.^[289] Auch über die Ausbildung stabiler nicht-kovalenter, kationisierter Komplexe zwischen Rhamnolipiden und DPPC-Molekülen wurde berichtet.^[297]

3 Ergebnisse und Diskussion

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC10C10 auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Untersuchungen der hämolytischen Aktivität ergaben, dass die höchste hämolytische Aktivität für Vesikel, die nur aus Mono- und Dirhamnolipiden bestanden, festgestellt werden konnte.^[279] Messungen der Carboxyfluorescein (CF)-Freisetzung aus DPPC- und POPC-Vesikeln zeigten, dass durch höhere Konzentration an Rhamnolipiden die Doppelschicht fluider wird und somit aufgrund der Ausbildung von Membrandefekten mehr CF aus den Vesikeln austreten konnte. DPPC-Vesikel, die mit CF beladen waren, haben unmittelbar nach Rhamnolipidzugabe den Fluorophor freigesetzt.^[279] Durch den Einbau von Cholesterin und POPE in die Membran konnte die Menge und Geschwindigkeit der Freisetzung des Fluorophors erheblich gesenkt werden.^[298] Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit Daten, die zeigen, dass bei hohen Cholesterinkonzentrationen eine Hemmung der Freisetzung von Ionen, CF, Tensiden und Umweltgiftstoffen durch passive Membranpermeation stattfindet.^[299,300] Mittels Rasterelektronenmikroskopie konnten zudem morphologische Änderungen bei humanen Erythrozyten nach Inkubation mit Dirhamnolipiden festgestellt werden. Die Erythrozyten, üblicherweise in Form einer runden Scheibe mit einer Einstülpung im Zentrum und einer durchschnittlichen Größe von 5 μm , schwollen an und wiesen Ausstülpungen auf der Zelloberfläche auf.^[298]

Der Einfluss von Sterinen wurde anhand eines POPC/POPG/Ergosterin-Membransystems, das eine Pilzmembran modelliert, weiter mittels Moleküldynamik (MD)-simulationen untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass mit zunehmenden Ergosterinkonzentrationen der fluidisierende Einfluss der Rhamnolipide ansteigt. Das Ersetzen von Ergosterin durch Cholesterin oder β -Sitosterin reduzierte hingegen wieder deutlich den fluidisierenden Effekt auf die Membran.^[301] Ein struktureller Unterschied zwischen Cholesterin und Ergosterin ist die bei Ergosterin zusätzliche Doppelbindung zwischen dem 7. und 8. Kohlenstoffatom, die möglicherweise notwendig ist, um die von Rhamnolipiden ausgelöste Fluidisierung zu bewirken. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass diese Doppelbindung Angriffspunkt verschiedener natürlicher und chemischer, antibakterieller Substanzen ist.^[302,303] Des Weiteren ist bekannt, dass Cholesterin die Ordnung der Phospholipidalkylketten erhöht^[304–306], die mechanischen Membraneigenschaften moduliert^[305,306] und eine dichtere Packung der Lipidmoleküle induziert^[298,307,308]. Dies resultiert in einer stabilisierten Membran, die eine Bindung des Tensids erschwert^[298] und die Verteilung von Dirhamnolipiden in Cholesterin-haltigen Membranen reduziert.^[277]

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC10C10 auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Nicht nur die Art der Kopfgruppe, die Länge der Alkylketten oder der Anteil an Cholesterin in der Membran verändert die Eigenschaften einer Lipidmembran, auch die Ladung, vor allem eine negative, hat einen signifikanten Einfluss auf das Membranverhalten. Bislang gibt es allerdings nur wenige Studien, die den Einfluss von Dirhamnolipiden auf anionisch geladene Membranen untersuchen. Bei physiologischem pH-Wert weisen Rhamnolipide eine negative Nettoladung auf ($pK_s = 5,6$ ^[309]), weshalb keinerlei Verteilung und Bindung von Dirhamnolipiden und POPC/Phosphatidylserin-Membransystem beobachtet werden konnte.^[277]

Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen DMPS, dem relevantesten negativ geladenen Glycerophospholipid ^[310–312], zeigten, dass das Phasenübergangsverhalten der DMPS-Membran, ähnlich wie das der PC- und PE-Lipidmembranen, beeinflusst wurde. Auch hier wurde eine Verbreiterung des Phasenübergangs und Abnahme der Hauptübergangstemperatur, resultierend aus einer Abnahme der Kooperativität und VAN DER WAALS-Wechselwirkungen durch Einlagerung des Dirhamnolipids, beschrieben.^[278,313] Im Gegensatz zu den PC-Lipiden jedoch konnte für das DMPS eine Zunahme der Carboxylgruppen-Hydratation sowohl in der Gel- als auch in der fluiden Phase beobachtet werden. Auch die Hydratation der Phosphatgruppe stieg durch eine Einlagerung höherer Dirhamnolipidkonzentration an. Durchgeführte MD-Simulationen erklären diesen Hydratationseffekt durch eine Modifikation der Konformation, genauer einer Rotation der C-C-Bindungen, die zu Membranstörungen und einer dem Umgebungswasser zugewandten Carboxylatgruppe führt. Des Weiteren ergaben die MD-Simulationen eine Aggregation der Dirhamnolipid-Moleküle in Clustern, die bei Temperaturen oberhalb von T_m , durch den hydrophoben Kern reichen und beide Schichten der Doppelschicht beeinflussen.^[313] Um die Erkenntnisse der Wechselwirkungen zwischen Rhamnolipiden und Modellmembranen noch weiter zu vertiefen, wurden im Folgenden Untersuchungen an komplexeren Membransystemen, vor allem mit dem gut charakterisierten heterogenen, anionischen *raft*-Membransystem (DPPC/DPPG/DOPC/ DOPG/Cholesterin; 45:5:20:5:25 mol%) vorgenommen ^[62], um natürliche Membransysteme besser zu modellieren. Des Weiteren lag der Fokus vor allem auf der Verwendung bildgebender Methoden, wie AFM und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie, um die oben beschriebenen, topologischen Erkenntnisse weiter zu vervollständigen. Eine weitere Neuerung ist sowohl, dass zum ersten Mal in einer Studie der Einfluss der

3 Ergebnisse und Diskussion

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC10C10 auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Anzahl der Rhamnose-Einheiten an der Kopfgruppe durch parallel durchgeführte Experimente direkt gegenübergestellt werden kann und so ein direkter Vergleich möglich ist, als auch die Untersuchung des Einflusses der Rhamnolipidvorstufe 3-(3-Hydroxydecanoyloxy)decanoat (HAA) auf Modellmembranen, wofür bisher noch keinerlei biophysikalische Untersuchungen durchgeführt worden sind. Als erstes sollen dazu im Folgenden die Untersuchungen der Wechselwirkungen und Einflüsse des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ (Abbildung 3-26) mit den erwähnten Modellbiomembranen präsentiert werden.

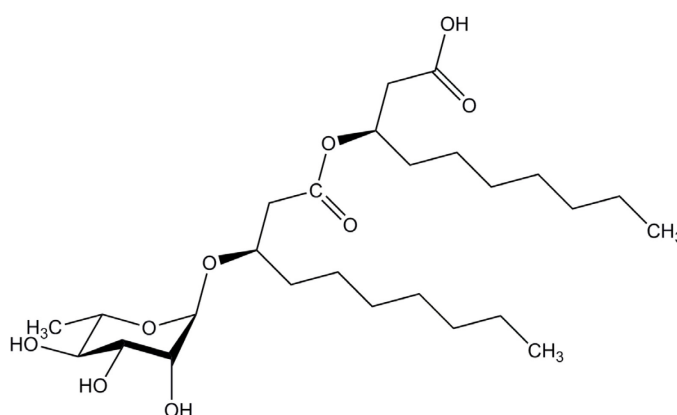


Abbildung 3-26: Chemische Struktur des untersuchten Monorhamnolipids.

3.4.2 Fluoreszenzspektroskopie

Erste Untersuchungen eines möglichen Einbaus und der Wechselwirkung von Rhamnolipiden mit Lipidmembranen wurden mittels LAURDAN-basierter Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Lipidmodellmembranen gewählt. Zum einen ein einfaches System bestehend aus dem gut charakterisierten DPPC, ein weiteres bestehend aus DOPE/DPPG (2:1), welches einer bakteriellen Membran nachempfunden ist, die sich durch die Abwesenheit von phosphocholinhaltigen Lipiden sowie Phosphatidylinositol und Sphingomyelin auszeichnet,^[197] und zuletzt eine anionische 5 KS-raft Lipidmischung, die im Gegensatz zur bakteriellen Membranen auch einen gewissen Anteil an Cholesterin enthielt und eher einer eukaryotischen Membran entspricht (DPPC/DPPG/DOPC/DPPG/Cholesterin; 45:5:20:5:25).^[314,315] Das Rhamnolipid wurde zu MLVs der einzelnen oben genannten Lipidsysteme in einer Konzentration von 0,09 mg mL⁻¹ zugegeben. Dies ist die höchste verwendbare Konzentration, da sie knapp unterhalb der CMC der Rhamnolipide (0,1 mg mL⁻¹ ^[198]) liegt und somit den größten

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Einfluss aufweisen sollte. Die erhaltenen zeitabhängigen Spektren sind in Abbildung 3-27A-E gezeigt.

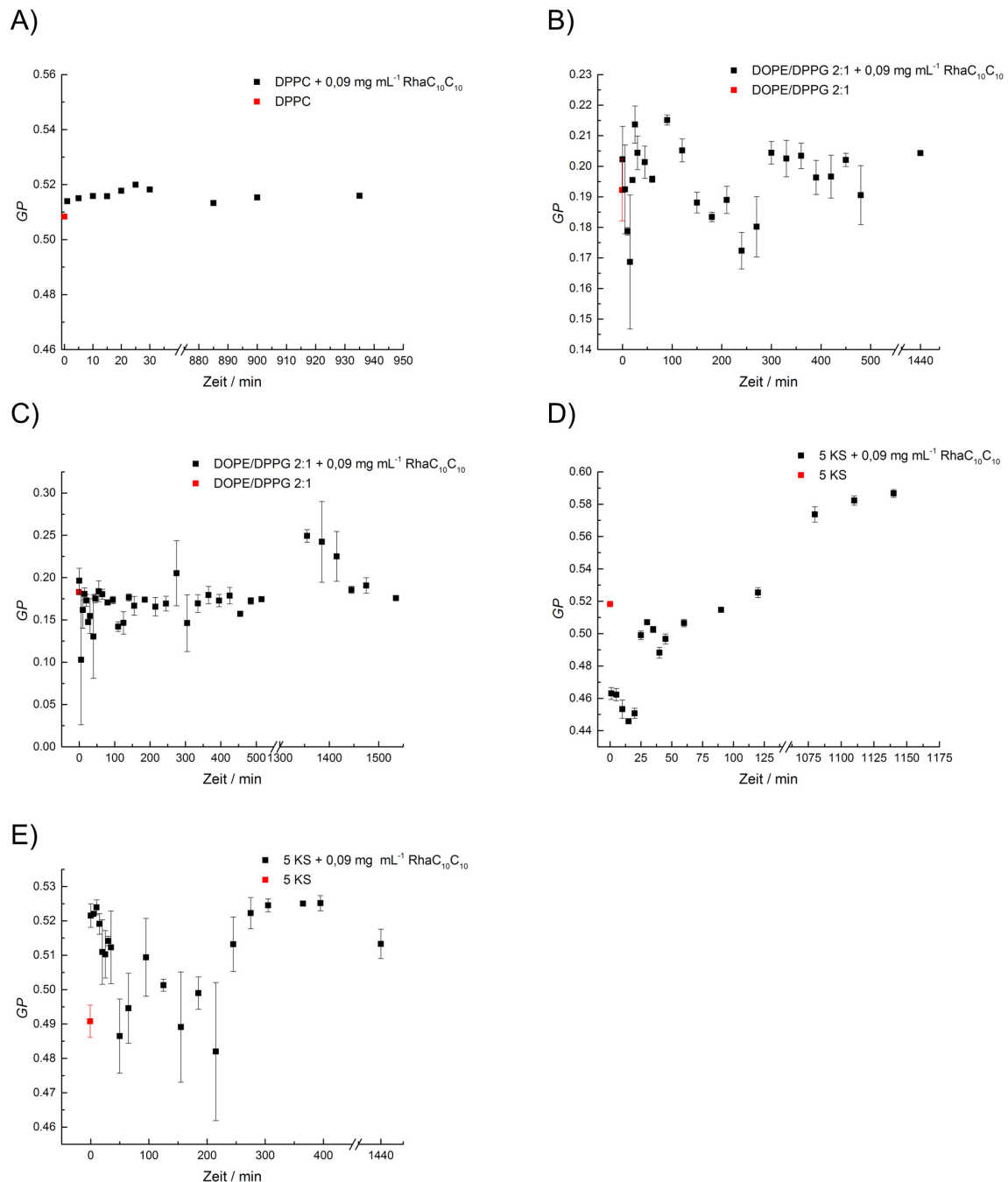


Abbildung 3-27: Zeitabhängige fluoreszenzspektroskopische Untersuchung. Zeitabhängige Messung der GP-Werte von MLVs bestehend aus (A) DPPC, (B, C) DOPE/DPPG (2:1 mol%) und (D, E) einer anionischen 5 KS-raft Lipidmischung (DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/ Cholesterin; 45:5:20:5:25 mol%) bei Raumtemperatur nach Zugabe von 0,09 mg mL⁻¹ RhaC₁₀C₁₀.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

In keinem der untersuchten Systeme ist ein wesentlicher Einfluss des Rhamnolipids auf die *GP*-Werte und somit den Ordnungsparameter des jeweiligen untersuchten Membransystems ersichtlich. Ein nachträglicher Einbau des Rhamnolipids in die Membran oder auch Wechselwirkungen mit den Kopfgruppen, die sich in einer signifikanten Verschiebung der *GP*-Werte bemerkbar gemacht hätten, konnten hier nicht beobachtet werden.

In einem zweiten Ansatz wurde das Rhamnolipid in MLVs aus den oben genannten Lipidsystemen während der Vesikelpräparation mit eingebaut und der Phasenübergang vergleichend mit den reinen Lipidsystemen temperaturabhängig untersucht (Abbildung 3-28A-C). In Abbildung 3-28A ist der typische sigmoidale Kurvenverlauf der *GP*-Werte zu sehen. Bis zu einer Temperatur von etwa 41 °C sind die *GP*-Werte nahezu konstant (bei etwa 0,5) bevor sie steil auf Werte unter Null abfallen. Der Phasenübergang des DPPCs von der relativ dicht-gepackten Gel- in die flüssig-kristalline (L_a) Phase setzt bei etwa $41,3 \pm 0,2$ °C ein, wodurch die Alkylketten, die unterhalb der Hauptübergangstemperatur (T_m) noch in der *all-trans* Konformation vorliegen, mehrfach in die *gauche*-Konformation übergehen. In der *all-trans* Konformation ist die laterale Diffusion und Rotationsbewegung eingeschränkter, wodurch die Umgebung des LAURDANS weniger polar ist und somit das Fluoreszenzemissionsmaximum bei 440 nm liegt. Durch die Zunahme an *gauche*-Konformeren und Kinken steigt auch die Konformationsunordnung an, wodurch die Umgebung des LAURDANS unpolarer wird und die Fluoreszenzintensität bei 490 nm ansteigt, was in einer Abnahme der *GP*-Werte resultiert.

Wie aus Abbildung 3-28A ersichtlich wird, haben 20 mol% RhaC₁₀C₁₀ eingebaut in DPPC MLVs einen signifikanten Einfluss auf das Phasenübergangsverhalten. So erfolgt der Phasenübergang von der Gelphase in die flüssig-kristalline Phase des reinen DPPC-Lipidsystems bei etwa $41,3 \pm 0,2$ °C, und dies in einem relativ scharfen Übergang zwischen 40 und 42 °C. Dies entspricht auch den bekannten Literaturdaten.^[190] Der Phasenübergang mit eingebautem RhaC₁₀C₁₀ ist weitaus weniger klar definiert und erfolgt in einem Bereich von etwa 30 bis 41 °C. Der ermittelte T_m -Wert kann daher nur als grobe Orientierung verwendet werden und beträgt $37,9 \pm 0,1$ °C. Die *GP*-Werte bei 20, 25 und 50 °C beider Kurven sind nahezu identisch, womit ein Einfluss auf den Ordnungsparameter der DPPC-Vesikel in der Gel- sowie flüssig-kristallinen Phase nicht festgestellt werden kann. Das RhaC₁₀C₁₀ bewirkt somit lediglich eine Verbreiterung und Absenkung der Phasenübergangstemperatur.

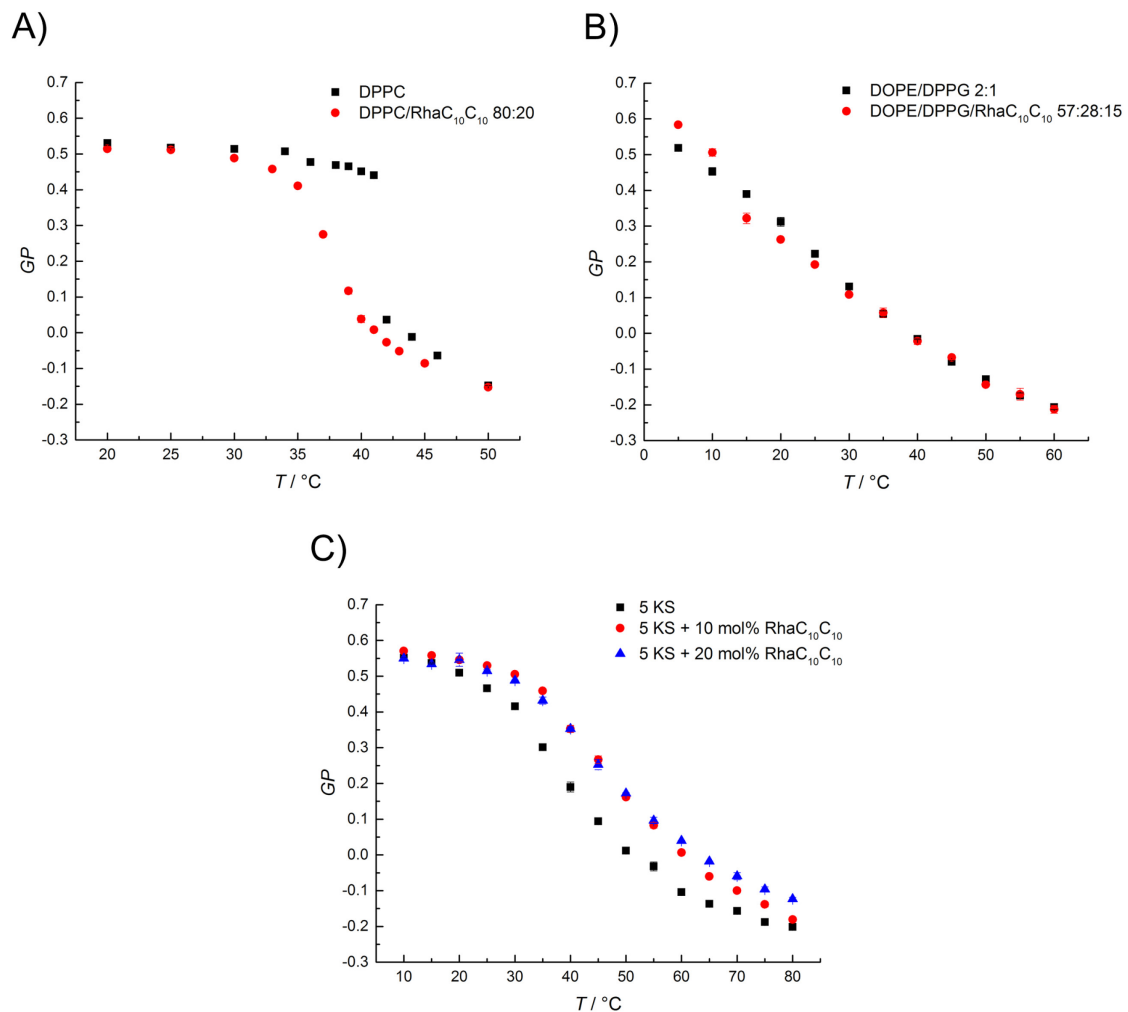
3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Abbildung 3-28: Temperaturabhängige fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen. Temperaturabhängige Messung der *GP*-Werte von MLVs mit eingebauten RhaC₁₀C₁₀ bestehend aus (A) DPPC und DPPC/RhaC₁₀C₁₀ (80:20 mol%), (B) DOPE/DPPG (2:1 mol%) und DOPE/DPPG/RhaC₁₀C₁₀ (57:28:15 mol%) und einer anionischen (C) 5 KS-raft Lipidmischung DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25 mol%) und DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/Cholesterin/RhaC₁₀C₁₀ (40,5:4,5:18:4,5:22,5:10 sowie 36:4:16:4:20:20 mol%).

Das Fluoreszenzspektrum der DOPE/DPPG-Mischung (2:1) (Abbildung 3-28B) zeigt mit ansteigender Temperatur im Bereich von 5 – 60 °C eine stetige, fast lineare Abnahme der *GP*-Werte von etwa 0,52 (\pm 0,01) auf -0,21 (\pm 0,01). Für die Mischung DOPE/DPPG/RhaC₁₀C₁₀ (57:28:15) unterscheiden sich die erhaltenen *GP*-Werte nicht signifikant von denen für das reine Lipidsystem. Die *GP*-Werte weisen beim Aufheizen von niedrigen Temperaturen (5 °C) bis 25 °C geringfügige Schwankungen im Vergleich zum reinen Lipidsystem ohne RhaC₁₀C₁₀ auf, sind aber ab 30 °C nahezu deckungsgleich mit den erhalte-

3 Ergebnisse und Diskussion

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

nen Werten des DOPE/DPPG-Systems. Der Übergang von einer geordneten in die ungeordnete Phase der Lipide wird somit in dieser einer Bakterienmembran ähnlichen Membranzusammensetzung nicht durch das RhaC₁₀C₁₀ beeinflusst.

Anders verhält es sich für die anionische 5 KS-*raft* Lipidmischung (Abbildung 3-28C). Bei 10 °C unterscheiden sich die *GP*-Werte der Kurven der reinen 5 KS-*raft* Lipidmischung nicht von den Proben, welchen 10 mol% bzw. 20 mol% RhaC₁₀C₁₀ bei der Vesikelpräparation hinzugefügt worden sind (5 KS: 0,55/ 5 KS + 10 mol% RhaC₁₀C₁₀: 0,57/ 5 KS + 20 mol% RhaC₁₀C₁₀: 0,55; auf eine Angabe von Fehlerwerten wurde hier verzichtet, da diese vernachlässigbar klein sind). Ab 20 °C jedoch unterscheiden sich die *GP*-Werte der Kurven mit und ohne RhaC₁₀C₁₀ immer deutlicher voneinander. Während der Phasenübergang von der l_o- zur l_d-Phase des reinen 5 KS zwischen 20 und 60 °C abläuft, beginnt er für Vesikel mit eingebauten RhaC₁₀C₁₀ erst 10 °C später und endet bei ca. 65 – 70 °C. Während des Phasenübergangs ist zwischen den Kurven der beiden RhaC₁₀C₁₀-Konzentrationen bis zu einer Temperatur von 60 °C kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Bei 80 °C liegen die *GP*-Werte des reinen Systems und des 5-Komponenten-Lipidsystems mit 10 mol% RhaC₁₀C₁₀ innerhalb der Vesikel wieder nahezu identisch bei etwa -0,20 bzw. 0,18. Die *GP*-Werte der Kurve mit 20 mol% RhaC₁₀C₁₀ hingegen sinken ab 60 °C weit weniger signifikant und betragen bei 80 °C lediglich etwa -0,12. Somit weist hier das RhaC₁₀C₁₀ nicht nur einen Einfluss auf die Phasenübergangstemperatur, sondern auch auf den Ordnungsparameter bzw. die Fluidität in der l_d-Phase auf, welche mit steigender Konzentration erniedrigt wird.

3.4.3 AFM-Messungen

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses der RhaC₁₀C₁₀ auf Lipidmembranen wurden AFM-Messungen durchgeführt. Dazu wurde zu einer Lipiddoppelschicht einer anionischen 5 KS-*raft* Lipidmischung 0,09 mg mL⁻¹ RhaC₁₀C₁₀-Lösung gegeben und die zeitliche Veränderung der Lipiddomänen betrachtet und ausgewertet (Abbildung 3-29). In heterogenen cholesterinhaltigen Lipidmembranen bildet sich eine Koexistenz der l_o- und l_d-Phase aus, wobei vor allem die l_o-Phase mit Cholesterin angereichert ist. Im Vergleich zur s_o-Phase einer Einkomponentenmembran zeichnet sich die l_o-Phase, trotz relativ hoher Kettenordnung, durch eine erhöhte Rotations- und laterale Diffusion aus. Aus diesem Grund ist der

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Einsatz solcher heterogener cholesterinhaltiger Lipidsysteme gut zur Imitation von sogenannten *rafts* in Biomembranen geeignet.^[316] In Abbildung 3-29 (A1, B1, C1) sind die Aufnahmen einer anionischen 5 KS-*raft* Lipidmembran bei RT sowie die Auswertung der Anteile der *l_o*- (hellbraune Bereiche) und *l_d*- (dunkelbraune Bereiche) Phasen gezeigt. Wie schon zuvor erwähnt, enthält die *l_o*-Phase vor allem DPPC und Cholesterin, wohingegen die *l_d*-Phase mit den Lipidmolekülen des DOPCs angereichert ist.^[316] DPPG verteilt sich aufgrund der Phasenübergangstemperatur ebenfalls in die *l_o*-Phase und DOPG in die *l_d*-Phase. Damit weist die Membran eine theoretische molare Zusammensetzung von 75 % Lipidmolekülen in der *l_o*-Phase und 25 % in der *l_d*-Phase auf. Dieser Wert wird in etwa in den gemittelten Auswertungen der Phasenanteile erreicht ($68,49 \pm 0,61$ % *l_o*-Phase zu $31,51 \pm 0,61$ % *l_d*-Phase). Die geringfügige Abweichung ist durch die Verwendung von Stammlösungen der einzelnen Lipidmoleküle während der Präparation zu erklären sowie Ungenauigkeiten bei der Auswertung mittels *ImageJ*. Vor Zugabe der RhaC₁₀C₁₀-haltigen Lösung weist die Lipiddoppelschicht eine Dicke von etwa 6 – 7 nm in Bereichen der *l_o*-Phase und etwa 5 – 6 nm in Bereichen der *l_d*-Phase auf. Die Differenz dieser beiden Schichtdicken entspricht somit dem literaturbekannten Wert von ungefähr 1 nm^[1,317] und dem schon in vorherigen Ergebnissen erhaltenen Wert^[78]. Im nächsten Schritt wurde über die Lipiddoppelschicht eine 0,09 mg mL⁻¹ konzentrierte RhaC₁₀C₁₀-Lösung geleitet (Abbildung 3-29A2-5/C2-5) und die zeitliche Veränderung der Membrandomänen sowie die Schichtdicke untersucht. Wie in Abbildung 3-29 deutlich zu erkennen ist, nimmt der Anteil der *l_d*-Phase signifikant zu. Die Verhältnisse von *l_o*- zu *l_d*-Phase drehen sich sogar um. So liegen nach Injektion der RhaC₁₀C₁₀-haltigen Lösung ca. 75 % der Membran in der *l_d*-Phase vor. Diese Veränderung geschieht unmittelbar nach Injektion der RhaC₁₀C₁₀-haltigen Lösung und ist im weiteren Zeitverlauf über 2 Stunden konstant. Des Weiteren wurden neben den Anteilen der beiden Phasen auch ihre Höhendifferenzen bestimmt. Eine genaue Auflistung ist in nachfolgender Tabelle 3-4 gezeigt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

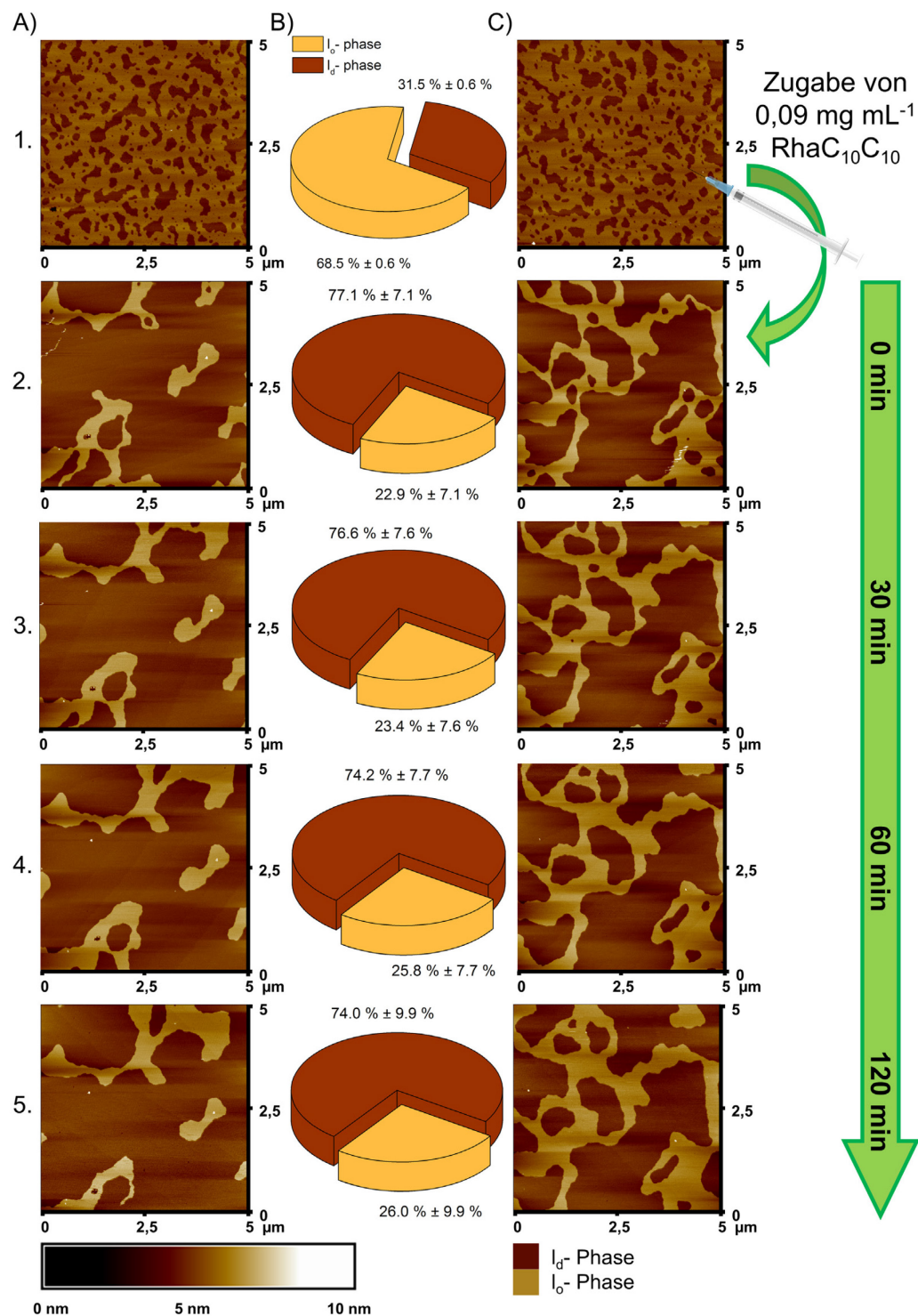


Abbildung 3-29: AFM-Messung einer 5 KS-Doppelschicht bei RhaC₁₀C₁₀-Zugabe. AFM-Messungen zweier (A und C) anionischer 5 KS-Lipiddoppelschichten aus DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25 mol%) vor (1) und nach Zugabe (2-5) von 0,09 mg mL⁻¹ RhaC₁₀C₁₀ unmittelbar nach Injektion (0 min), nach 30 min, 60 min und 120 min. Zusätzlich aufgetragen ist die gemittelte Veränderung des relativen Anteils der *liquid-ordered* (*l_o*-) und *liquid-disordered* (*l_d*-) Phasen (B).

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Tabelle 3-4: Auswertung der AFM-Messungen nach Zugabe einer 0,09 mg mL⁻¹ RhaC₁₀C₁₀-haltigen Lösung zu anionischen 5 KS-Lipidmembranen.

Zeitpunkt		Mittelwert
vor RhaC ₁₀ C ₁₀ -Zugabe	gemittelte Höhendifferenz l _o - / l _d - Phase	1,1 ± 0,1 nm
	relativer Anteil l _o - / l _d - Phase	68,5 ± 0,6 % / 31,5 ± 0,6 %
0 min	gemittelte Höhendifferenz l _o - / l _d - Phase	1,9 ± 0,2 nm
	relativer Anteil l _o - / l _d - Phase	22,7 ± 7,1 % / 77,1 ± 7,1 %
30 min	gemittelte Höhendifferenz l _o - / l _d - Phase	2,0 ± 0,1 nm
	relativer Anteil l _o - / l _d - Phase	23,4 ± 7,6 % / 76,6 ± 7,6 %
60 min	gemittelte Höhendifferenz l _o - / l _d - Phase	1,9 ± 0,3 nm
	relativer Anteil l _o - / l _d - Phase	25,8 ± 7,7 % / 74,2 ± 7,7 %
120 min	gemittelte Höhendifferenz l _o - / l _d - Phase	2,0 ± 0,4 nm
	relativer Anteil l _o - / l _d - Phase	26,0 ± 9,9 % / 74,0 ± 9,9 %

Wie eingangs dieses Kapitels erwähnt, beträgt die übliche Höhendifferenz zwischen der l_o- und l_d-Phase in etwa 1 nm. Dieses Ergebnis konnte hier bestätigt werden. Durch Zugabe des RhaC₁₀C₁₀ verdoppelt sich diese Differenz in etwa (Abbildung 3-30). So beträgt die neue gemittelte Höhendifferenz unmittelbar nach Injektion 1,9 ± 0,2 nm. Diese unterliegt, wie auch der Anteil beider Phasen im weiteren Verlauf der Messungen, keiner zeitlichen Veränderung mehr. Somit zeigt das RhaC₁₀C₁₀ in diesen Messungen einen starken Einfluss auf die Membrandomänen und das Phasenverhalten der Lipidmodellmembran und begünstigt fluide Domänen der Lipidmembran.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

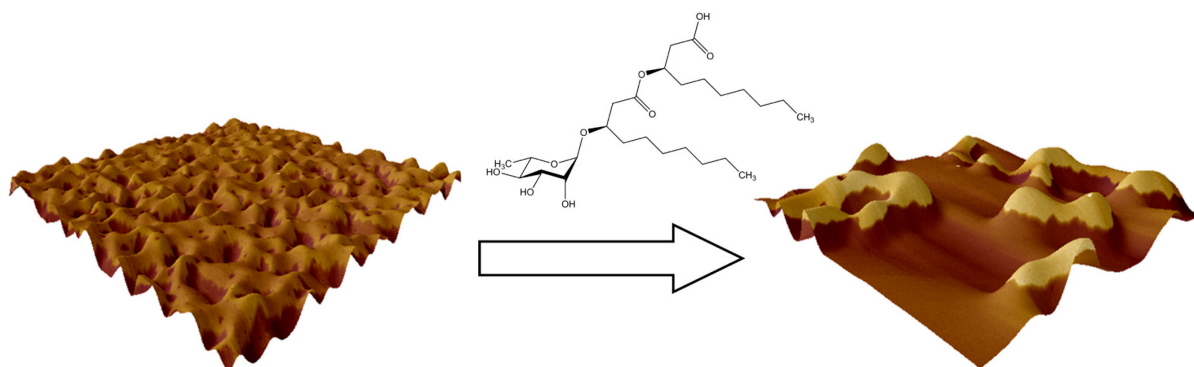


Abbildung 3-30: 3D-Darstellung der AFM-Aufnahme einer 5 KS-Doppelschicht vor und nach RhaC₁₀C₁₀-Injektion. Dreidimensionale Darstellung der AFM-Aufnahme einer heterogenen anionischen 5 KS-Doppelschicht vor und unmittelbar nach Injektion einer 0,09 mg mL⁻¹ RhaC₁₀C₁₀-haltigen Pufferlösung. Bereiche der Membran, die in der l_o-Phase vorliegen sind hellbraun, Domänen in der l_d-Phase dunkelbraun gekennzeichnet.

3.4.4 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Zur genaueren Untersuchung der AFM-Ergebnisse wurden fluoreszenzmikroskopische Messungen durchgeführt. Dabei wurden GUVs der anionischen 5 KS-raft Lipidmischung untersucht, da dieses Membransystem bisher am signifikantesten durch das RhaC₁₀C₁₀ beeinflusst worden ist. Als fluoreszenter Marker wurde der Membran der Fluorophor *N*-Rh DHPE zugesetzt (0,1 mM), welcher sich bevorzugt in die l_d-Phase einlagert. Diese ist in den folgenden Abbildungen in Rot dargestellt. Abbildung 3-31A zeigt GUVs dieses Systems vor Zugabe des RhaC₁₀C₁₀ bei RT. Hierbei sind viele Vesikel mit einer Größe von etwa 5 – 20 µm zu erkennen, die allesamt phasensepariert in l_o-Phase und l_d-Phase vorliegen. Durch Zugabe von 0,09 mg mL⁻¹ RhaC₁₀C₁₀-haltiger Pufferlösung sind lediglich Vesikeldomänen in der l_d-Phase zu erkennen (Abbildung 3-31B). Dieser Phasenübergang ist wie bei den AFM-Messungen unmittelbar nach der Injektion eingetreten, wobei die Anzahl der zu erkennenden Vesikel nach der Injektion geringfügig abgenommen zu haben scheint. Die Größenverteilung der Vesikel liegt immer noch im Bereich um die 5 – 20 µm, wobei mehr kleinere Vesikel zu erkennen sind. Bei einer zeitabhängigen Betrachtung dieses Systems ist eine marginale Zunahme an *N*-Rh DHPE markierten Vesikeln zu erkennen.

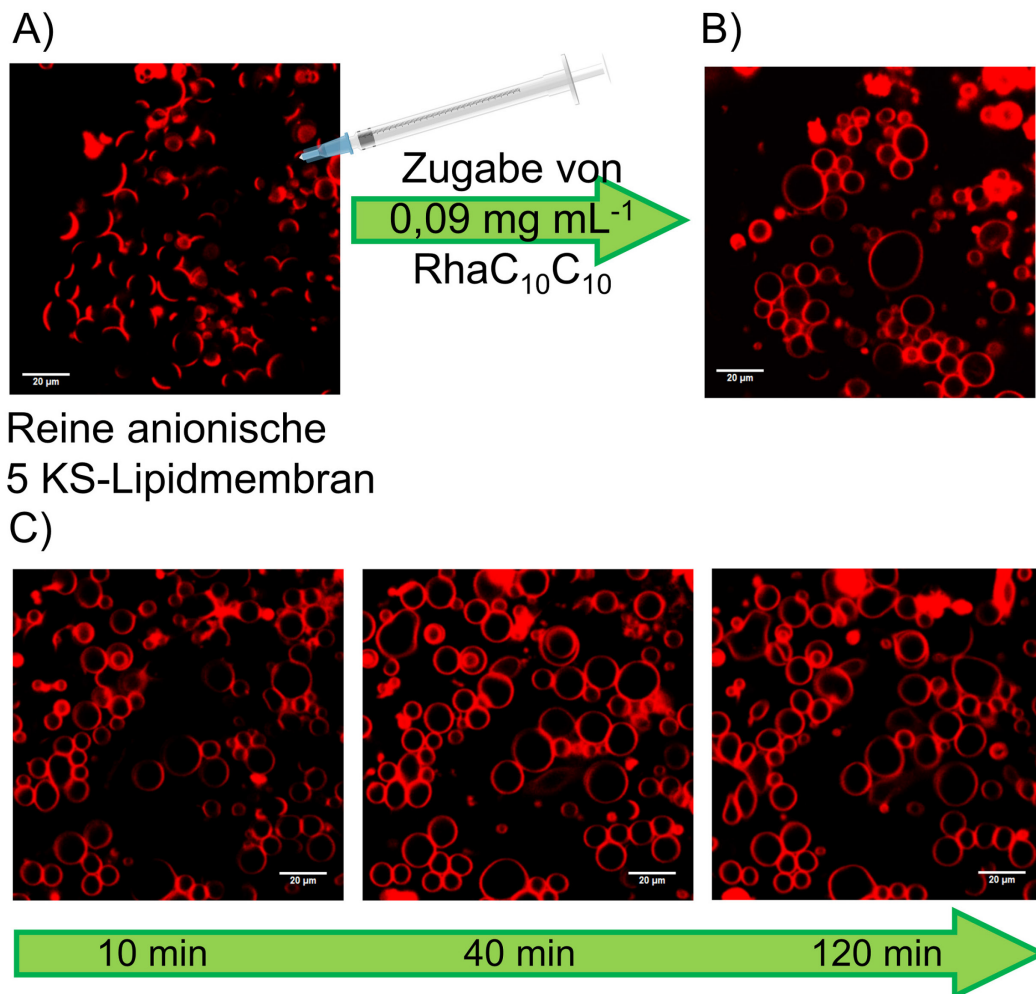
3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Abbildung 3-31: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs der 5 KS-raft Lipidmischung vor und nach Injektion einer RhaC₁₀C₁₀-Lösung. Zeitabhängige konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs einer (A) anionischen 5 KS-raft Lipidmischung bei RT vor und (B) 2 min nach der Injektion einer 0,09 mg mL⁻¹ RhaC₁₀C₁₀-Lösung. Der aufgenommene Bereich (C) nach 10, 40 sowie 120 min unterscheidet sich von denen in (A) und (B). Die Skala entspricht 20 µm. Der verwendete Membran-Fluorophor war *N*-Rh-DHPE (rot).

Da gerätebedingt zwischen der Injektion und der ersten Bildaufnahme mit dem Laser immer einige Minuten vergehen, wurde auch mittels CCD-Kamera die Auswirkungen des RhaC₁₀C₁₀ auf die GUVs schon während der Injektion untersucht (Abbildung 3-32). Dabei ist eindeutig zu erkennen, dass schon nach ca. 2 min die GUVs komplett in der l_d-Phase vorliegen. Allerdings ist auch hier wieder zu erkennen, dass die Anzahl an fluoreszierenden Vesikeln innerhalb des beobachteten Zeitraums abgenommen hat.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

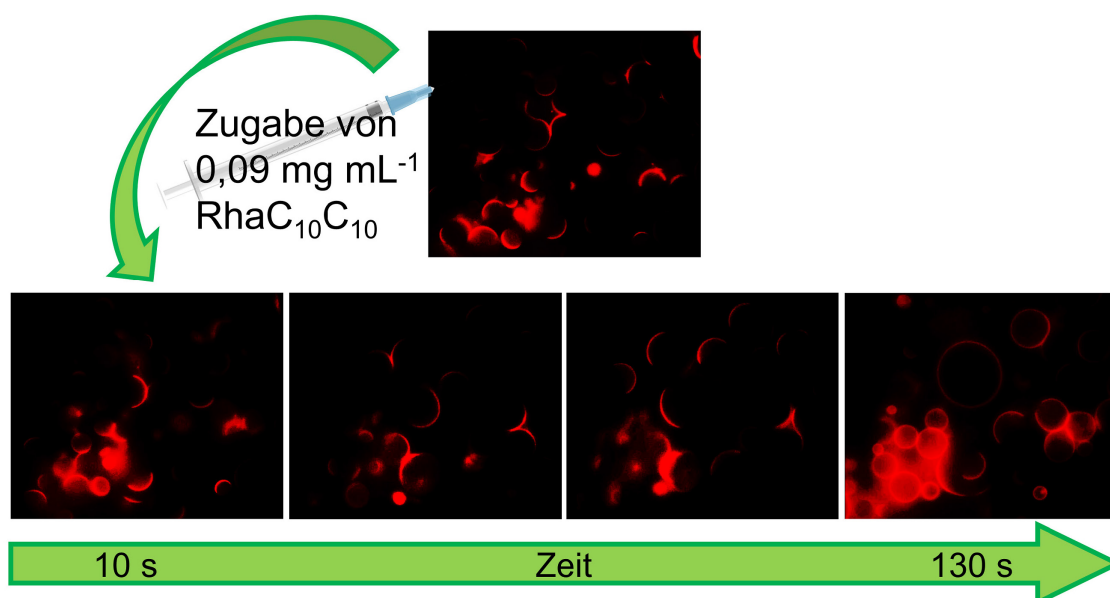


Abbildung 3-32: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs einer anionischen 5 KS-raft Lipidmischung bei RT vor und nach Injektion einer 0,09 mg mL⁻¹ RhaC₁₀C₁₀-Lösung (0-130 s).

Für eine genauere Auflösung des Membrandomänenverhaltens, insbesondere der l_o -Phase, sowie zur Gewinnung von Rückschlüssen auf den genauen Mechanismus der RhaC₁₀C₁₀-GUV-Interaktionen wurden die Fluorophore NBD-DHPE und ATTO 647 eingesetzt. NBD-DHPE (in den folgenden Abbildungen grün dargestellt) lagert sich in die l_o -Phase ein, wohingegen ATTO 647 (blau) im Puffer gelöst vorliegt. Durch Verwendung eines ATTO 647-markierten Puffers während der Präparation der GUVs ist dieser anschließend in den Vesikeln vorhanden und kann durch Spülen aus der Vesikelumgebung entfernt werden. Somit kann in Vesikel eingebautes ATTO 647 als *Leakage-Assay* verwendet werden. In Abbildung 3-33 sind verschiedene GUVs, welche mit allen drei Fluorophoren markiert sind, dargestellt. Dabei ist eine eindeutige Aufteilung in l_d -Phasen (rot) und l_o -Phasen (grün) zu erkennen und fast alle Vesikel konnten mit ATTO 647 in ihrem Inneren versehen werden. Die Größe der Vesikel liegt auch hier wieder zwischen 5 – 25 μm . Nach Zugabe der RhaC₁₀C₁₀-Lösung können jetzt durch Verwendung der zwei zusätzlichen Fluorophore weitere Erkenntnisse erhalten werden. Wie bisher beobachtet, hebt sich in vielen Vesikeln die Phasentrennung auf und sie liegen ausschließlich in der l_d -Phase vor. Des Weiteren steigt der Anteil an kleinen Vesikeln, die nur eine grüne Fluoreszenz aufweisen und somit in der l_o -

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC10C10 auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Phase vorliegen. Diese waren in den vorangegangenen Fluoreszenzmikroskopie-Untersuchungen aufgrund des fehlenden Fluorophors nicht zu erkennen. Die Zunahme an nur rot- sowie nur grün-fluoreszierenden GUVs, einhergehend mit der Größenabnahme, lässt auf eine initiale Trennung der l_d - und l_o -Phasen innerhalb eines GUVs mit nachfolgender Abspaltung beider Phasen in einzelne Vesikel schließen, wodurch auch die nach 2 min schon einsetzende Abnahme an ATTO 647 gefüllten Vesikeln zu erklären ist. Dieser Vorgang kann in Abbildung 3-34 besonders gut beobachtet werden.

Große grün markierte Vesikel weisen Verformungen auf und werden über den beobachteten Versuchszeitraum kleiner bzw. verschwinden komplett. Ebenso sind nach 90 min nur noch vereinzelte Vesikel mit ATTO 647 gefüllt und die meisten GUVs liegen nach 90 min nur noch in der l_d -Phase (rot) vor. Im Vergleich zum Zeitpunkt vor der RhaC10C10-Zugabe wiesen die GUVs einen geringeren Durchmesser auf. Die Änderung des Phasenzustandes der Vesikel konnte durch eine Auswertung des Anteils der beiden Phasen sowie des Anteils an ATTO 647 gefüllten Vesikeln verschiedener Proben quantifiziert und bestätigt werden. Dazu wurden die Farbanteile an roten, grünen und blauen Pixeln der unterschiedlichen Bildausschnitte ausgewertet, auf den Anfangswert normiert und die Differenzen gegen die Zeit aufgetragen. Dabei ist eine in etwa sechsfache Zunahme des Anteils der l_d -Phase zu beobachten, wohingegen der Anteil der l_o -Phase um etwa 60 % und der Anteil an ATTO 647 gefüllten Vesikeln um über 90 % im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Injektion abnehmen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

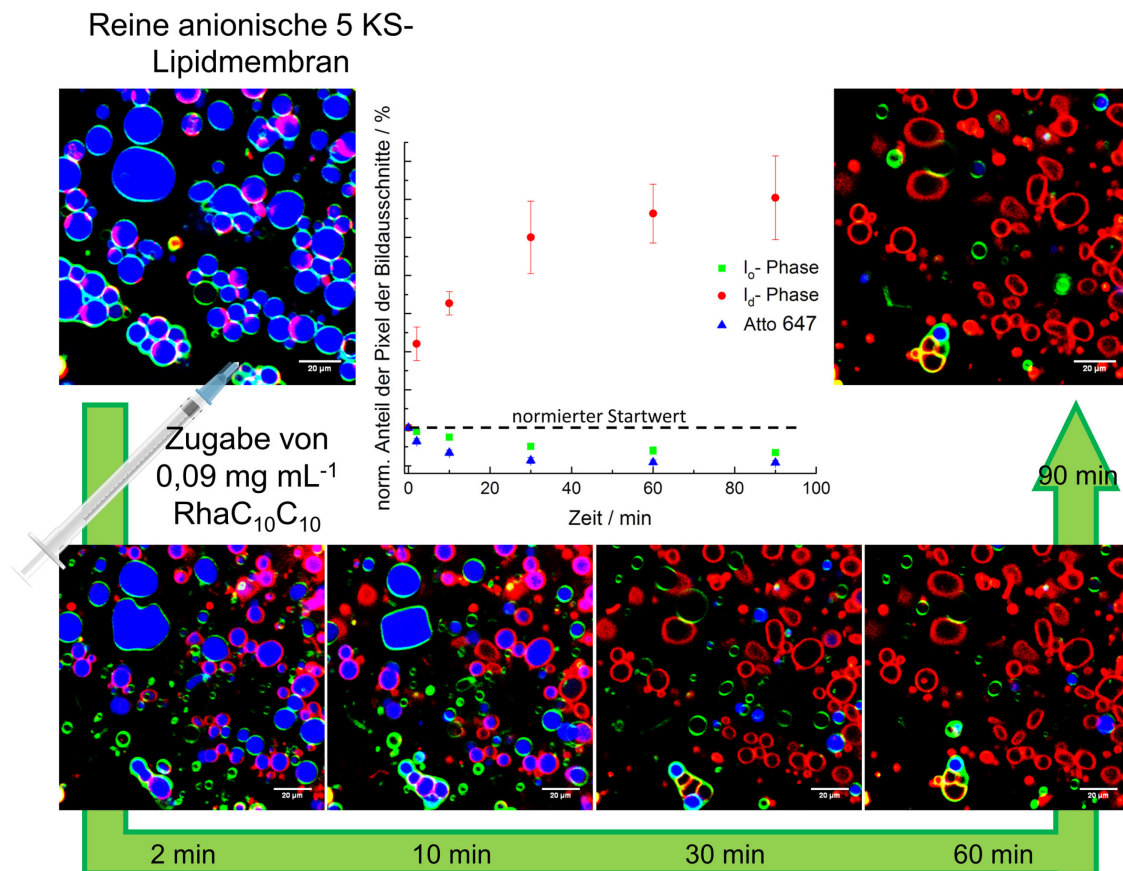


Abbildung 3-33: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs einer 5 KS-raft Lipidmischung vor und nach Injektion einer RhaC₁₀C₁₀-Lösung. Zeitabhängige konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs einer anionischen 5 KS-raft Lipidmischung bei RT vor und nach der Injektion einer 0,09 mg mL⁻¹ RhaC₁₀C₁₀-Lösung. Der aufgenommene Bereich war über die gesamte Zeit derselbe. Die Skala entspricht 20 µm. Die verwendeten Membran-Fluorophore waren NBD-DHPE (grün; l_o-Phase), N-Rh-DHPE (rot; l_d-Phase) und innerhalb der GUVs wurde ATTO 647 (blau) eingesetzt. Zudem ist die normierte relative Veränderung des Anteils der Pixel der verschiedenen Fluorophore verschiedener Bildausschnitte unterschiedlicher Proben gegen die Zeit aufgetragen. Diese Abbildung zeigt, wie der Anteil der l_d-Phase mit fortschreitender Zeit zunimmt.

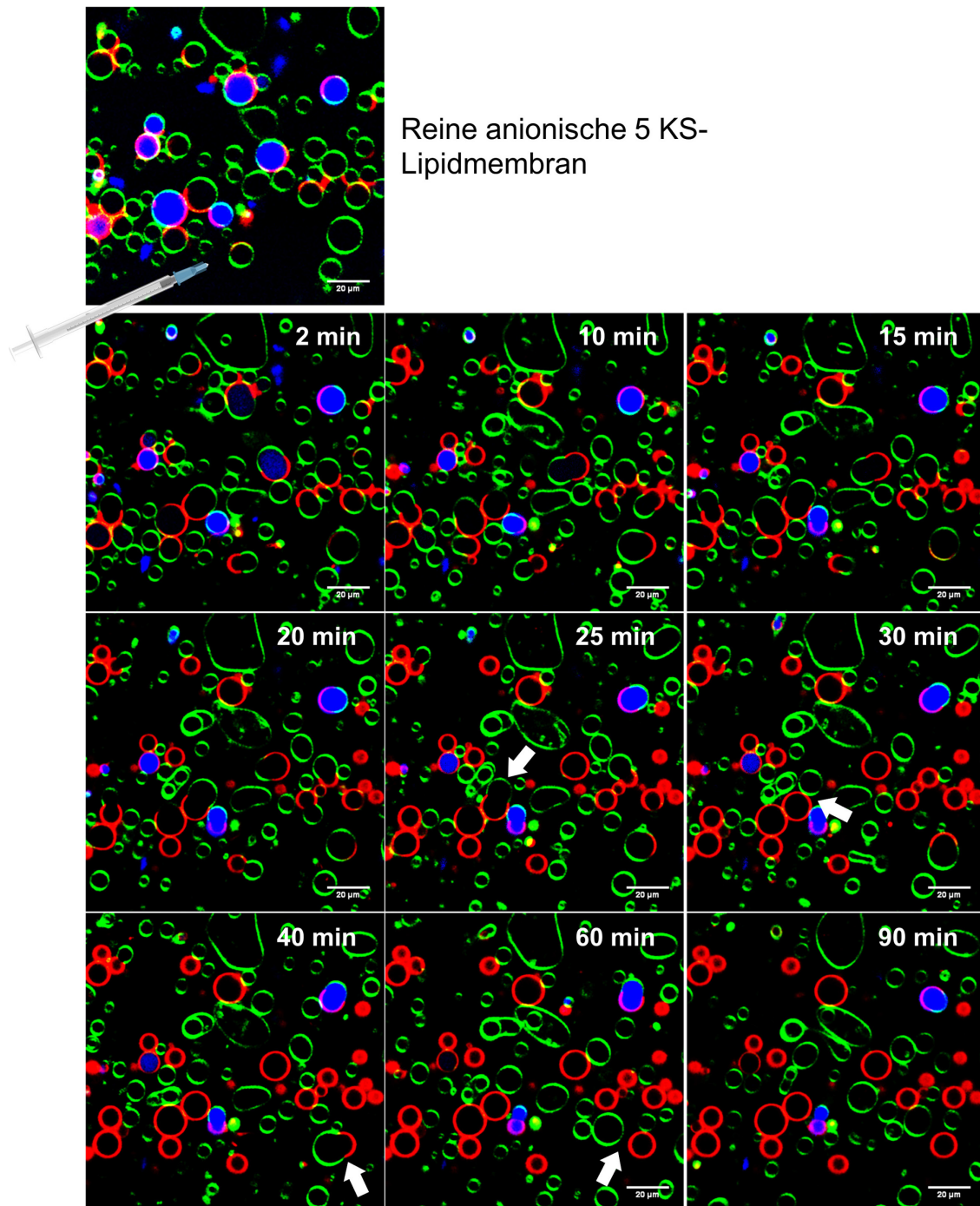
3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen
Lipidmodellmembranen

Abbildung 3-34: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs einer 5 KS-raft Lipidmischung vor und nach Injektion einer RhaC₁₀C₁₀-Lösung. Detaillierte zeitabhängige konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs einer anionischen 5 KS-raft Lipidmischung bei RT vor und nach der Injektion einer 0,09 mg mL⁻¹ RhaC₁₀C₁₀-Lösung (0-90 min). Der aufgenommene Bereich war über die gesamte Zeit derselbe. Die Skala entspricht 20 µm. Die verwendeten Membran-Fluorophore waren NBD-DHPE (grün; l₀-Phase), N-Rh-DHPE (rot; l_d-Phase) und innerhalb der GUVs wurde ATTO 647 (blau) eingesetzt. In dieser Abbildung ist die Trennung der l₀-Phase und l_d-Phase eines GUVs in zwei neue kleinere GUVs zu erkennen (beispielhaft, s. Pfeile).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Auch Abbildung 3-34 zeigt anfangs wieder eine klare Trennung der Vesikeldomänen in die l_d -Phase und l_o -Phase. Allerdings sind im Vergleich zu Abbildung 3-33 weniger Vesikel mit ATTO 647 gefüllt und der Vorgang des Übergangs von der l_o -Phase in die l_d -Phase der Vesikel läuft wesentlich langsamer ab als in den bisherigen Messungen beobachtet wurde. Dies ist jedoch für die zuvor getroffenen Vermutungen von Vorteil, da die Trennung der l_o -Phase von l_d -Phase mit anschließender Abschnürung in zwei separate Vesikel so beobachtet werden konnte (s. beispielhaft weiße Pfeile in Abbildung 3-34). Trotz des langsameren Verlaufs konnten alle bisher beobachteten und beschriebenen Auswirkungen des RhaC₁₀C₁₀ hier wieder gesehen werden. Der Anteil an ATTO 647 gefüllten Vesikel sinkt innerhalb des beobachteten Zeitraums, ebenso sind am Ende der Messung die GUVs klar in l_d -Phase- und l_o -Phase vorliegend getrennt. Die quantitative Auswertung der Anteile der beiden Phasen sowie des ATTO 647 zeigte ein ähnliches Verhalten wie in den anderen Messungen und konnte in die in Abbildung 3-33 gezeigte Kurve eingepflegt werden. Eine schematische Darstellung dieses Vorgangs ist in der nachfolgenden Abbildung 3-35 gezeigt.

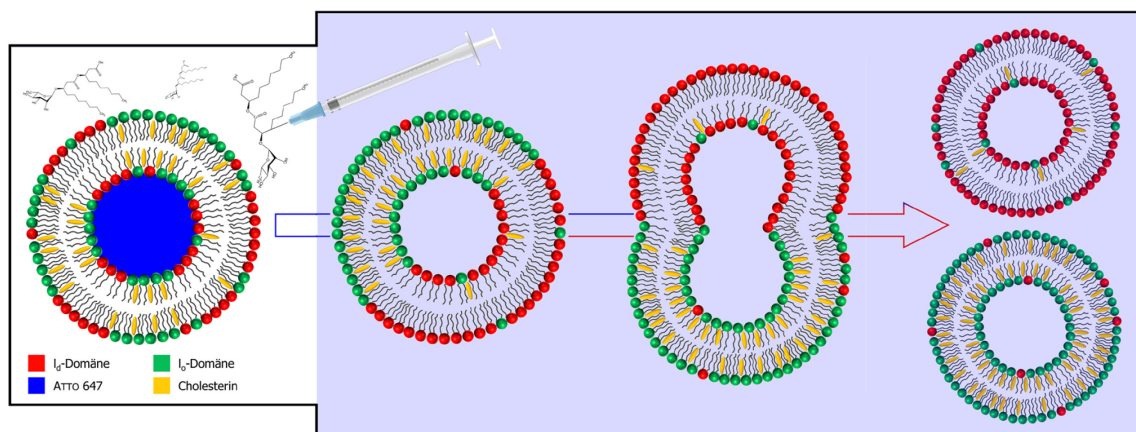


Abbildung 3-35: Schematische Darstellung des Einflusses des RhaC₁₀C₁₀ auf eine heterogene Lipidmembran.

Da das RhaC₁₀C₁₀ vor allem einen starken Einfluss auf die l_d -Membrandomänen zeigte, wurden zusätzlich noch Messungen mit Vesikeln aus DOPC bestehend durchgeführt. DOPC besitzt eine Phasenübergangstemperatur von der Gel- in die flüssig-kristalline Phase von $-16,5\text{ °C}$.^[318] Auch hier wurden Aufnahmen im Minuten- (Abbildung 3-36) und Sekundenbereich (Abbildung 3-37) ohne ATTO 647 sowie mit ATTO 647 (Abbildung 3-38) durchgeführt.

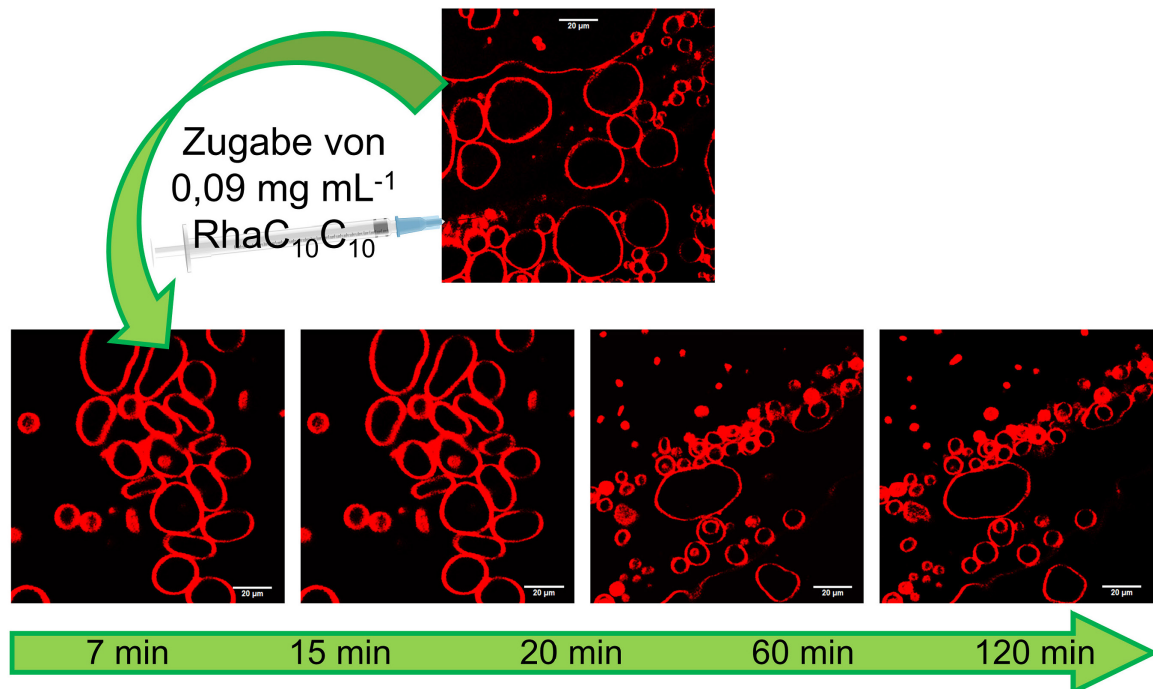
3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Abbildung 3-36: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs aus DOPC im Minutenbereich nach Injektion einer RhaC₁₀C₁₀-Lösung. Zeitabhängige konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von DOPC GUVs bei RT vor und 7 min, 15 min, 20 min, 60 min und 120 min nach Injektion einer 0,09 mg mL⁻¹ RhaC₁₀C₁₀-Lösung. Die aufgenommenen Bereiche nach 7 und 15 min sowie 60 und 120 min sind miteinander identisch. Ansonsten unterscheiden sich die abgelichteten Bereiche, da es zu einem Ausbleichen der vorhandenen Fluorophore mit der Zeit gekommen ist. Die Skala entspricht 20 µm. Der verwendete Fluorophor war *N*-Rh-DHPE.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

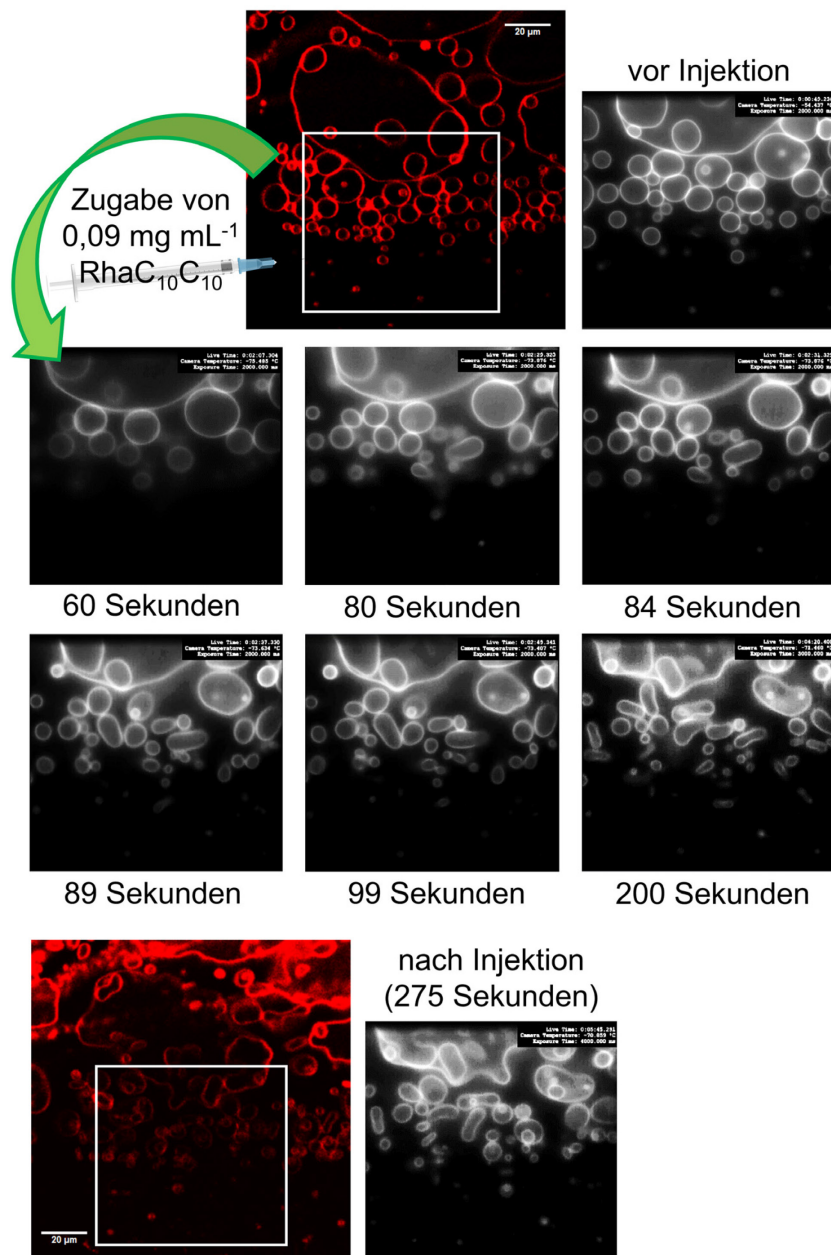


Abbildung 3-37: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen im Sekundenbereich von GUVs aus DOPC nach Injektion einer RhaC₁₀C₁₀-Lösung. Zeitabhängige konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von DOPC GUVs bei RT vor Injektion und von 60 bis 275 Sekunden nach der Injektion einer 0,09 mg mL⁻¹ RhaC₁₀C₁₀-Lösung. Die Skala entspricht 20 μm. Der verwendete Fluorophor war *N*-Rh-DHPE. Der Bereich innerhalb der weißen Kästchen in den roten Laseraufnahmen entspricht dem mit der CCD-Kamera abgelichteten Bereich, welcher in den schwarz-weiß Aufnahmen zu sehen ist.

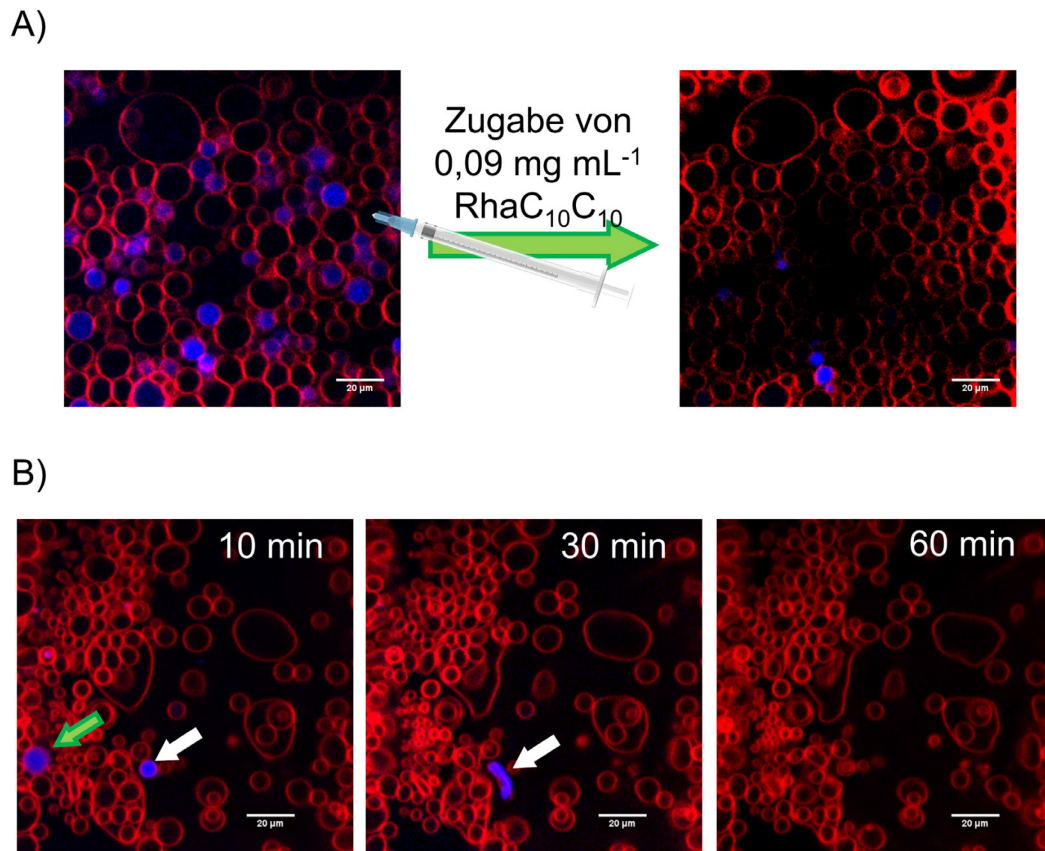
3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Abbildung 3-38: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen im Minutenbereich von GUVs aus DOPC vor und nach Injektion einer RhaC₁₀C₁₀-Lösung. Zeitabhängige konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von DOPC GUVs bei RT vor und nach der Injektion einer 0,09 mg mL⁻¹ RhaC₁₀C₁₀-Lösung (A). Die aufgenommenen Bereiche nach 10, 30 sowie 60 min (B) sind identisch, unterscheiden sich aber von den abgelichteten Bereichen in (A), da es zu einem Ausbleichen der vorhandenen Fluorophore mit der Zeit gekommen ist. Der grüne und weiße Pfeil weist auf GUVs hin, die mit der Zeit ihre blaue Fluoreszenz verlieren und sich verformen. Die Skala entspricht 20 μm. Der verwendete Membran-Fluorophor war *N*-Rh-DHPE (rot) und innerhalb der GUVs wurde ATTO 647 (blau) eingesetzt.

Hier konnten vor allem Verformungen und ein Schrumpfen der GUVs beobachtet werden. Diese Effekte traten wie bisher relativ schnell, innerhalb von 275 s, ein. Die zuvor sphärisch vorliegenden Vesikel waren nun verlängert, oval oder ellipsoid. Auch das eingebrachte ATTO 647 war innerhalb von wenigen Minuten aus den meisten Vesikeln diffundiert. Damit kann gezeigt werden, dass die RhaC₁₀C₁₀ nicht nur die laterale Organisation einer heterogenen Membran, die *l_d*- und *l_o*-Domänen aufweist, beeinflusst, sondern auch Einfluss auf fluide Einkomponenten-Membransysteme hat, indem es *leakage* sowie Größen- und Morphologie-Änderungen hervorruft.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Des Weiteren wurde auch der Einfluss des RLs auf die bakterienähnliche Modellmembran, aus DOPE/DPPG (2:1) bestehend, untersucht. Die GUVs wurden dazu, wie auch zuvor für die GUVs aus anionischer 5-Komponentenmembran mittels Elektroformation präpariert. Ebenfalls wurden wieder die Fluorophore *N*-Rh-DHPE, NBD-DHPE und ATTO 647 eingesetzt, um die verschiedenen Lipidphasen sichtbar zu machen und etwaige *leakage*- sowie „Abknospungsprozesse“ zu verdeutlichen. Wie in Abbildung 3-39 und Abbildung 3-40 zu sehen ist, ist der Einfluss des RhaC₁₀C₁₀ auf bakterielle Modellmembranen weitaus geringer ausgeprägt als auf cholinhaltige Membrantypen, wie sie in Eukaryoten zu finden sind. Die GUVs weisen auch nach einer Stunde lediglich leichte Verformungen auf, wohingegen der Austritt des ATTO 647 und damit ein *leakage*-Prozess nicht beobachtet werden kann. Ferner ist kein Lipid-sortierender Effekt auf die Lipidphasen mit nachfolgender „Abknospung“ der *l_o*-Phase aus den Vesikeln zu beobachten.

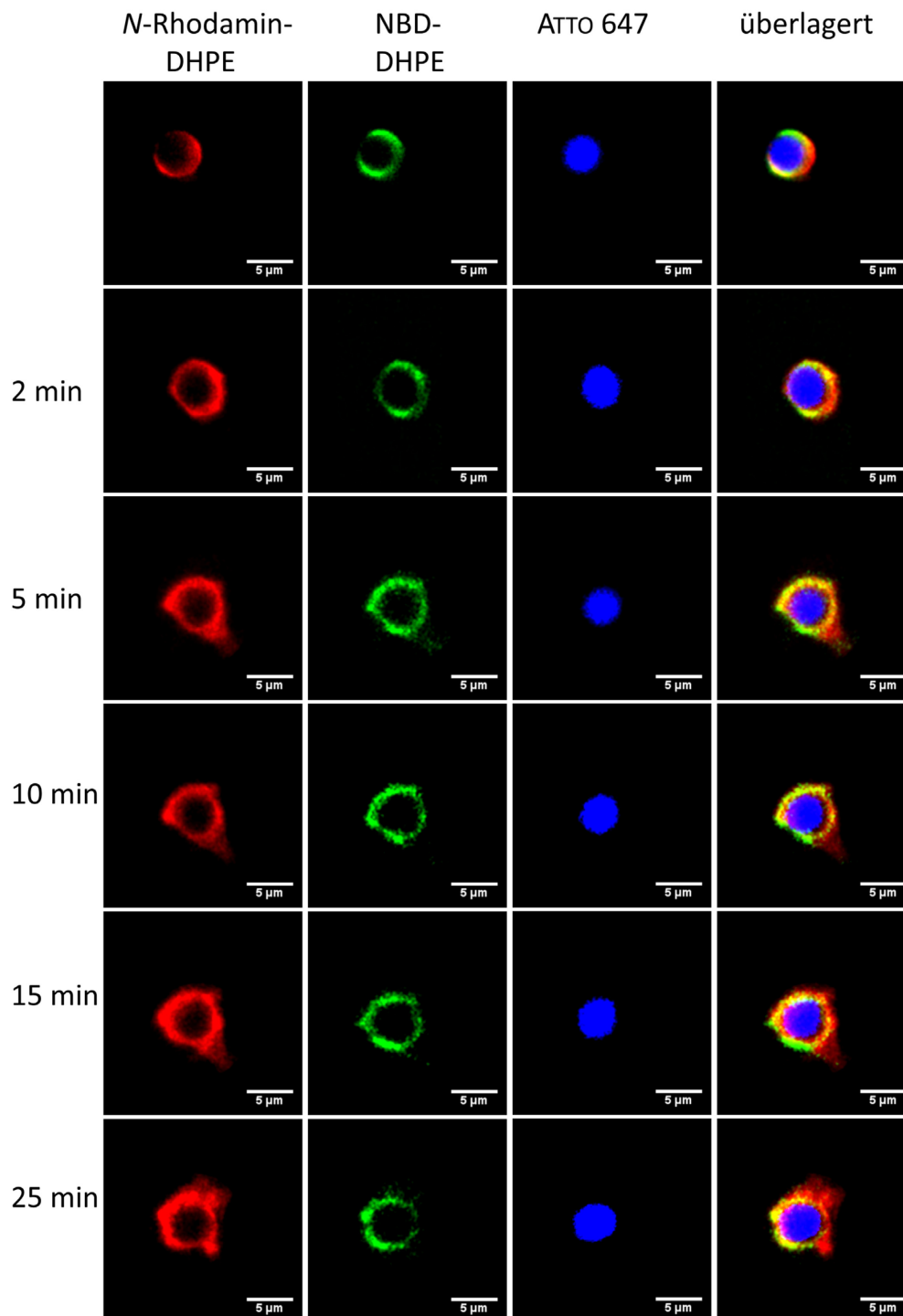
3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Abbildung 3-39: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von DOPE/DPPG (2:1)-GUVs vor und nach Injektion einer RhaC₁₀C₁₀-Lösung. Zeitabhängige konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von DOPE/DPPG (2:1) GUVs bei RT vor und nach der Injektion einer 0,09 mg mL⁻¹ RhaC₁₀C₁₀-Lösung. Die aufgenommenen Bereiche sind miteinander identisch. Die Skala entspricht 5 μm. Der verwendete Membran-Fluorophor war N-Rh-DHPE (rot) sowie NBD-DHPE (grün) und innerhalb der GUVs wurde ATTO 647 (blau) eingesetzt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

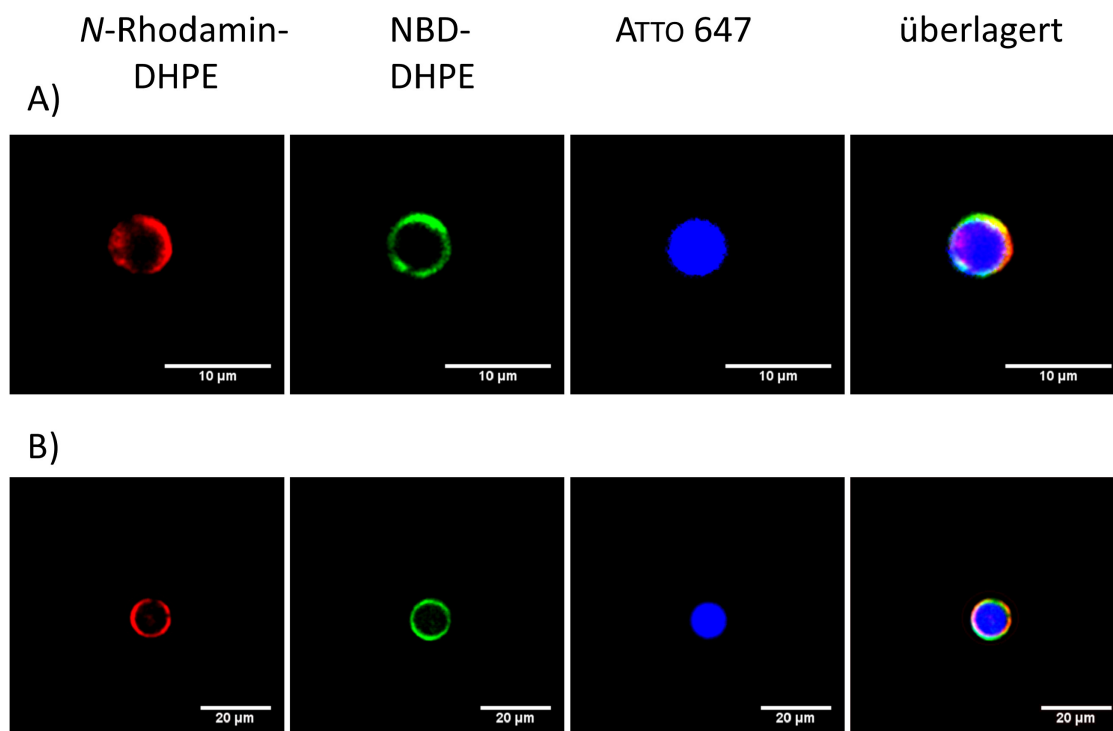


Abbildung 3-40: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von DOPE/DPPG (2:1)-GUVs vor und nach Injektion einer RhaC₁₀C₁₀-Lösung. Zeitabhängige konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von DOPE/DPPG (2:1) GUVs bei RT vor Injektion (A) und 60 Minuten nach der Injektion einer 0,09 mg mL⁻¹ RhaC₁₀C₁₀-Lösung (B). Die aufgenommenen Bereiche sind identisch. Die Skala entspricht 10 μm in (A) und 20 μm in (B). Der verwendete Membran-Fluorophor war *N*-Rh-DHPE (rot) sowie NBD-DHPE (grün) und innerhalb der GUVs wurde ATTO 647 (blau) eingesetzt.

3.4.5 Zusammenfassung

Im Allgemeinen hat der Einbau von Mono- und Dirhamnolipiden ähnliche Auswirkungen auf einfache Phosphatidylcholin-Doppelschichten. Beide stören die Packung der Alkylketten der Phospholipide, was zu einer Abnahme der Kooperativität des Phasenübergangs von Gel- zu flüssig-kristalliner Phase, einer Abnahme der Phasenübergangstemperatur und einer Zunahme der Kopfgruppenhydratation führt, die für die Dirhamnolipide aufgrund ihrer zusätzlichen Hydroxylgruppen der zusätzlichen Rhamnose-Einheit stärker ausgeprägt ist. In Phosphatidylethanolaminmembranen zeigen Mono- und Dirhamnolipide aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülstruktur entgegengesetzte Wirkungen: Monorhamnolipide mit einer kegelförmigen Struktur destabilisieren die lamellaren Phasen, wohingegen Dirhamnolipide mit ihrer sterisch anspruchsvolleren Kopfgruppe fluide lamellare Strukturen im

3.4 Einfluss des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Gegensatz zu hexagonalen Phasen stabilisieren. Hohe Cholesterinkonzentrationen schützen Lipiddoppelschichten und verhindern *leakage*-Prozesse, da Cholesterin eine engere Lipidpackung induziert und den geordneten Phasenzustand der Lipiddoppelschicht stabilisiert. Die Aufnahme des Monorhamnolipids RhaC₁₀C₁₀ in Phospholipiddoppelschichten verändert das Phasenverhalten, die laterale Organisation und die Morphologie deutlich. RhaC₁₀C₁₀ erhöht die Menge an ungeordneten, fluiden l_d-Domänen auf Kosten der dichter gepackten Phasenbereiche höherer Ordnung. Durch Einlagerung in die fluide Phase wird die Doppelschichtdicke in den Bereichen der l_d-Domänen um etwa 1 nm dünner. Infolgedessen werden aufgrund einer veränderten Grenzlinienspannung zwischen den l_o- und l_d-Domänen und Änderungen der Biegesteifigkeit die Morphologie und Größe der Lipidvesikel beobachtet. Es wird sogar ein Abknospen und eine Auftrennung von Vesikeln in Tochtervesikel mit unterschiedlicher Zusammensetzung festgestellt, was mit einem *leakage* des Vesikelinhaltes einhergeht. Diese Informationen werden für verschiedene Anwendungen in der Pharmazie und Biomedizin nützlich sein, z.B. bei der Suche nach neuartigen wirksamen antibakteriellen Verbindungen oder beim Entwurf alternativer Wirkstofftransportsysteme. Aufgrund der großen strukturellen Vielfalt der Rhamnolipide können maßgeschneiderte Designersysteme mit effektiven und spezifischen Eigenschaften realisiert werden.

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

Die hier präsentierten Ergebnisse stammen aus einem Kooperationsprojekt mit der RWTH Aachen, Arbeitsgruppe Prof. Dr. L. BLANK und sind aktuell in Vorbereitung zur Publikation.

3.5.1 Rhamnolipide

Die in Kapitel 3.4 erhaltenen Ergebnisse des Monorhamnolipides RhaC₁₀C₁₀ weisen ein hohes Anwendungspotenzial dieser Lipidspezies in Pharmazie und Biomedizin sowie Biotechnologie auf. Aus diesem Grund soll die nachfolgende Studie den Einfluss der Anzahl an Rhamnose-Einheiten der Rhamnolipide auf verschiedene Lipidmodellmembranen untersuchen. Dabei wird zum ersten Mal überhaupt ein direkter experimenteller Vergleich zwischen den Mono- und Dirhamnolipiden durchgeführt sowie der Einfluss des Moleküls Hydroxy-Decanoyloxy-Decanoat (HAA) auf Lipidmodellmembranen untersucht. Dieses Molekül stellt eine Synthesestufe der Rhamnolipide dar und unterscheidet sich von den hier untersuchten RhaC₁₀C₁₀ und RhaRhaC₁₀C₁₀ durch das Fehlen jeglicher Rhamnose-Einheiten. Eine genaue Beschreibung der Eigenschaften und literaturbekannten Einflüsse von Rhamnolipiden sowie des HAA-Moleküls findet sich in Kapitel 3.4.1 und soll hier nicht noch einmal aufgeführt werden. Die Struktur der drei Moleküle ist in Abbildung 3-41 gezeigt.

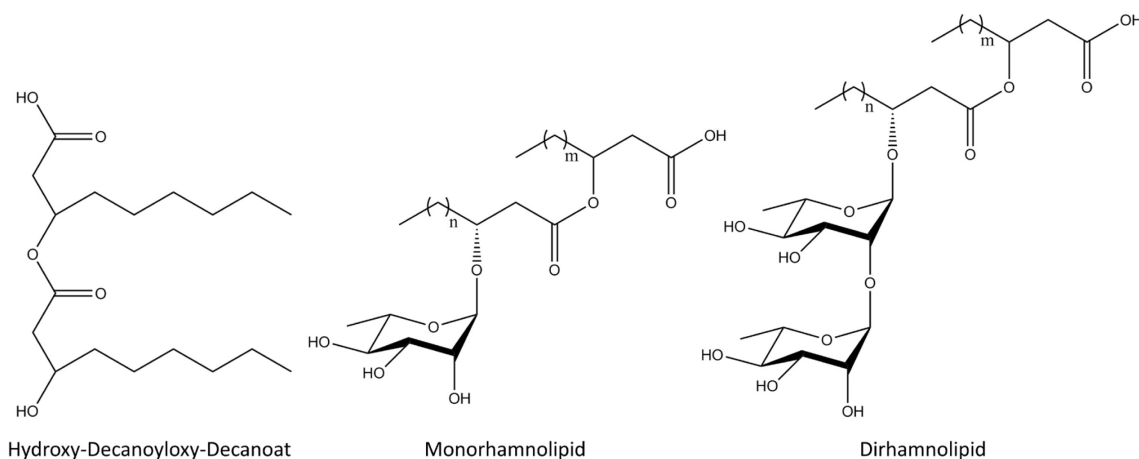


Abbildung 3-41: Chemische Struktur der drei verglichenen Rhamnolipid-Spezies. Schematische Strukturabbildung des HAA sowie eines Mono- und Dirhamnolipids. Für $m, n = 6$ ergeben sich RhaC₁₀C₁₀ und RhaRhaC₁₀C₁₀.

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

3.5.2 DSC-Messungen

Um erste, vergleichende Einblicke in die thermodynamischen Eigenschaften des Phasenübergangs in Gegenwart und Abwesenheit der drei Rhamnolipide zu erhalten, wurden DSC-Messungen durchgeführt. Hierbei wurde der Einfluss von 1, 5 und 10 mol% HAA, RhaC₁₀C₁₀ und RhaRhaC₁₀C₁₀ auf die Phasenübergangstemperatur von DPPC-MLVs untersucht (Abbildung 3-42).

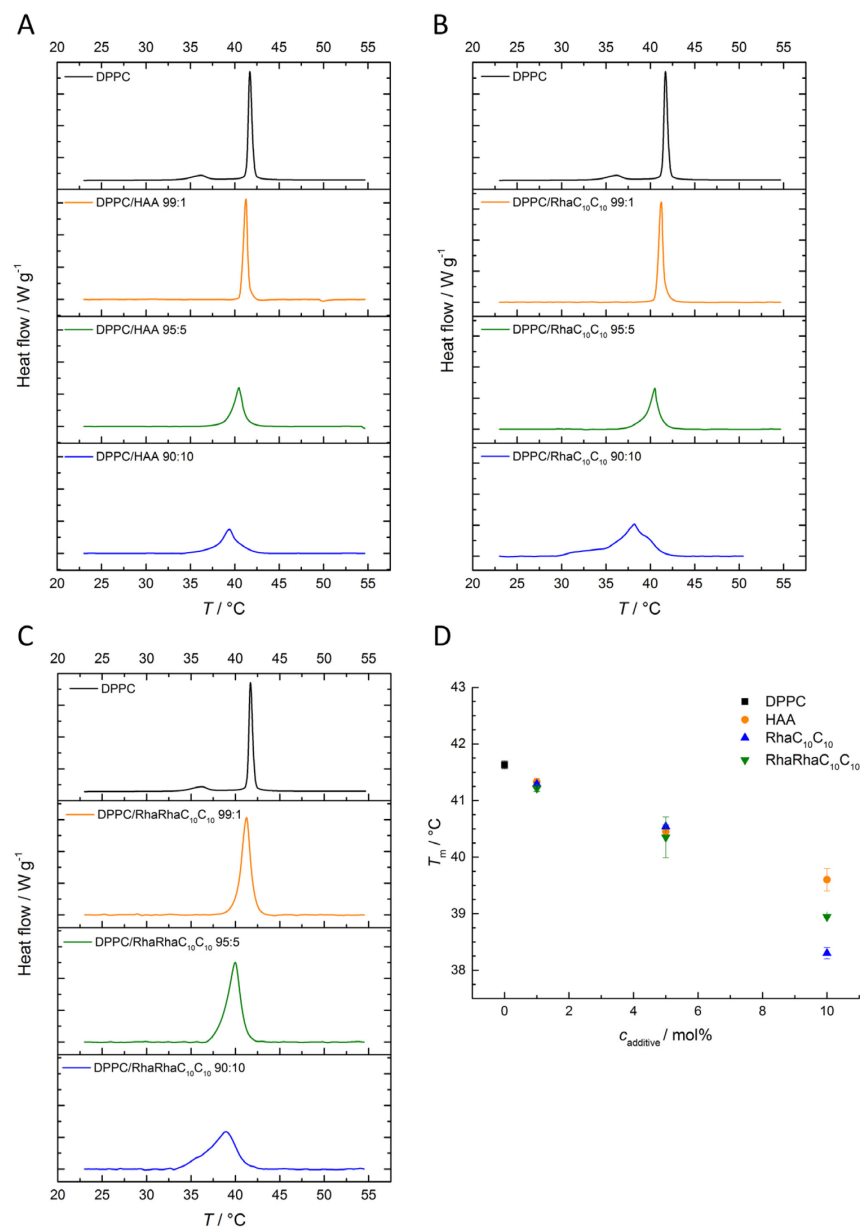


Abbildung 3-42: DSC-Messungen der drei Rhamnolipide eingebaut in DPPC-MLVs. Vergleich der DSC-Messungen von MLVs bestehend aus (A) DPPC/HAA, (B) DPPC/RhaC₁₀C₁₀ und (C) DPPC/RhaRhaC₁₀C₁₀ in Konzentrationen von 100:0, 99:1, 95:5 und 90:10 mol%. (D) zeigt die Auftragung der Phasenübergangstemperatur gegen die Konzentration für die unterschiedlichen Rhamnolipidspesies.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

Im DSC-Thermogramm des reinen DPPC ist der Vorübergang von der $L_{\beta'}$ - zur $P_{\beta'}$ -Phase bei $36,0 \pm 0,5$ °C zu beobachten und ein scharfer Hauptphasenübergangsspeak von der $P_{\beta'}$ - zur L_{α} -Phase bei einer Temperatur von $41,6 \pm 0,1$ °C. Schon bei einer Konzentration von 1 mol% zugegebenem Substrat verschwindet der Peak des Gel-zu-Gel-Vorübergangs für alle drei Rhamnolipide. Bis zu einer Konzentration von 5 mol% sind keine signifikanten Unterschiede im Einfluss der drei Substrate auf das Phasenübergangsverhalten der jeweiligen MLVs zu beobachten. Erst bei einer Konzentration von 10 mol% ist in den Thermogrammen für die DPPC/RhaC₁₀C₁₀ und DPPC/RhaRhaC₁₀C₁₀-Mischungen die Ausbildung von Schultern am Phasenübergangsspeak festzustellen. Dieser Effekt in Kombination mit einer deutlichen Verbreiterung des Phasenüberganges deutet auf eine Phasenseparation durch Einbau der beiden Rhamnolipide hin. Die DPPC/HAA-Mischung hingegen weist lediglich eine Verbreiterung des Phasenübergangsspeaks auf. Die Abnahme der Phasenübergangstemperaturen ist für alle drei Mischungen bis zu einer Konzentration von 5 mol% ähnlich. Auch hier sind Differenzen in den Einflüssen erst bei einer Konzentration von 10 mol% zu sehen. Die Phasenübergangstemperatur sinkt für 10 mol% HAA auf $39,6 \pm 0,2$ °C, für 10 mol% RhaC₁₀C₁₀ auf $38,3 \pm 0,1$ °C und für 10 mol% RhaRhaC₁₀C₁₀ auf $38,9 \pm 0,1$ °C.

3.5.3 Fluoreszenzspektroskopie

Zusätzliche Informationen über den Einfluss der drei Rhamnolipide auf die laterale Ordnung und den temperatur-induzierten Phasenübergang von der Gel- zur fluiden Phase wurden durch temperaturabhängige LAURDAN-Fluoreszenzspektroskopie-Messungen erhalten. Hier wurden, neben den schon in den DSC-Messungen verwendeten DPPC-MLVs, auch Vesikelsysteme bestehend aus DOPE/DPPG (2:1) und der heterogenen anionischen fünf-Komponenten *raft*-Mischung eingesetzt, welche einer bakteriellen bzw. einer eukaryotischen Membran ähneln.^[14,21,22,197] In Abbildung 3-43 sind die Ergebnisse für die DPPC-MLVs mit 1, 5, 10 und 20 mol% eingebautem Rhamnolipid dargestellt.

Bei niedrigen Temperaturen weist DPPC nahezu konstante *GP*-Werte um 0,5 auf. Dies ist charakteristisch für eine in der Gelphase befindliche Membran, die sich vor allem durch hohe laterale Ordnungsparameter und Alkylketten in *all-trans*-Konformation auszeichnet.

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

Dadurch weist die Umgebung des LAURDANS eine niedrige Polarität auf und die Fluoreszenzemissionsintensität besitzt ein Maximum bei 440 nm. Zwischen 41 °C und 42 °C sinken die *GP*-Werte deutlich ab, was durch den Übergang in die fluide Phase ausgelöst wird.

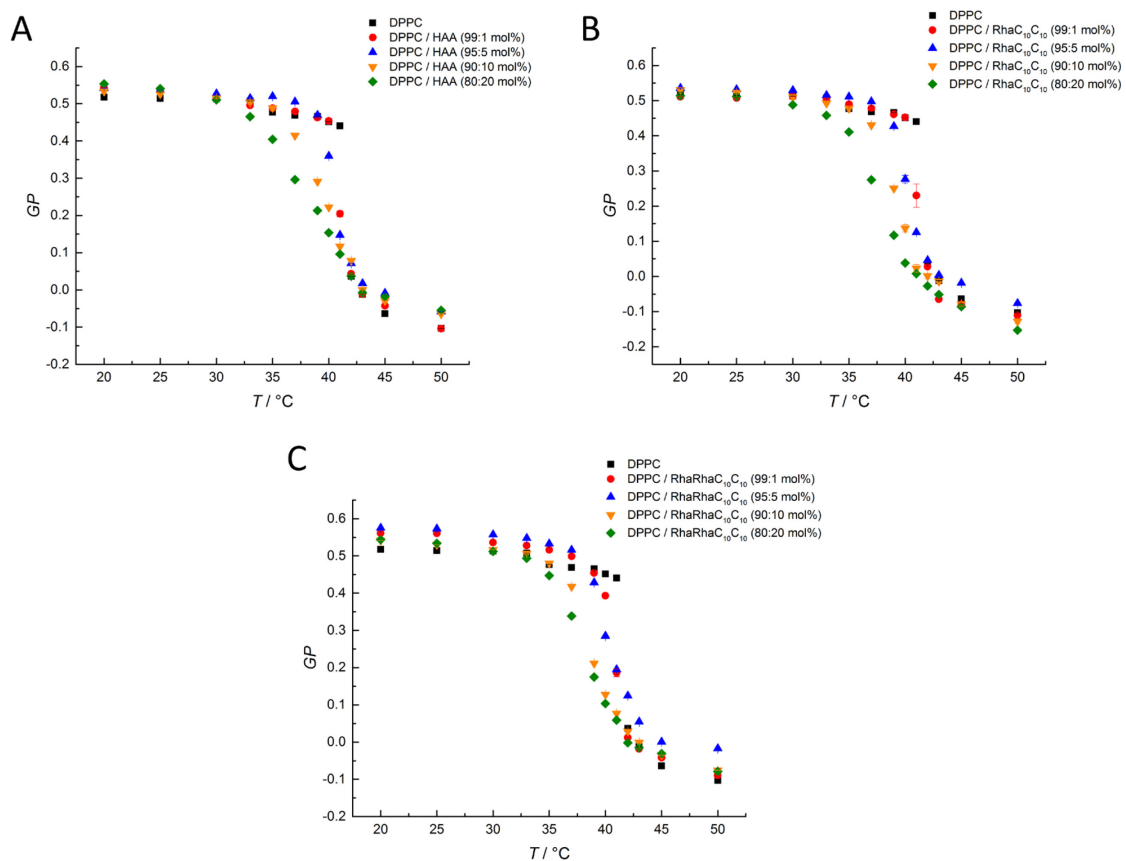


Abbildung 3-43: Temperaturabhängige fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von DPPC-MLVs mit eingebauten Rhamnolipiden. Temperaturabhängige *GP*-Werte einer (A) HAA/DPPC, (B) RhaC₁₀C₁₀/DPPC und (C) RhaRhaC₁₀C₁₀/DPPC-Mischung in molaren Verhältnissen von 0:100, 1:99, 5:95, 10:90 und 20:80 mol%.

Oberhalb dieser Phasenübergangstemperatur T_m zeichnet sich die Membran durch eine erniedrigte laterale Ordnung aus. Diese wird durch eine hohe Mobilität und Unordnung der Alkylketten, die nun in *gauche*-Konformation vorliegen und Kinken aufweisen, verursacht. In diesem Zustand kann das Wasser einfacher in die Kopfgruppenregion der Lipide vordringen und so die Polarität der LAURDAN-Umgebung erhöhen. Dies resultiert in einer Abnahme der Fluoreszenzemissionsintensität bei einer Wellenlänge von 440 nm und einer Zunahme dieser bei einer Wellenlänge von 490 nm. Somit ergibt sich durch Gleichung 2-

3 Ergebnisse und Diskussion

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

10 eine Abnahme der resultierenden *GP*-Werte. Ähnlich zu den Ergebnissen der DSC-Messungen sind die Kurvenverläufe des HAA, RhaC₁₀C₁₀ und RhaRhaC₁₀C₁₀ nahezu identisch. Ein minimaler Unterschied zwischen den drei Rhamnolipiden kann lediglich in der fluiden Phase gesehen werden. HAA und RhaRhaC₁₀C₁₀ erhöhen die *GP*-Werte und besitzen somit einen ordnenden Einfluss, wohingegen das Monorhamnolipid die *GP*-Werte erniedrigt. Des Weiteren kann bei niedrigen Konzentrationen (1-5 mol%) ein geringfügiger Anstieg der lateralen Ordnung bei Einbau des Dirhamnolipids beobachtet werden. Die hier beschriebenen Einflüsse sind jedoch nur von geringer Auswirkung auf die generelle, laterale Ordnung sowie Fluidität der Membran, wodurch ein deutlicher Unterschied zwischen den drei untersuchten Rhamnolipiden nicht eindeutig beobachtet werden kann. T_m sinkt auch hier für alle drei Substrate mit steigender Rhamnolipid-Konzentration, wie es auch schon in den DSC-Messungen zu beobachten war.

Abbildung 3-44A-C zeigt die temperaturabhängigen *GP*-Kurvenverläufe für die heterogene anionische fünf-Komponenten *raft*-Mischung mit 10 bzw. 20 mol% eingebautem Additiv. In Abbildung 3-44D sind die *GP*-Werte des Bakterienmembran-ähnlichen DOPE/DPPG-System unter dem Einfluss von 15 mol% des jeweiligen Rhamnolipids gegen die Temperatur aufgetragen. Der *GP*-Kurvenverlauf des 5 KS weist im Vergleich zum reinen DPPC eine sehr breite Phasenübergangsregion von der l_o - zur l_d -Phase auf. Der Einbau von HAA bewirkt eine konzentrationsabhängige Abnahme von T_m und erhöht die laterale Unordnung in der l_o -Phase ohne eine Beeinträchtigung der lateralen Ordnung in der l_d -Phase (Abbildung 3-44A). Für das Monorhamnolipid ist eine Verbreiterung der Phasenübergangsregion und eine geringfügige Verschiebung der Phasenübergangstemperatur zu geringeren Temperaturen zu sehen (Abbildung 3-44B). Des Weiteren beeinflusst es sowohl die l_o - als l_d -Phase, indem es die laterale Ordnung der geordneten Phase verringert und die der ungeordneten erhöht. Aus diesen Beobachtungen lassen sich signifikante Veränderungen der lateralen Membranorganisation ableiten. Konzentrationsabhängige Unterschiede werden jedoch erst bei Temperaturen ab 60 °C sichtbar. Das Dirhamnolipid bewirkt eine drastische, konzentrationsabhängige Erhöhung der lateralen Ordnung in der l_d -Phase (Abbildung 3-44C). Dieser ordnende Einfluss des Mono- und Dirhamnolipids auf die ungeordnete Phase kann durch einen Kondensationseffekt erklärt werden, welcher mittels FT-IR-

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

Spektroskopie der C = O-Gruppen von Phospholipiden und TMA-DPH-Fluoreszenzpolarisierung nachgewiesen wurde. Der dehydratisierende Effekt basiert dabei auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxylgruppen der Rhamnolipide und den Umgebungswassermolekülen, wodurch diese Wassermoleküle immobilisiert werden. Daraus resultiert eine Abnahme der Wechselwirkungen zwischen den Kopfgruppen der Phospholipide und dem Umgebungswasser. Die resultierende Dehydratation der Phospholipidkopfgruppen bewirkt eine Versteifung der Membrangrenzfläche, was zu einem Anstieg der Hydrophobizität der Membranoberfläche führt ^[278] und unter anderem, verantwortlich für die Freisetzung von Lipopolysacchariden aus der bakteriellen Außenmembran ist. ^[231] Da Monorhamnolipide weniger Hydroxylgruppen als Dirhamnolipide aufweisen, wurde für diese ein schwächerer Kondensationseffekt beobachtet. ^[289,296]

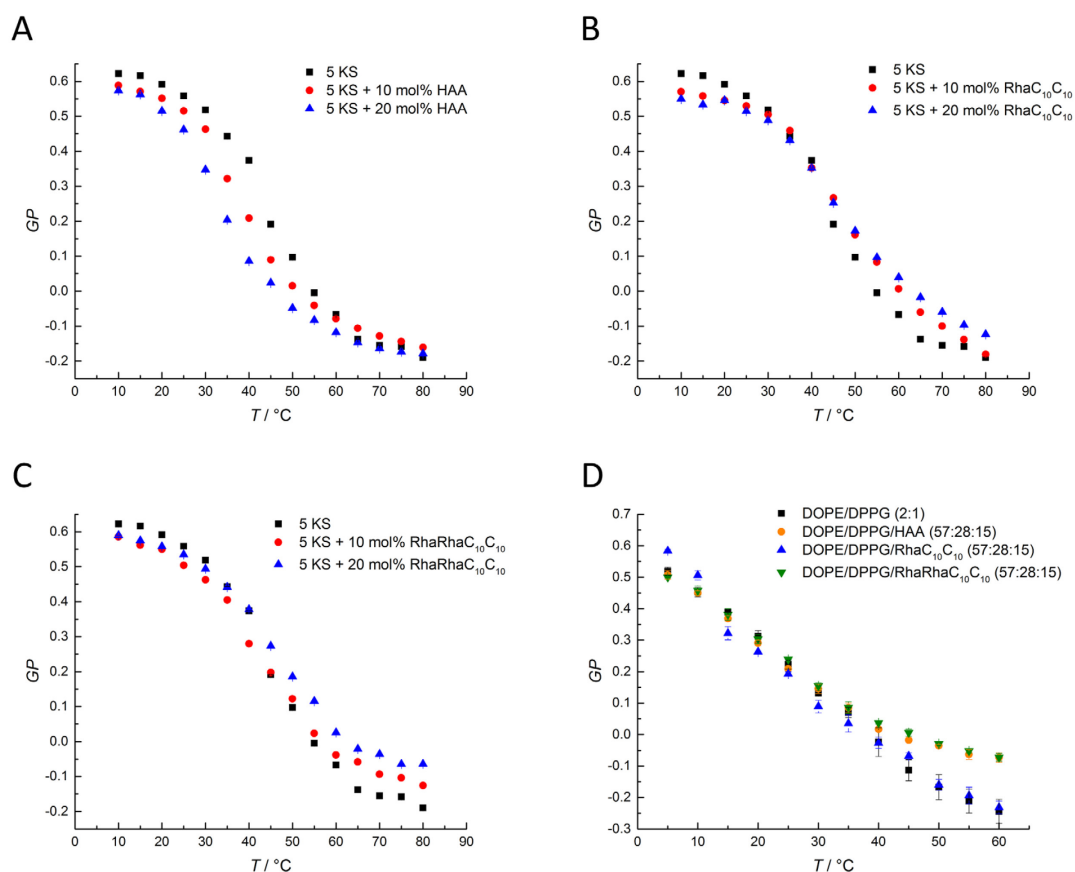


Abbildung 3-44: Temperaturabhängige GP-Werte für die drei Rhamnolipide eingebaut in ein eukaryotisches und bakterielles Modellmembransystem. Temperaturabhängige GP-Werte einer (A) HAA/5 KS, (B) RhaC₁₀C₁₀/5 KS und (C) RhaRhaC₁₀C₁₀/5 KS-Mischung in molaren Verhältnissen von 0:100, 10:90, und 20:80 mol% sowie (D) DOPE/DPPG (2:1)-Mischung mit jeweils 15 mol% von HAA, RhaC₁₀C₁₀ und RhaRhaC₁₀C₁₀ eingebaut.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

In Abbildung 3-44D sind die temperaturabhängigen *GP*-Kurvenverläufe für eine bakterielle Modellmembran bestehend aus DOPE/DPPG (2:1) ohne und mit 15 mol% eingebauten Rhamnolipiden dargestellt. Für das reine DOPE/DPPG-System ist eine fast lineare Abnahme der *GP*-Werte bis 45 °C zu erkennen. Bei einer weiteren Temperaturerhöhung beginnt die Kurve langsam abzuflachen. Dieser relativ breite Phasenkoexistenzbereich kann durch das Auftreten verschiedener Phasenübergänge der einzelnen Lipidspezies dieser Mischung erklärt werden.^[319] Der Einbau des untersuchten Monorhamnolipids zieht keinerlei Veränderung des Kurvenverlaufs im Vergleich zum reinen System nach sich. HAA und das Dirhamnolipid hingegen bewirken eine Abflachung des Kurvenabfalls bei Temperaturen ab 40 °C und damit eine Zunahme der lateralen Ordnung des Systems.

3.5.4 AFM-Messungen

Für weitere und detailliertere Einblicke in die Wechselwirkungen zwischen den Rhamnolipiden und der heterogenen anionischen fünf Komponenten *raft*-Membran wurden AFM-Messungen durchgeführt. Hierbei wurden die Rhamnolipide zum einen in einer Konzentration von 10 mol% in die Lipiddoppelschicht während der Membranpräparation eingefügt und zum anderen nachträglich zu einer fertig ausgebildeten Lipiddoppelschicht des reinen 5 KS mittels Spritze in einer Konzentration von 0,09 mg mL⁻¹ in Pufferlösung zugegeben. In den nachfolgenden Abbildungen ist daher eine nachträgliche Injektion der Rhamnolipide mit der schematischen Darstellung einer Spritze gekennzeichnet. Zusätzlich zu den drei Rhamnolipid-Molekülen wurde auch eine Mischung dieser, im Folgenden als RI-Mix bezeichnet, injiziert. Diese Mischung bestand aus 15 mol% HAA, 34 mol% RhaC₁₀C₁₀ und 51 mol% RhaRhaC₁₀C₁₀ und wurde aufgrund mehrerer Literaturangaben bezüglich der von Bakterien produzierten, natürlichen Mischung von Rhamnolipid-Kongeneren ausgewählt, um eine möglichst naturähnliche Mischung von Rhamnolipiden zu gewährleisten.^[200,208,215,242,301,320] Die natürlich produzierten Rhamnolipid-Mischungen bestehen in der Regel aus mehr als drei Rhamnolipid-Kongeneren, die sich zusätzlich zur Anzahl der Rhamnose-Einheiten der Kopfgruppe auch in der Länge ihrer Alkylketten unterscheiden.^[195] Abbildung 3-45 zeigt die Veränderung^[195] der 5 KS-Doppelschicht nach Injektion der 0,09 mg mL⁻¹ konzentrierten Rhamnolipidlösungen in Puffer. Des Weiteren ist auch die

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

Änderung der Höhendifferenz nach Injektion der jeweiligen Rhamnolipid-haltigen Lösungen zwischen der l_o - und l_d -Phase, normiert auf die Höhendifferenz der beiden Phasen vor der Injektion, aufgetragen. Die Normierung war erforderlich, da die einzelnen, reinen 5 KS-Doppelschichten, zu denen die Rhamnolipid-Lösungen injiziert worden sind, schon ergebnisrelevante Höhenunterschiede untereinander aufwiesen. Dies ist auf minimale Unterschiede in den Präparationsbedingungen, wie die verwendeten Mica-Oberflächen, zurückzuführen. Durch die Normierung wird so eine Vergleichbarkeit der einzelnen Proben gewährleistet. Quantitative Unterschiede zwischen der l_o - und l_d -Phase sind in Tabelle 3-5 aufgeführt.

Wie auch schon in Kapitel 3.4.3 ist die cholesterinhaltige l_o -Phase in einem Hellbraun und die um 1 nm dünnere l_d -Phase dunkelbraun dargestellt. Die ungeordnetere Phase zeichnet sich durch einen hohen Anteil an DOPC-Lipiden aus.^[1,316,317] Nach der Injektion von $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ konzentrierter HAA- und RhaC₁₀C₁₀-Lösung zu der gebildeten Lipiddoppelschicht ist eine unmittelbare Verdopplung der Höhendifferenz zwischen der l_o - und l_d -Phase festzustellen. Möglicherweise resultiert diese Zunahme aus dem Einbau der beiden Moleküle in die l_d -Phase, welche dadurch fluider und um etwa 1 nm dünner wird. Die Zunahme der Lipidschichtdickendifferenz um 1 nm wurde ebenfalls bei ABBASI *et al.* für eine DPPC-Membran mit eingebautem Monorhamnolipid bei 25 °C mittels SAXS-Messungen berichtet.^[289] Des Weiteren wird durch die Einlagerung von HAA und RhaC₁₀C₁₀ in die Lipiddoppelschicht die Grenzflächenspannung zwischen geordneten und ungeordneten Domänen erhöht, wodurch die l_o -Phase eingeengt wird.

Im Gegensatz zu diesen beiden Molekülen zeigt das RhaRhaC₁₀C₁₀ keine signifikanten Auswirkungen nach seiner Injektion auf die Lipiddoppelschicht. Ungestörte l_o - und l_d -Domänen sind auch weiterhin zu beobachten. Ein möglicher Grund dafür kann in der Bildung von Dirhamnolipid-angereicherten Aggregaten oder Mizellen liegen, die sich auf der Membranoberfläche ansammeln und die Abbildung dieser mittels AFM stören, anstatt sich in der heterogenen Membran zu verteilen. Je mehr Rhamnose-Einheiten vorhanden sind, desto sperriger wird das Molekül und eine dichte Packung wird schwieriger. Dies resultiert in der Bildung sphärischer Mizellen bzw. großer Mizellen bei geringen respektive hohen Dirhamnolipid-Konzentrationen. Monorhamnolipide hingegen bilden in geringer Konzentration große Mizellen und in hohen Konzentrationen vorliegend planare Vesikel-ähnliche Strukturen.^[219]

3 Ergebnisse und Diskussion

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

Nach der Injektion des RI-Mix zur reinen 5 KS-Membran sind alle oben beschriebenen Auswirkungen in etwas abgemilderter Form zu beobachten. Sowohl eine Verdoppelung der Höhendifferenz zwischen den geordneten und ungeordneten Domänenbereichen mit einhergehender Veränderung der Domänenstruktur sowie die Bildung und Ansammlung von Aggregaten bzw. Mizellen auf der Membranoberfläche konnte hier festgestellt werden.

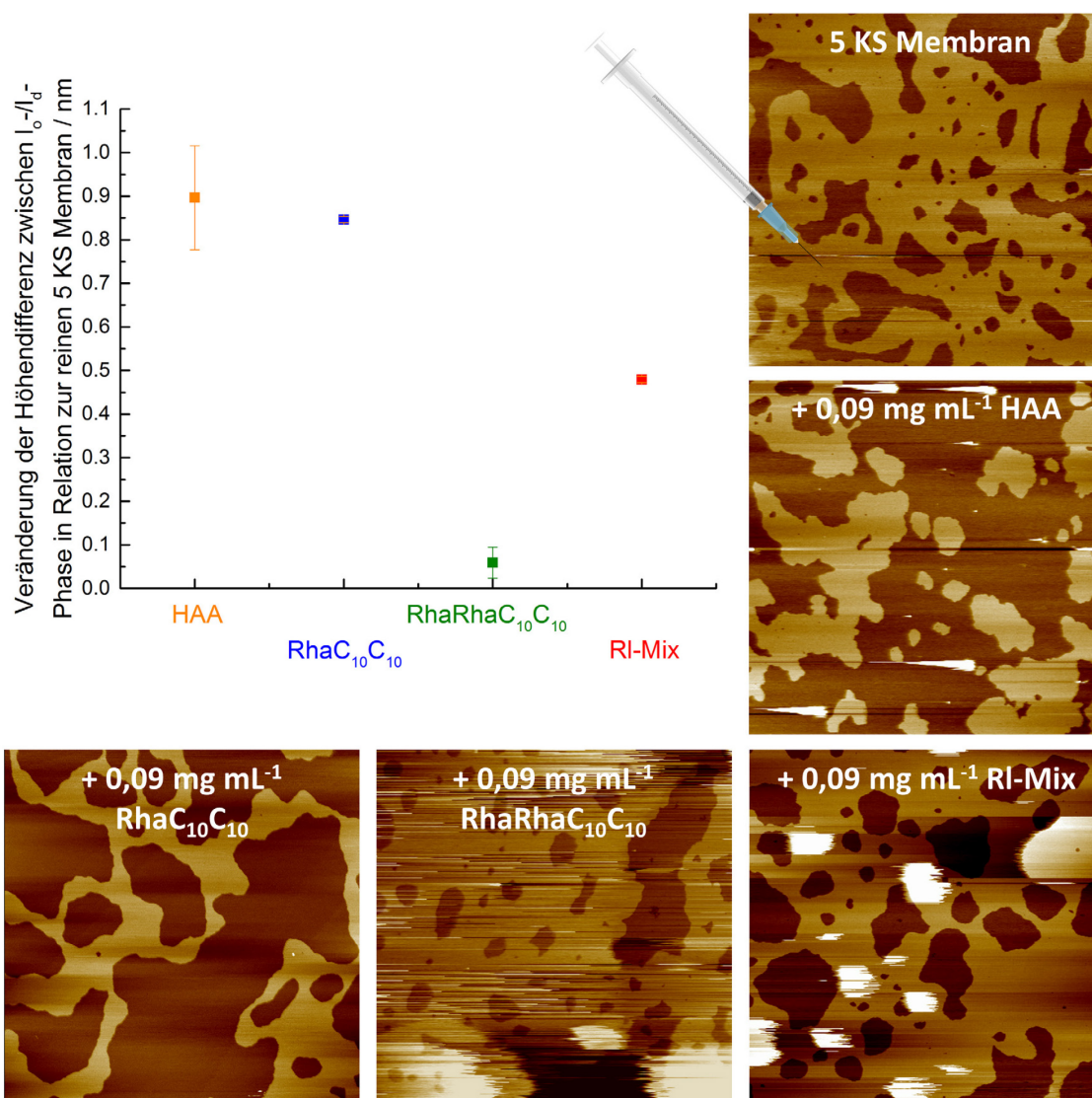


Abbildung 3-45: AFM-Messungen der reinen 5 KS-Lipiddoppelschicht vor und nach Injektion $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ Rhamnolipid-haltiger Lösungen. Ausgewählte AFM-Messungen einer reinen 5 KS-Lipiddoppelschichtoberfläche vor und unmittelbar nach Injektion einer $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ HAA, RhaC₁₀C₁₀, RhaRhaC₁₀C₁₀ und RI-Mix-haltigen Lösung bei RT. Zusätzlich wurde noch die normierte Veränderung der Höhendifferenz zwischen der l_o - und l_d -Phase in Relation zum reinen 5 KS (Abszisse bei null) nach Injektion der jeweiligen Lösung aufgetragen.

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

Tabelle 3-5: Mittels AFM erhaltene, gemittelte Höhenunterschiede zwischen der l_0 - und l_d -Phase vor und nach Injektion der $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ konzentrierten Rhamnolipid-haltigen Lösungen zu einer 5 KS-Doppelschicht.

Lipidsystem	gemittelte Höhendifferenz l_0 - / l_d -Phase
reines 5 KS	$1,3 \pm 0,2 \text{ nm}$
+ $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ HAA	$2,5 \pm 0,3 \text{ nm}$
+ $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ RhaC ₁₀ C ₁₀	$2,0 \pm 0,1 \text{ nm}$
+ $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ RhaRhaC ₁₀ C ₁₀	$1,6 \pm 0,3 \text{ nm}$
+ $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ RI-Mix	$2,1 \pm 0,1 \text{ nm}$

Um eine auftretende Aggregation bzw. Mizellbildung zu verhindern und eine bessere Durchmischung der Lipidmembran zu erreichen, wurden die drei Rhamnolipid-Moleküle auch in die heterogene, anionische 5 KS-Membran während der Präparation eingebaut und nicht erst nach Ausbildung der Membrandoppelschicht dazugegeben. Somit wurden drei neuartige 6-Komponenten-Membransysteme hier vermessen. Die Konzentration der Rhamnolipid-Moleküle in ihrem jeweiligen Membransystem betrug 10 mol%. Wie in Abbildung 3-46 gesehen werden kann, kam es in diesem Fall zu keinen Aggregationserscheinungen. Dafür konnten neue Effekte beobachtet werden, welche auf eine höhere, in der Membran befindliche, Konzentration und eine gute Durchmischung der Lipidkomponenten zurückzuführen sind. Ein Anteil von 10 mol% HAA in der Membran bewirkte eine signifikante Abnahme der Größe der l_d -Domänen, deren Durchmesser mittels *ImageJ* auf unter 40 nm bestimmt werden konnte (Abbildung 3-46A). Dieses Verschwinden der Phasentrennung und die Ausbildung einer einzelnen, homogenen, *raft*-ähnlichen Lipidphase wurde auch für hohe Cholesterinkonzentrationen (33- 50 mol%) in einer Lipiddoppelschicht berichtet.^[321] Bei geringeren Cholesterinkonzentrationen traten, ähnlich wie in Abbildung 3-45 beobachtet, unregelmäßig geformte und in ihrer Größe deutlich variierende l_0 -Domänen auf. Möglicherweise verdickt HAA eine phosphocholinhaltige Membran, ähnlich wie Cholesterin, durch eine in Relation zur Doppelschichtebene senkrechte Umorientierung der Lipidmoleküle.^[321] Für 10 mol% Monorhamnolipid-Anteil in der Lipiddoppelschicht konnte eine deutliche Krümmung der Membran (Abbildung 3-46B) beobachtet werden. Dies ist besonders in Abbildung 3-46E herausgestellt. Grund für diese Krümmung könnte die konische Form und die lamellare Doppelschichten destabilisierende Natur des Monorhamnolipids sein.^[11,199,278] Auch das Dirhamnolipid hatte hier nun in höherer Konzentration einen Effekt auf die Domänengröße, -struktur und die Phasenverteilung (Abbildung

3 Ergebnisse und Diskussion

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

3-46D). Eine klare Abgrenzung, wie auch schon für das HAA und Monorhamnolipid konnte hier beobachtet werden. Die Auswertung der Höhendifferenzen (Tabelle 3-6) zwischen den beiden Domänenbereichen brachte keinerlei neue Informationen und war konsistent mit denen aus Tabelle 3-5.

Tabelle 3-6: Mittels AFM erhaltene, gemittelte Höhenunterschiede zwischen der l_o - und l_d -Phase der 5 KS-Membran ohne und mit 10 mol% eingebautem HAA, RhaC₁₀C₁₀, RhaRhaC₁₀C₁₀ bei RT. Aufgrund der induzierten Krümmung sind zwei Werte für das Monorhamnolipid angegeben.

Lipidsystem	gemittelte Höhendifferenz l_o -/ l_d -Phase
reines 5 KS	$1,3 \pm 0,2$ nm
DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/Cholesterin/HAA (40,5:4,5:18:4,5:22,5:10 mol%)	$2,0 \pm 0,3$ nm
DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/Cholesterin/RhaC ₁₀ C ₁₀ (40,5:4,5:18:4,5:22,5:10 mol%)	$2,5 \pm 0,2$ nm / $1,7 \pm 0,2$ nm
DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/Cholesterin/RhaRhaC ₁₀ C ₁₀ (40,5:4,5:18:4,5:22,5:10 mol%)	$1,2 \pm 0,1$ nm

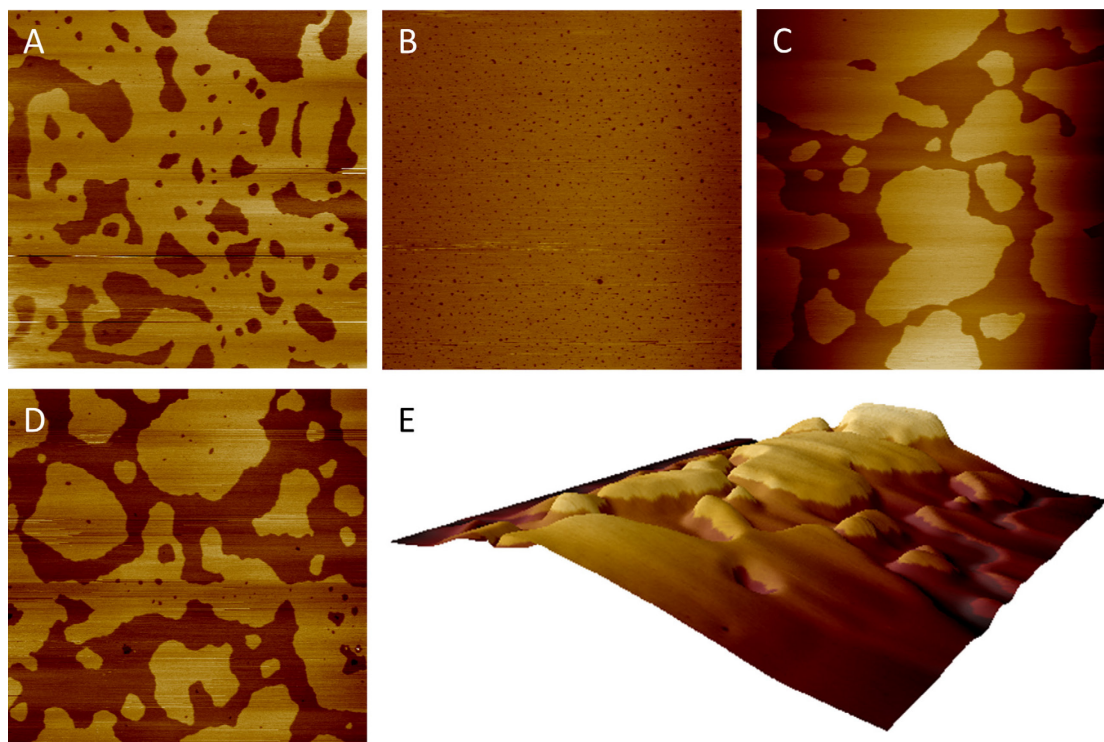


Abbildung 3-46: AFM-Messungen der reinen 5 KS-Lipiddoppelschicht sowie der Doppelschichten mit 10 mol% eingebauten Rhamnolipiden. Ausgewählte AFM-Messungen einer Lipiddoppelschichtoberfläche des (A) reinen 5 KS, (B) 5 KS + 10 mol% HAA, (C) 5 KS + 10 mol% RhaC₁₀C₁₀ und (D) 5 KS+ 10 mol% RhaRhaC₁₀C₁₀ bei RT sowie (E) die dreidimensionale Darstellung der 5 KS-RhaC₁₀C₁₀-Membranoberfläche zur besseren Darstellung der induzierten Krümmung.

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

3.5.5 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Um die bisher gewonnenen Erkenntnisse zu vervollständigen, wurden noch konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Messungen durchgeführt. Bei diesen werden Veränderungen der Morphologie und des Phasenverhaltens auf der μm -Skala sichtbar. Der Fokus der Untersuchungen lag auch hier auf dem anionischen, heterogenen fünf-Komponenten *raft*-System, dessen l_d -Phase und l_o -Phase mittels dem fluoreszenzmarkierten *N*-Rh-DHPE (rot) bzw. NBD-DHPE (grün) kenntlich gemacht worden sind. Wie auch in Kapitel 3.4.4 wurde zur Durchführung eines *Leakage*-Assays ATTO 647 (blau) in die gebildeten GUVs eingebracht und wie im Kapitel 3.5.4 der Einfluss der drei Rhamnolipide nach Injektion zu bereits gebildeten 5 KS-GUVs sowie bei Einbau während der GUV-Präparation bei RT untersucht und verglichen. Die Injektion einer $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ Rhamnolipid-haltigen Lösung zu bereits gebildeten GUVs wurde auch hier wieder mit einer schematischen Abbildung einer Spritze in der Abbildung gekennzeichnet. Des Weiteren wurden auch temperaturabhängige, mikroskopische Untersuchungen der Rhamnolipid-5 KS-GUVs vorgenommen. Hierbei wurden die Rhamnolipide ebenfalls schon während der Präparation zugegeben, um eine bessere Durchmischung und definierte sowie höhere Konzentration in den Vesikeln zu erlangen. Zuerst sind hier wieder die Mikroskopie-Aufnahmen der 5 KS vor und nach Injektion der Rhamnolipid-haltigen Lösungen bei RT gezeigt. In Abbildung 3-47 und Abbildung 3-48 ist der Einfluss der Injektion einer $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ konzentrierten HAA-Puffer-Lösung auf bereits geformte GUVs dargestellt. Vor Injektion des HAA ist eine deutliche Phasenseparation der GUVs in die l_d - (rot) und l_o - (grün) Phasen zu erkennen. Ferner sind einige der Vesikel mit ATTO 647 (blau) gefüllt. Unmittelbar nach Injektion des HAA ist eine Veränderung der Phasenseparation festzustellen. Viele der vormals phasensepariert vorliegenden Vesikel weisen nach der Injektion nur noch eine der beiden Phasendomänen auf. Durch Auswaschen während der Injektion und Ablösen einiger Vesikel von der Deckglasoberfläche, nimmt der relative Anteil der l_o -Phase und l_d -Phase in den beobachteten Bildausschnitten während des gesamten Beobachtungszeitraums ab. Dabei sinkt der relative Anteil der l_o -Phase wesentlich signifikanter als der Anteil der l_d -Phase. Dies ist auf ein „Abknospen“ der l_d -Domänen in aggregierte, vesikuläre oder mizellare Strukturen zurückzuführen (Abbildung 3-48). Die genaue Veränderung der Anteile kann Abbildung 3-54A entnommen werden. Nach Erreichen eines Gleichgewichtszustandes liegen die meisten Vesikel nur

3 Ergebnisse und Diskussion

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

noch in einer der beiden Phasen vor. Zudem sind die Vesikel auch merklich kleiner geworden, was auf ein „Abknospen“ oder eine Teilung der Vesikel, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, hinweist. Der Anteil mit ATTO 647 gefüllter GUVs nimmt auch zeitlich betrachtet nach der Injektion ab, jedoch kommt es nicht zu einer vollständigen Freisetzung des Fluorophors aus allen Vesikeln.

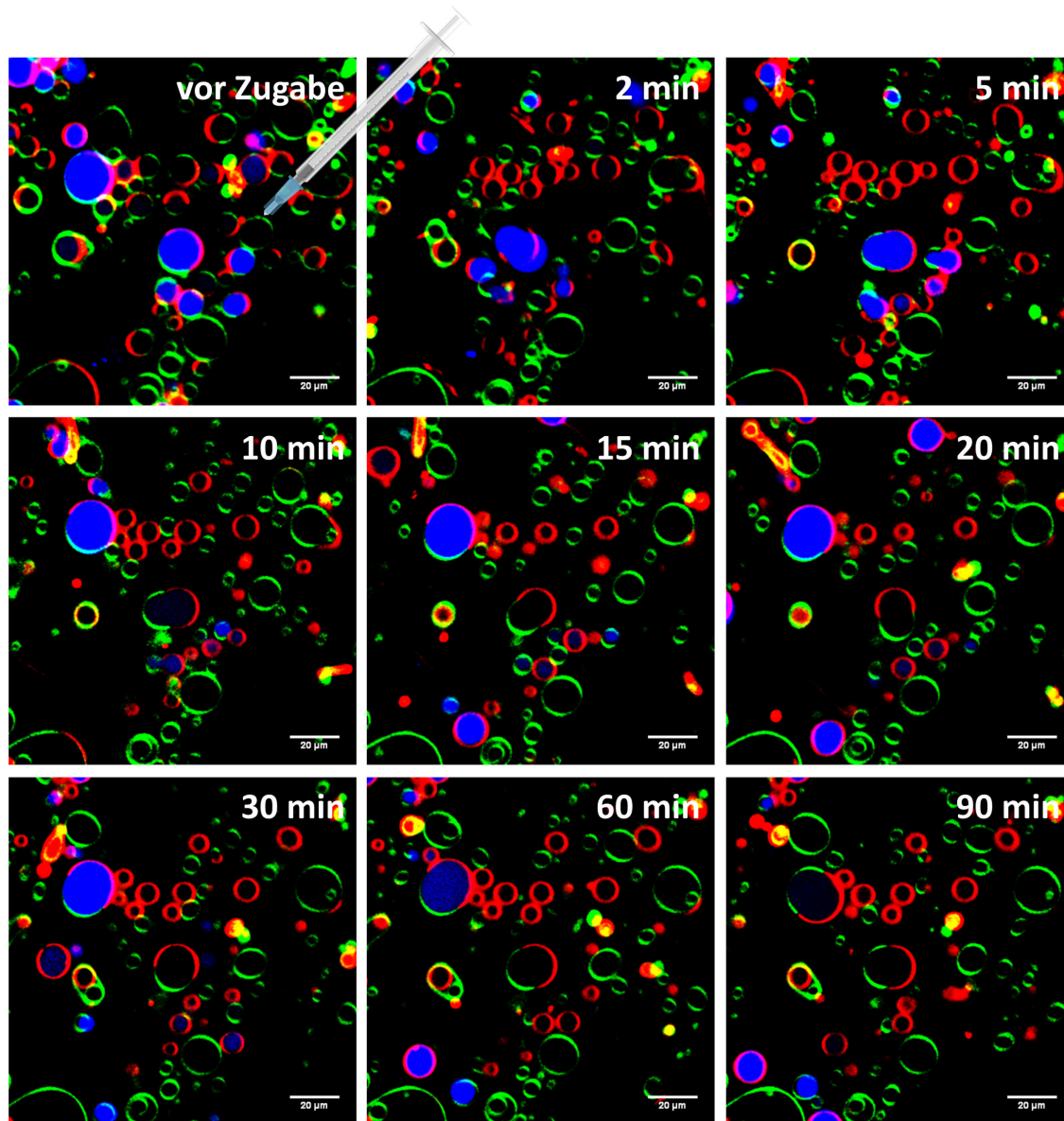


Abbildung 3-47: Injektion des HAA zu heterogenen anionischen 5 KS-GUVs. Detaillierte zeitabhängige konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs einer anionischen 5 KS-raft Lipidmischung bei RT vor und nach der Injektion einer $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ HAA-Lösung. Der aufgenommene Bereich war über die gesamte Zeit derselbe. Die Skala entspricht $20 \mu\text{m}$. Die verwendeten Membran-Fluorophore waren NBD-DHPE (grün; l_o -Phase), *N*-Rh-DHPE (rot; l_d -Phase) und innerhalb der GUVs wurde ATTO 647 (blau) eingesetzt.

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

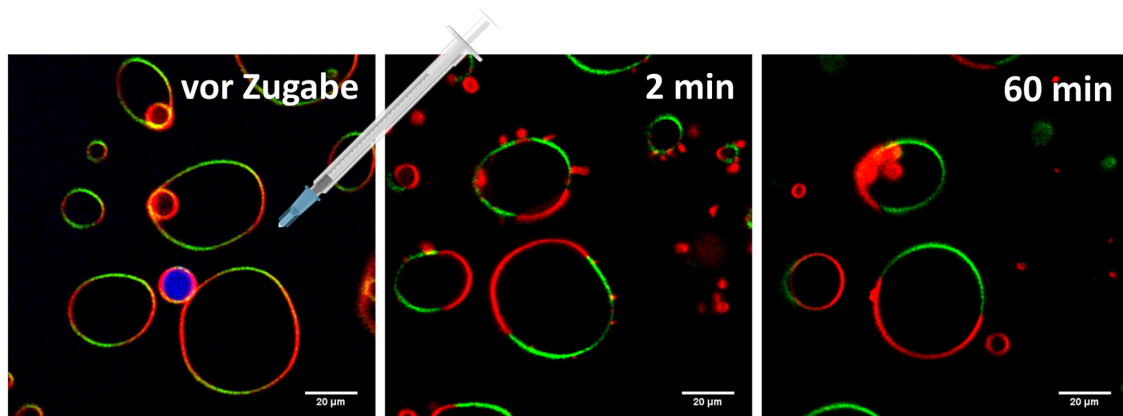


Abbildung 3-48: Detaillierte Darstellung des „Abknospens“ der l_d -Domänen. Zeitabhängige konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs einer anionischen 5 KS-raft Lipidmischung bei RT vor und nach der Injektion einer $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ HAA-Lösung. Der aufgenommene Bereich war über die gesamte Zeit derselbe. Die Skala entspricht $20 \mu\text{m}$. Die verwendeten Membran-Fluorophore waren NBD-DHPE (grün; l_o -Phase), *N*-Rh-DHPE (rot; l_d -Phase) und innerhalb der GUVs wurde ATTO 647 (blau) eingesetzt. In dieser Abbildung ist das „Abknospens“ der l_d -Phase der GUVs in Aggregate oder kleinere Vesikel zu erkennen.

Da der Einfluss des Monorhamnolipids, RhaC₁₀C₁₀, auf Modellmembranen schon eingehend in Kapitel 3.4 erläutert wurde, soll hier nur kurz auf die wesentlichen beobachteten Einflüsse und Wechselwirkungen eingegangen werden (Abbildung 3-49). Im Vergleich zum HAA bewirkt die Injektion des RhaC₁₀C₁₀ eine unmittelbare deutliche Erhöhung des Anteils an l_d -Phasenbereichen in der Membran und nahezu vollständige Freisetzung des ATTO 647. Nach 2 Minuten beträgt der Anteil an ungeordneten Domänen in den Vesikeln das Zweifache und nach 90 Minuten das Fünf- bis Sechsfache des Wertes vor der Injektion des Monorhamnolipids. Des Weiteren kann auch eine Phasenseparation der GUVs beobachtet werden, die in der Bildung zweier Tochtervesikel resultiert, die jeweils nur noch aus einer geordneten oder ungeordneten Domäne bestehen. Dabei weisen die Vesikel, welche in der l_o -Phase vorliegen, Deformationen auf.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

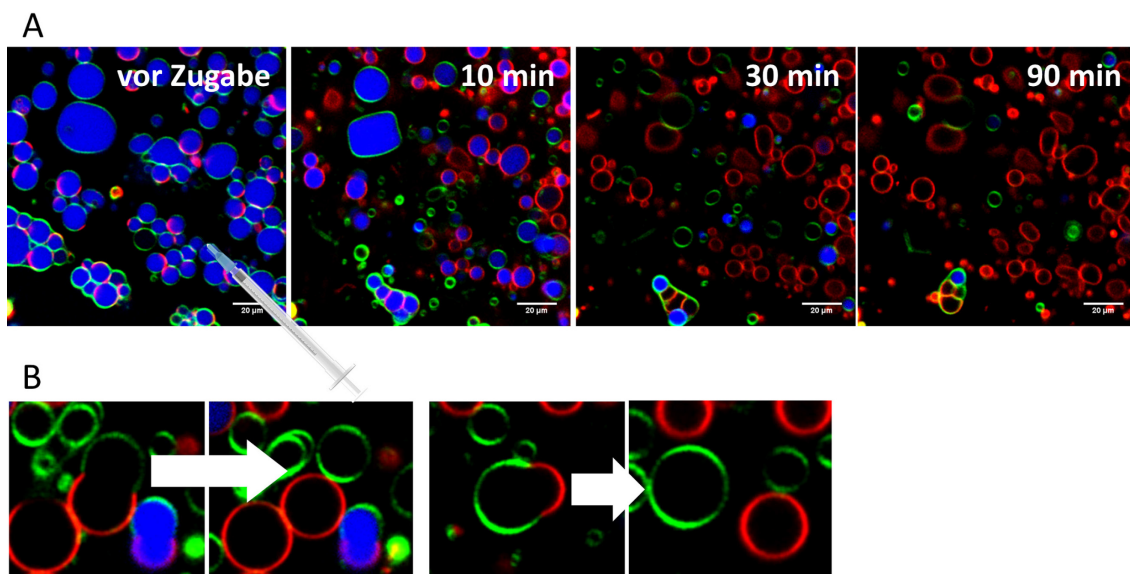


Abbildung 3-49: Injektion des RhaC₁₀C₁₀ zu heterogenen, anionischen 5 KS-GUVs. (A) Zeitabhängige konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs einer anionischen 5 KS-raft Lipidmischung bei RT vor und nach der Injektion einer 0,09 mg mL⁻¹ RhaC₁₀C₁₀-Lösung. In (B) ist die Trennung der l_o-Phase und l_d-Phase zweier GUVs in jeweils zwei neue kleinere GUVs vergrößert dargestellt (s. weiße Pfeile). Die aufgenommenen Bereiche waren über die gesamte Zeit dieselben. Die Skala entspricht 20 µm. Die verwendeten Membran-Fluorophore waren NBD-DHPE (grün; l_o-Phase), N-Rh-DHPE (rot; l_d-Phase) und innerhalb der GUVs wurde ATTO 647 (blau) eingesetzt.

Für das Dirhamnolipid RhaRhaC₁₀C₁₀ (Abbildung 3-50) konnte im untersuchten Messzeitraum eine deutliche Abnahme der Zahl der Vesikel festgestellt werden. Diese lösten sich von dem ITO-Deckglas nach Injektion des Dirhamnolipids teilweise ab und diffundierten durch die Probe. Dadurch ist eine Auswertung der Veränderung des Anteils der jeweiligen Phase im Bildausschnitt nur unter Vorbehalt möglich (Abbildung 3-54C).

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

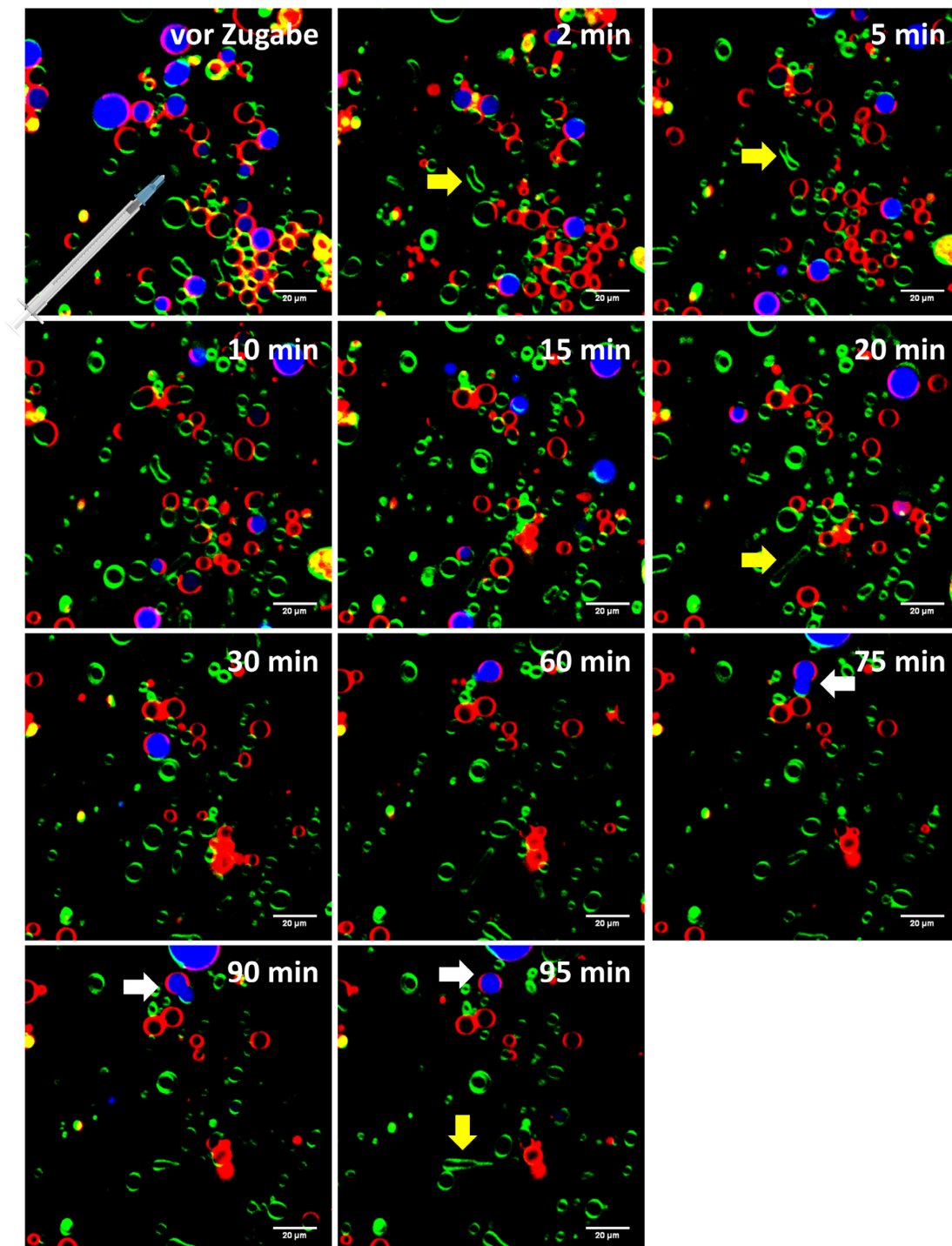


Abbildung 3-50: Injektion des RhaRhaC₁₀C₁₀ zu heterogenen anionischen 5 KS-GUVs. Detaillierte zeitabhängige konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs einer anionischen 5 KS-raft Lipidmischung bei RT vor und nach der Injektion einer 0,09 mg mL⁻¹ RhaRhaC₁₀C₁₀-Lösung. Die Trennung der l_o-Phase und l_d-Phase eines GUVs in zwei neue kleinere GUVs ist mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Gelbe Pfeile weisen auf deformiert vorliegende GUVs hin. Der aufgenommene Bereich war über die gesamte Zeit derselbe. Die Skala entspricht 20 µm. Die verwendeten Membran-Fluorophore waren NBD-DHPE (grün; l_o-Phase), *N*-Rh-DHPE (rot; l_d-Phase) und innerhalb der GUVs wurde ATTO 647 (blau) eingesetzt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

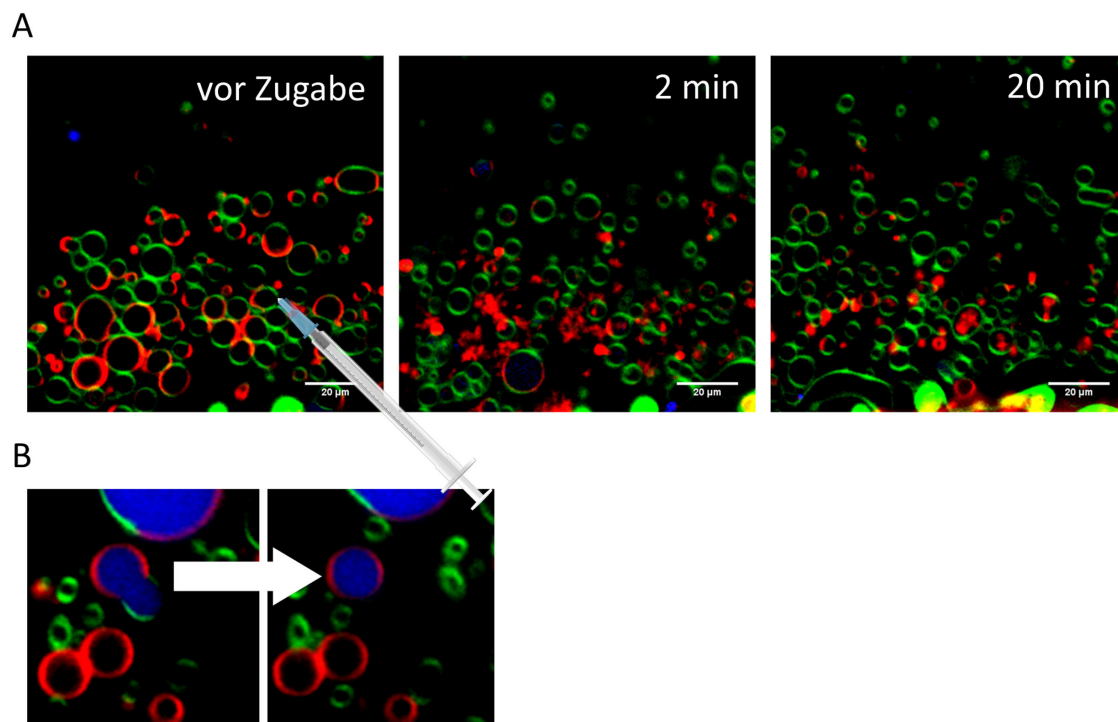


Abbildung 3-51: Detaillierte Darstellung des „Abknospens“ und der Bildung zweier Tochter-vesikel nach RhaRhaC₁₀C₁₀-Injektion. (A) Zeitabhängige konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs einer anionischen 5 KS-raft Lipidmischung bei RT vor und nach der Injektion einer 0,09 mg mL⁻¹ RhaRhaC₁₀C₁₀-Lösung. In (B) ist die Trennung der l_o-Phase und l_d-Phase eines GUVs in zwei neue kleinere GUVs vergrößert dargestellt (s. weiße Pfeile). Die aufgenommenen Bereiche waren über die gesamte Zeit dieselben. Die Skala entspricht 20 µm. Die verwendeten Membran-Fluorophore waren NBD-DHPE (grün; l_o-Phase), N-Rh-DHPE (rot; l_d-Phase) und innerhalb der GUVs wurde ATTO 647 (blau) eingesetzt.

Die meisten GUVs lagen nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes nur noch in einer Phase vor, wobei die geordnete Phase hier überwiegt. Auch hier konnte wieder eine Teilung der GUVs in Tochtervesikel beobachtet werden, die nur noch aus einer Domäne bestanden. Dieser Vorgang ist in Abbildung 3-50 mit weißen Pfeilen markiert und in Abbildung 3-51B vergrößert dargestellt. Hierbei ist festzustellen, dass im Unterschied zum RhaC₁₀C₁₀ nach Injektion des RhaRhaC₁₀C₁₀ das ATTO 647 größtenteils in den Vesikel verbleibt. Eine Verformung der GUVs (Abbildung 3-50, gelbe Pfeile) ist auch hier zu beobachten. Wie auch beim HAA wurde für das Dirhamnolipid ein „Abknospens“ von Aggregaten oder kleinen Vesikeln bzw. Mizellen, vor allem aus der l_d-Phase bestehend, gesehen (Abbildung 3-51A).

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

Zuletzt wurde der Einfluss der in Kapitel 3.5.4 beschriebenen Rhamnolipid-Mischung (R1-Mix) nach Injektion zu gebildeten GUVs aus dem 5 KS untersucht. Die Konzentration im Puffer betrug auch hier wieder $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$. Im Gegensatz zu den AFM-Messungen, bei denen ein kombinierter Effekt aller drei Rhamnolipid-Moleküle festgestellt werden konnte, war hier überwiegend der Effekt des Dirhamnolipids zu beobachten. Nach Injektion lagen die Vesikel überwiegend in der geordneten Phase vor (Abbildung 3-52) und der Anteil dieser nahm im Gegensatz zur l_d -Phase um etwa 60-70 % zu (Abbildung 3-54D). Auch bei der Trennung eines Vesikels in zwei Tochtervesikel blieb das ATTO 647 in Vesikeln zurück (Abbildung 3-53). Deformationen und eine Abnahme der Vesikelgröße konnten ebenfalls festgestellt werden. Nach Erreichen des Gleichgewichts blieb das Verhältnis beider Phasen konstant.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

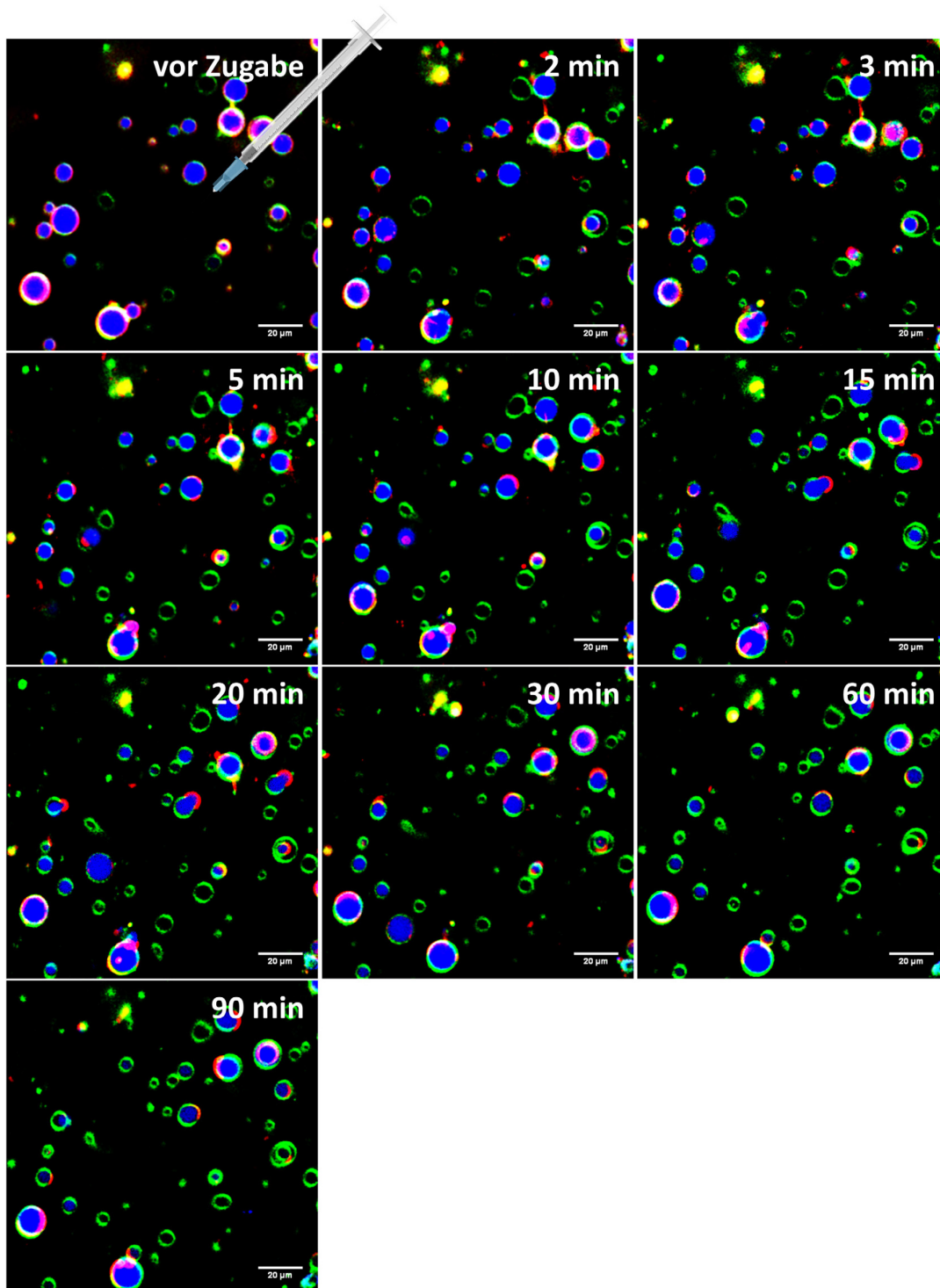


Abbildung 3-52: Injektion des RI-Mix zu heterogenen anionischen 5 KS-GUVs. Detaillierte zeitabhängige konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs einer anionischen 5 KS-raft Lipidmischung bei RT vor und nach der Injektion einer $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ RI-Mix-Lösung. Der aufgenommene Bereich war über die gesamte Zeit derselbe. Die Skala entspricht $20 \mu\text{m}$. Die verwendeten Membran-Fluorophore waren NBD-DHPE (grün; l_o -Phase), N-Rh-DHPE (rot; l_d -Phase) und innerhalb der GUVs wurde ATTO 647 (blau) eingesetzt.

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

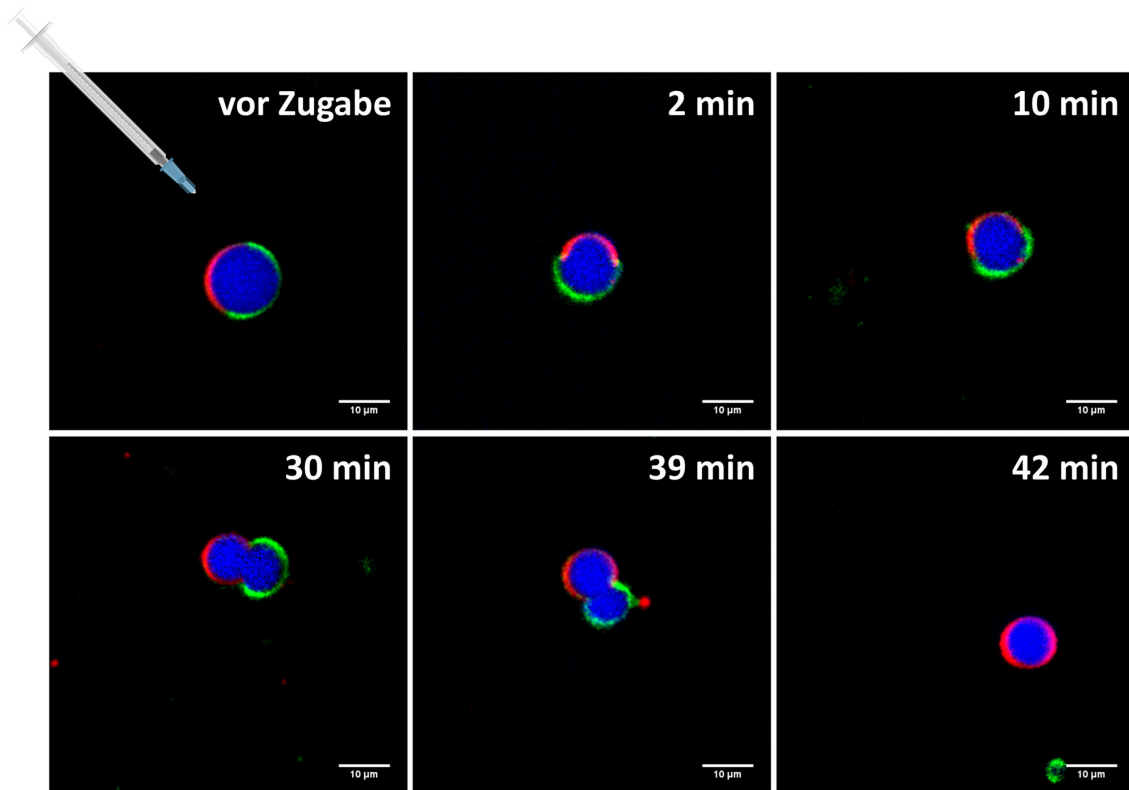


Abbildung 3-53: Detaillierte Darstellung der Bildung zweier Tochtervesikel nach RI-Mix-Injektion. Zeitabhängige konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs einer anionischen 5 KS-raft Lipidmischung bei RT vor und nach der Injektion einer $0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ RI-Mix-Lösung. Dabei ist die Trennung der l_o -Phase und l_d -Phase eines GUVs in zwei neue kleinere GUVs dargestellt. Der aufgenommene Bereich war über die gesamte Zeit derselbe. Die Skala entspricht $20 \text{ }\mu\text{m}$. Die verwendeten Membran-Fluorophore waren NBD-DHPE (grün; l_o -Phase), N-Rh-DHPE (rot; l_d -Phase) und innerhalb der GUVs wurde ATTO 647 (blau) eingesetzt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

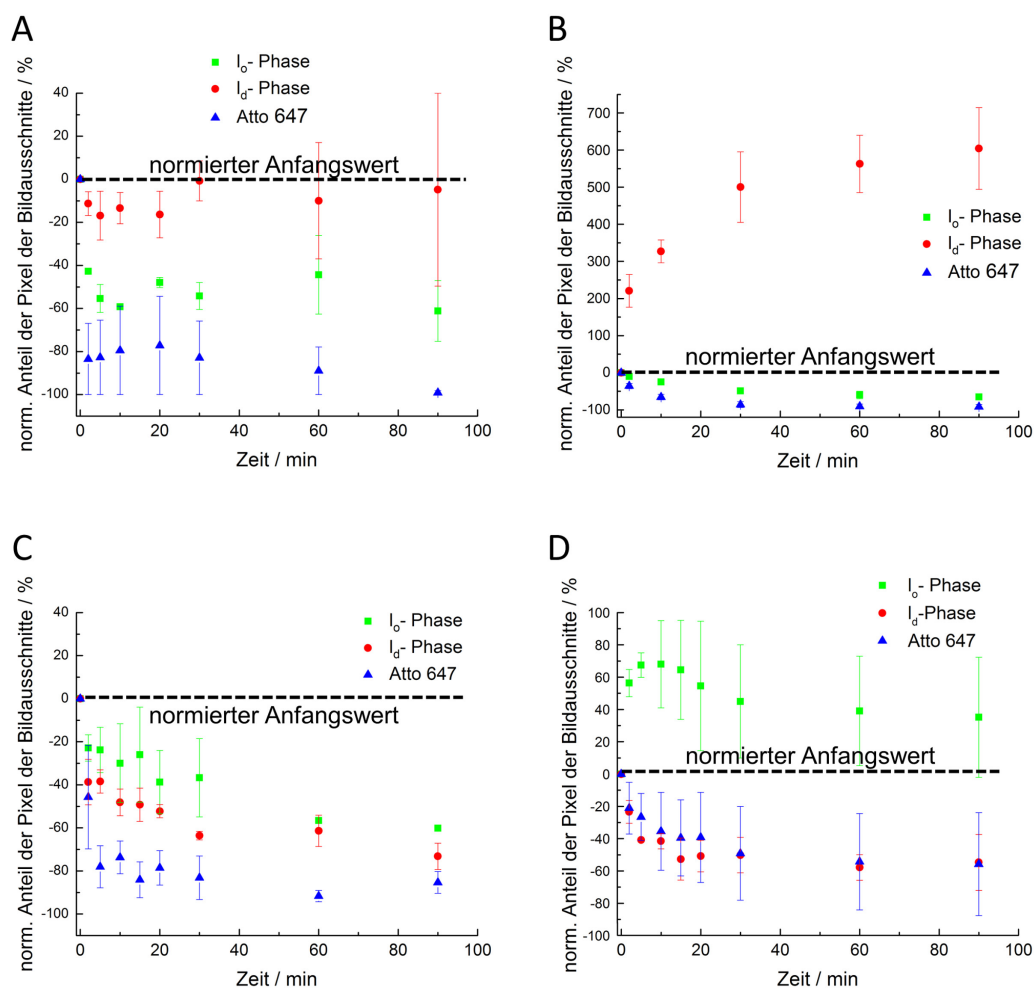


Abbildung 3-54: Auftragung der normierten relativen Veränderungen des Phasenanteils gegen die Zeit nach Injektion der Rhamnolipid-haltigen Lösungen. Auftragung der normierten relativen Veränderung des Anteils der Pixel der verschiedenen Fluorophore verschiedener Bildausschnitte unterschiedlicher Proben gegen die Zeit nach der Injektion von 0,09 mg ml⁻¹ (A) HAA-, (B) RhaC₁₀C₁₀-, (C) RhaRhaC₁₀C₁₀ und (D) RI-Mix-Lösung.

Um eine bessere Durchmischung und definierte sowie höhere Konzentration der Rhamnolipide innerhalb der GUVs zu erlangen, wurde diese im Folgenden schon während der Präparation der GUVs zugesetzt. Die Vesikelpräparation erfolgte für die temperaturabhängig gemessenen Vesikel mittels Elektroformation (jeweils Abbildung B), da dafür die Betrachtung desselben Bereiches mit denselben Vesikeln möglich ist. Für die anderen gezeigten Aufnahmen der Vesikel bei RT (jeweils Abbildung A) wurden die GUVs mittels PVA-gestützter Methode hergestellt, da diese deutlich schönere Vesikel liefert und die GUVs

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

frei in der Probe diffundieren können.^[40,41] Unterschiede zwischen beiden Präparationsmethoden können in Kapitel 2.6.1 sowie in der Literatur^[15] eingesehen werden. Zuerst sollen die Charakteristika der GUVs des heterogenen anionischen fünf Komponenten *raft*-Systems vorgestellt werden (Abbildung 3-55). Die GUVs zeichnen sich bei RT durch eine Phasenseparation in die l_o - und l_d -Phase aus und weisen einen Durchmesser von etwa 5 bis 30 μm auf. Der thermotrope Phasenübergangsbereich ist mikroskopisch zwischen 50 und 70 $^{\circ}\text{C}$ festzustellen (Abbildung 3-55B). Oberhalb von 70 $^{\circ}\text{C}$ liegen die Lipidmembranen in der fluiden Phase vor.

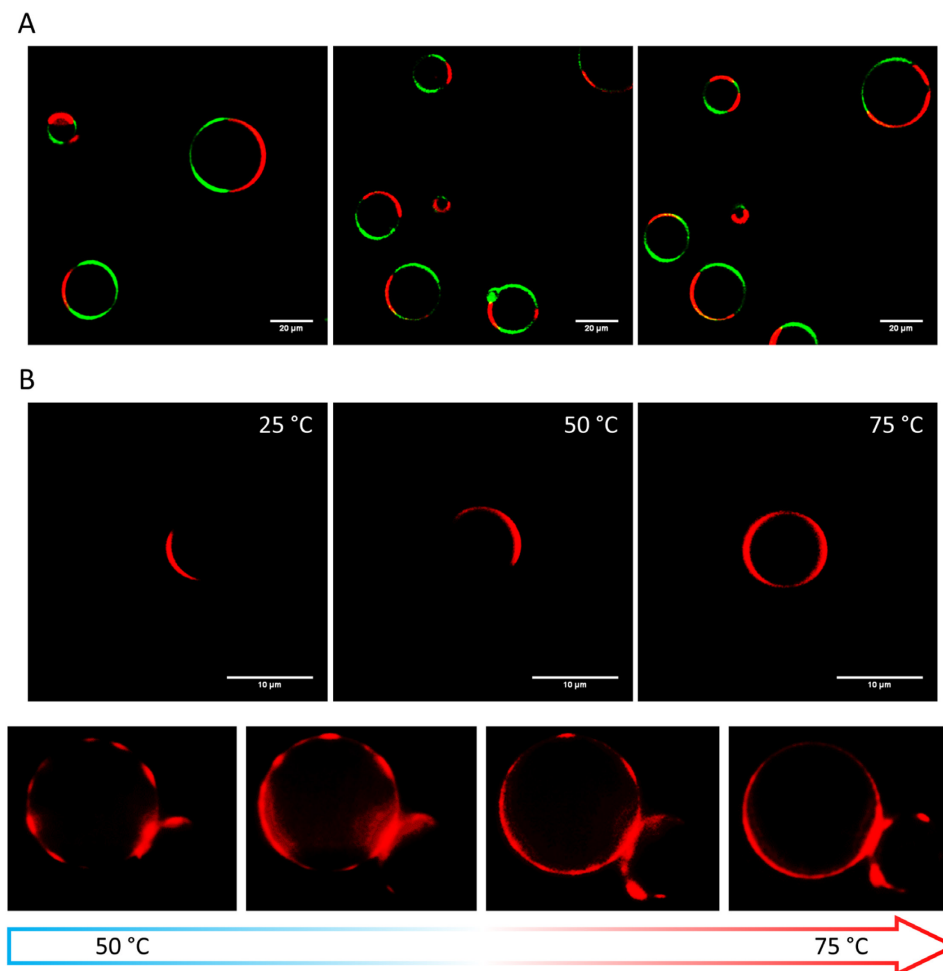


Abbildung 3-55: Charakterisierung der Morphologie und des Phasenverhaltens von GUVs des reinen 5 KS. (A) Ausgewählte GUVs des reinen 5 KS präpariert mittels PVA-gestützter Präparationsmethode bei RT. (B) Temperaturabhängiges Phasenverhalten der GUVs des reinen 5 KS, die mittels Elektroformationstechnik hergestellt wurden. Dabei ist der Phasenübergangsbereich zwischen 50 und 70 $^{\circ}\text{C}$ zu erkennen. Der in (B) aufgenommene Bereich war über die gesamte Zeit derselbe. Die Skala entspricht in (A) 20 μm und in (B) 10 μm . Die verwendeten Membran-Fluorophore waren NBD-DHPE (grün; l_o -Phase) und *N*-Rh-DHPE (rot; l_d -Phase).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

Der Einbau von 10 mol% HAA in dieses 5 KS bewirkte keine sichtbare Beeinflussung der Größe und Phasenverteilung der GUVs (Abbildung 3-56A). Jedoch konnte auch hier unmittelbar nach Präparation der Vesikel ein „Abknospen“ der l_d -Phasenbereiche festgestellt werden, welches in einer Abnahme der Gesamtzahl an GUVs und der Bildung kleinerer Aggregate oder Vesikel resultierte. Diese neugebildeten Strukturen waren nicht nur in der Lösung, sondern auch in den Vesikeln anzutreffen. Der beobachtete Phasenübergangsbereich verschob sich minimal zu niedrigeren Temperaturen im Vergleich zum reinen 5 KS (Abbildung 3-56B). Im Vergleich zur Präparation von GUVs aus dem reinen 5 KS nahm die Anzahl der beobachteten Vesikel in der Probe merklich ab.

Durch den Einbau von 10 mol% RhaC₁₀C₁₀ in die GUVs wurden die gebildeten Vesikel deutlich destabilisiert. Direkt nach der Präparation, bei höheren Temperaturen (ca. 50 – 60 °C), bildeten sich große GUVs, die jedoch mit abnehmender Temperatur und fortschreitender Zeit durch „Abknospungen“ und Abschnürungen von Vesikeln und Phasenbereichen zerfielen (Abbildung 3-57A, s. gelber Pfeil). Nach einiger Zeit und Abkühlen waren dann lediglich einige wenige Vesikel in der Probe zu beobachten, von denen die meisten nur noch ungeordnete Membrandomänen besaßen. Neben diesen Vesikeln lagen auch möglicherweise aggregierte Strukturen vor, die jedoch zu klein waren, um ihre genaue Gestalt aufzulösen. Dieser Beobachtung kann der destabilisierende und negative-Krümmung-fördernde Effekt des Monorhamnolipids auf lamellare Doppelschichten zugrunde liegen.^[11,199,278] Der thermotrope Phasenübergangsbereich wies auch hier wieder eine Verbreiterung und Verschiebung zu niedrigeren Temperaturen auf (Abbildung 3-57B).

Ein Anteil von 10 mol% RhaRhaC₁₀C₁₀ in dem untersuchten Lipidmembransystem zog eine deutliche Vergrößerung und Abnahme der Zahl der Vesikel nach sich (Abbildung 3-58A). Im Vergleich zum reinen 5 KS war der Durchmesser der mikroskopierten Vesikel um bis zu 60 µm größer. Teilweise wurden GUVs mit einem Durchmesser von über 80 µm beobachtet. Diese waren im Vergleich zum eingebauten Monorhamnolipid sowohl zeit- als auch temperaturstabil, was auf die invers-konische Form des Dirhamnolipids und die Stabilisierung von lamellaren Phasen zurückzuführen ist.^[11,199,278,322] Des Weiteren konnte auch hier ein „Abknospen“ und eine Auftrennung von GUVs in zwei Tochterzellen beobachtet werden, was in der Ausbildung von Aggregaten oder kleinen Vesikeln resultierte.

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

Eine signifikante Beeinflussung des Phasenübergangsbereiches konnte für das Dirhamnolipid nicht festgestellt werden (Abbildung 3-58B).

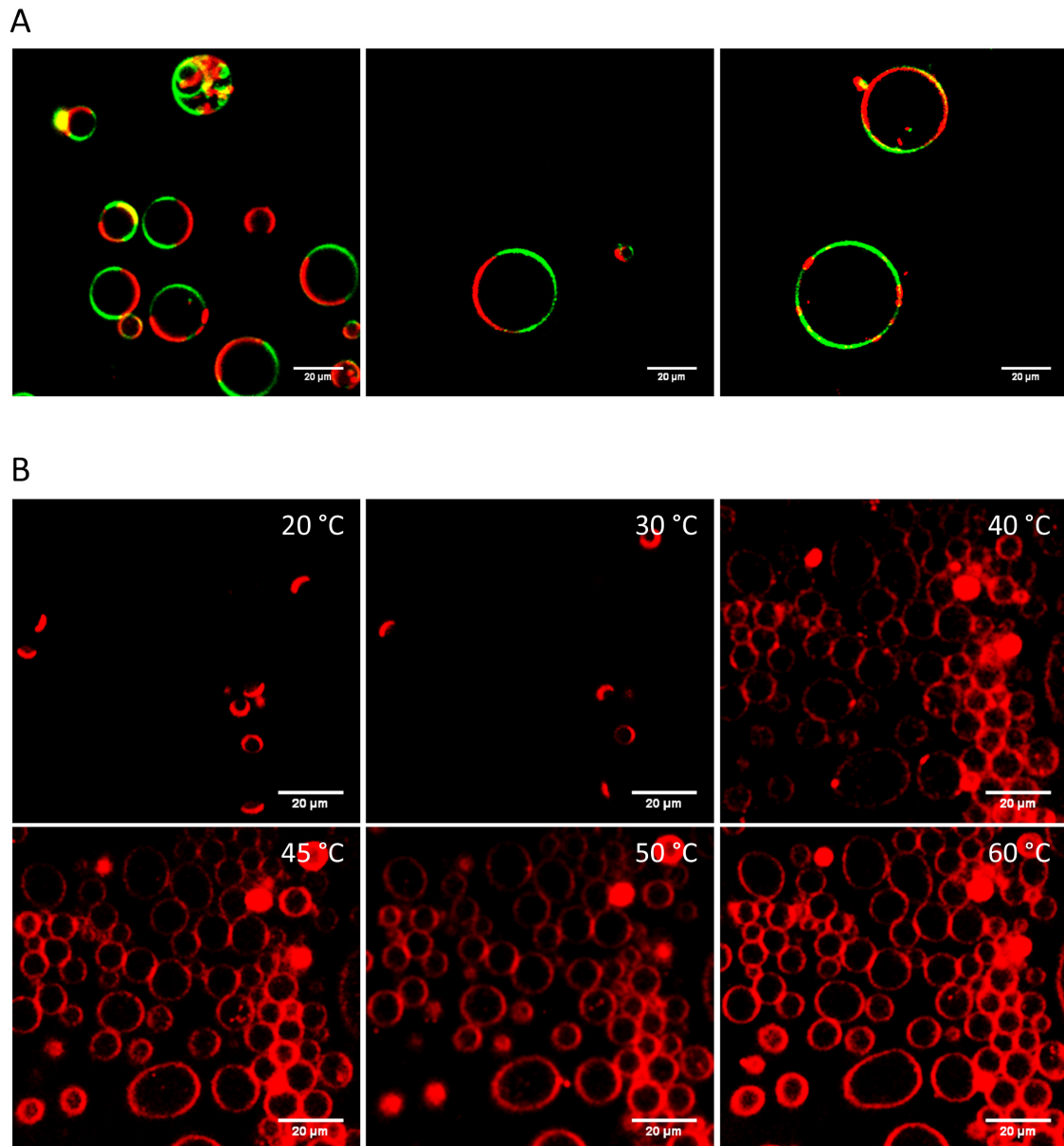


Abbildung 3-56: Charakterisierung der Morphologie und des Phasenverhaltens von GUVs des 5 KS/HAA-Systems. (A) Ausgewählte GUVs des 5 KS mit eingebauten 10 mol% HAA präpariert mittels PVA-gestützter Präparationsmethode bei RT. (B) Temperaturabhängiges Phasenverhalten der GUVs des 5 KS mit eingebauten 10 mol% HAA, die mittels Elektroformationstechnik hergestellt wurden. Dabei ist der Phasenübergangsbereich zwischen 35 und 60 °C zu erkennen. Der in (B) aufgenommene Bereich war über die gesamte Zeit derselbe. Die Skala entspricht in 20 μm . Die verwendeten Membran-Fluorophore waren NBD-DHPE (grün; l_o -Phase) und *N*-Rh-DHPE (rot; l_d -Phase).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

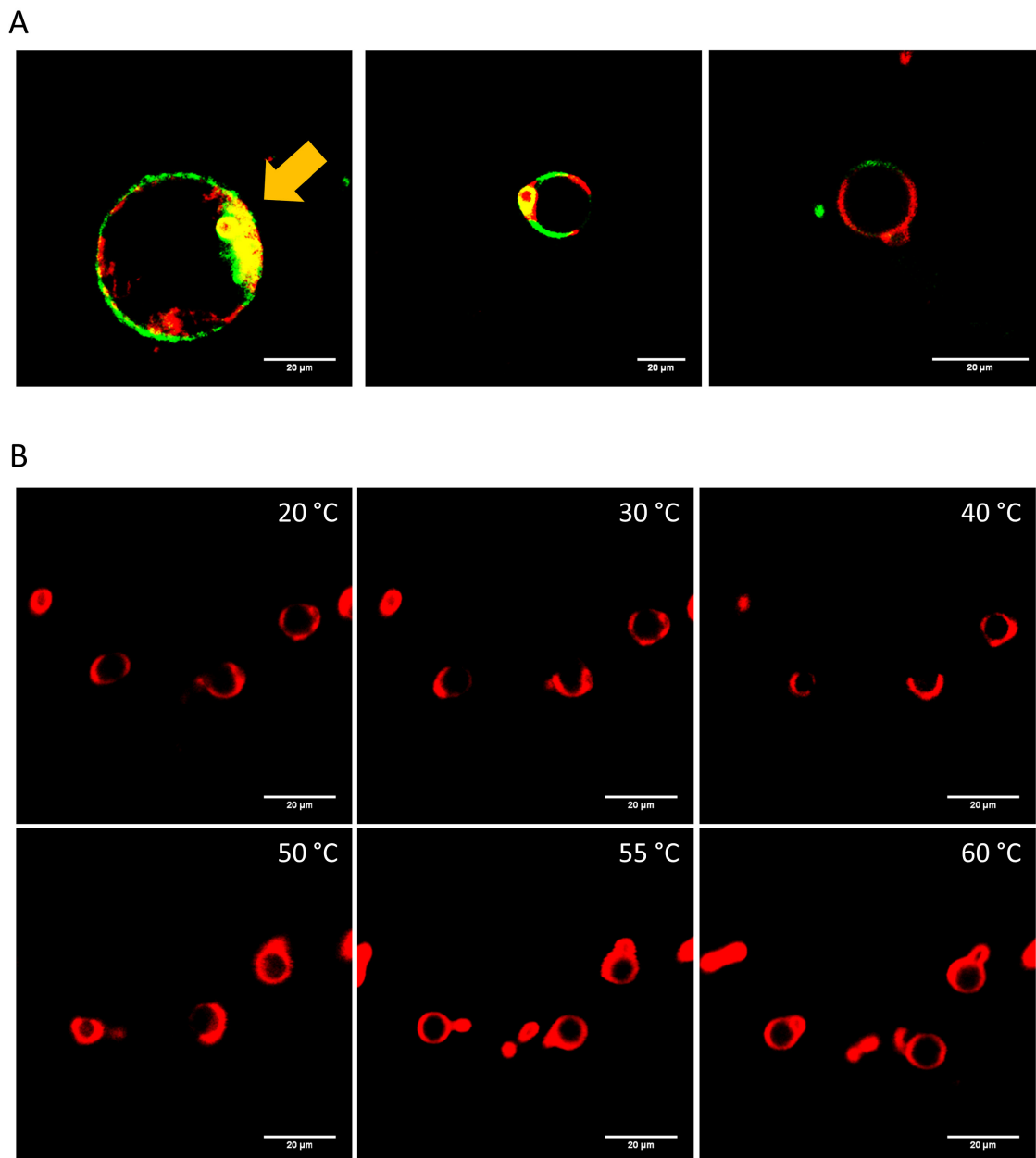


Abbildung 3-57: Charakterisierung der Morphologie und des Phasenverhaltens von GUVs des 5 KS/RhaC₁₀C₁₀-Systems. (A) Ausgewählte GUVs des 5 KS mit eingebauten 10 mol% RhaC₁₀C₁₀ präpariert mittels PVA-gestützter Präparationsmethode bei RT. (B) Temperaturabhängiges Phasenverhalten der GUVs des 5 KS mit eingebauten 10 mol% RhaC₁₀C₁₀, die mittels Elektroformationstechnik hergestellt wurden. Dabei ist der Phasenübergangsbereich zwischen 40 und 60 °C zu erkennen. Der in (B) aufgenommene Bereich war über die gesamte Zeit derselbe. Die Skala entspricht in 20 µm. Die verwendeten Membran-Fluorophore waren NBD-DHPE (grün; l_o-Phase) und N-Rh-DHPE (rot; l_d-Phase).

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

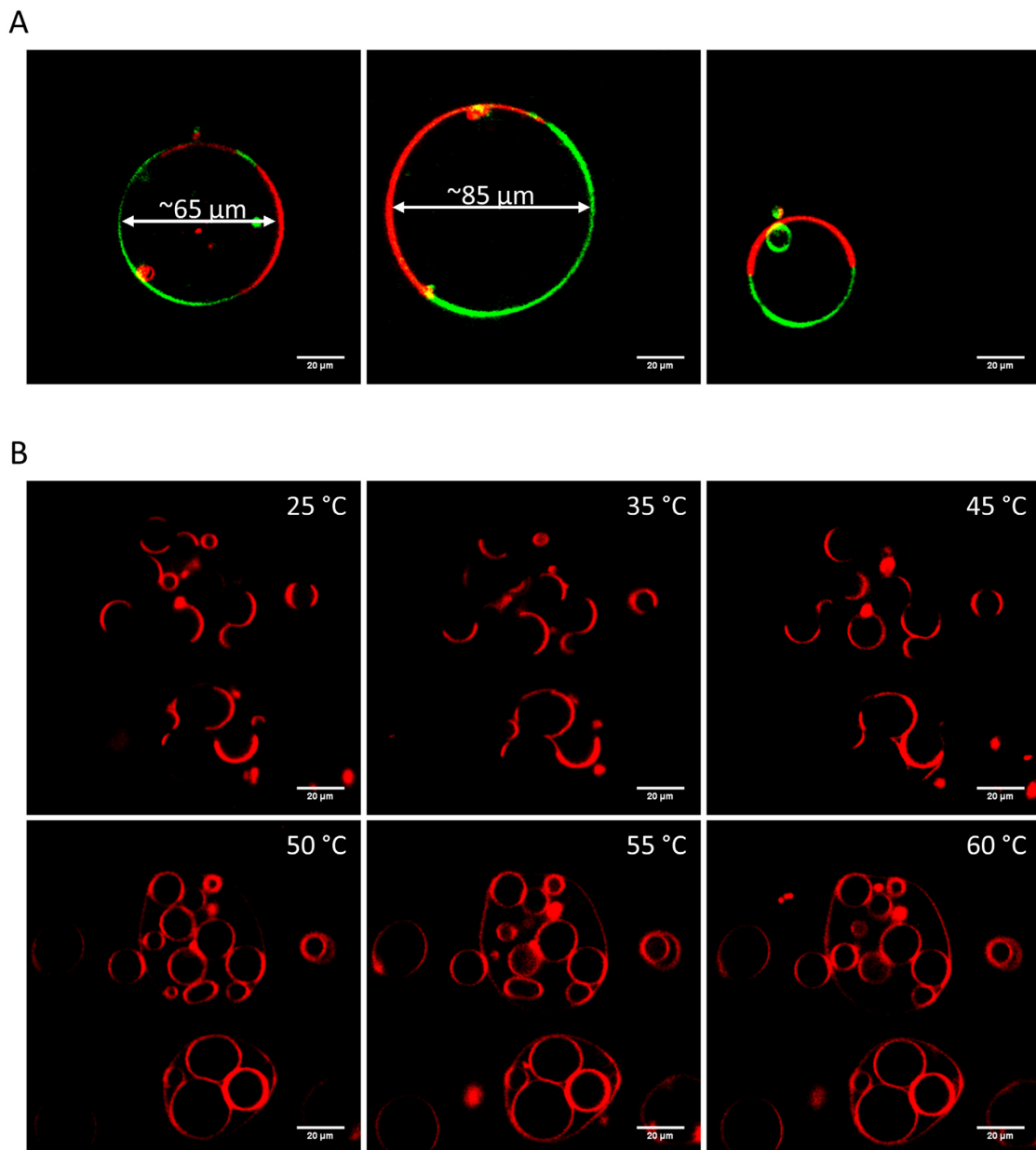


Abbildung 3-58: Charakterisierung der Morphologie und des Phasenverhaltens von GUVs des 5 KS/RhaRhaC₁₀C₁₀-Systems. (A) Ausgewählte GUVs des 5 KS mit eingebauten 10 mol% RhaRhaC₁₀C₁₀ präpariert mittels PVA-gestützter Präparationsmethode bei RT. (B) Temperaturabhängiges Phasenverhalten der GUVs des 5 KS mit eingebauten 10 mol% RhaRhaC₁₀C₁₀, die mittels Elektroformationstechnik hergestellt wurden. Dabei ist der Phasenübergangsbereich zwischen 45 und 60 °C zu erkennen. Der in (B) aufgenommene Bereich war über die gesamte Zeit derselbe. Die Skala entspricht in 20 μm . Die verwendeten Membran-Fluorophore waren NBD-DHPE (grün; l_o-Phase) und *N*-Rh-DHPE (rot; l_d-Phase).

3.5.6 Zusammenfassung

Der Einbau aller drei Rhamnolipide in Phospholipidmembranen bewirkte eine deutliche Änderung des Phasenverhaltens, der lateralen Lipidordnung und der Morphologie der zugehörigen Vesikel. Unterschiede zwischen den drei untersuchten Rhamnolipid-Spezies waren erst bei Konzentrationen ab 10 mol% festzustellen. Im Gegensatz zum HAA induzierten RhaC₁₀C₁₀ und RhaRhaC₁₀C₁₀ eine merkliche Phasentrennung in DPPC-Membranen und erhöhten die allgemeine laterale Ordnung der fluiden Membranphase. Dieser Effekt war für das untersuchte Dirhamnolipid ausgeprägter als für RhaC₁₀C₁₀, da es durch seine zusätzliche Rhamnose-Einheit mehr Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Umgebungswasser ausbilden konnte und so der kondensierende Effekt stärker auftrat. Obwohl für alle Rhamnolipide eine deutliche Beeinflussung der lateralen Lipidordnung festgestellt werden konnte, war der thermotrope Phasenübergang von der Gel- in die fluide Phase noch vorhanden und lediglich zu niedrigeren Temperaturen verschoben.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte für alle drei Rhamnolipide die Aufspaltung in Tochtervesikel, die lediglich noch aus einer Phase bestanden, beobachtet werden. Dies deutet auf eine Zunahme der Grenzlinienspannung zwischen den Lipiddomänen hin, die durch die Einlagerung der Rhamnolipide verursacht wird. Der Einbau von 10 mol% RhaC₁₀C₁₀ sowie RhaRhaC₁₀C₁₀ förderte die Bildung riesiger GUVs, welche aber im Falle des Monorhamnolipids nicht stabil waren und sich in kleinere Vesikel oder Aggregate auflösten. Die Injektion der drei Rhamnolipide zu schon ausgebildeten GUVs des heterogenen, anionischen fünf Komponenten *raft*-Systems zeigte ähnliche Effekte. Das „Abknospen“ von Domänen konnte nach der Injektion aller drei Moleküle sowie ihrer Mischung detektiert werden. Des Weiteren trennten sich zweiphasige GUVs in zwei einphasig-vorliegende Tochtervesikel auf. Bei diesem Vorgang kam es nach Injektion des Monorhamnolipids zu einer nahezu vollständigen Freisetzung des Vesikelinteriors. Dieser Vorgang konnte für das HAA und RhaRhaC₁₀C₁₀ nicht beobachtet werden. Des Weiteren induzierte das RhaRhaC₁₀C₁₀ eine relative Zunahme an Vesikeln, die in der geordneten Phase vorliegen, wohingegen das RhaC₁₀C₁₀ eher einen unordnenden Effekt auf die Membranlipide ausübte. Dieser l_d-Phasen-fördernde Effekt des RhaC₁₀C₁₀ konnte mittels AFM-Messungen bestätigt werden. Die Einlagerung dieser Moleküle in die fluide Phase der Lipiddoppelschicht resultierte zudem in einer Abnahme der Doppelschichtdicke in den Bereichen der ungeordneten

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

Domänen um etwa 1 nm und der Ausbildung einer Membrankrümmung. Dies lässt sowohl auf Veränderungen der Grenzlinienspannung an den l_o - und l_d -Phasengrenzen sowie Änderungen der Biegesteifigkeit der l_d -Domänen schließen. Der Einbau von HAA in die Membran bewirkte eine Verkleinerung und ein nahezu vollständiges Verschwinden der l_d -Domänen. Ein ähnlicher Einfluss wurde auch für hohe Konzentrationen an Cholesterin in Lipidmembranen beschrieben. Somit könnten die hier beobachteten Effekte aus einer kooperativen Wirkung des HAAs und Cholesterins resultieren.

Für eine Koordination dieser biophysikalischen Resultate mit den beobachteten, biologischen Effekten der Rhamnolipide bedarf es noch weiterer Untersuchungen und Ergebnisse. Die von Rhamnolipiden bewirkte Erhöhung der Oberflächenhydrophobizität einer Membran bietet eine Erklärung für die Freisetzung von Lipopolysacchariden aus der bakteriellen Außenmembran^[231], für die Wirkung von Rhamnolipiden als Teil in einem antibakteriellen Abwehrmechanismus^[247] und für die Förderung des Wachstums auf hydrophoben Substraten sowie der Aufnahme und des Metabolismus von Kohlenwasserstoffen durch den produzierenden Organismus.^[323] Zur verbesserten Aufnahme können Rhamnolipide entweder eine Zunahme der Membranhydrophobizität bewirken, wodurch die Wechselwirkungen zwischen dem hydrophoben Substrat und der Zelle gefördert werden, oder sekretierte Rhamnolipide emulgieren das Zielsubstrat. Dies könnte, wie hier beobachtet, durch das „Abknospen“ von Vesikeln oder Aggregaten passieren. Wie hier gezeigt, hat die Kopfgruppe einen signifikanten Einfluss auf die Membrankrümmung und -Integrität. Da die, als Rhamnolipid-Produzenten identifizierten, Mikroben nicht alle, wie *Ps. aeruginosa*, ubiquitär sind, können verschiedene Umweltbedingungen die Produktion unterschiedlicher Rhamnolipid-Kongenere erfordern. Tatsächlich wurde gezeigt, dass Mikroben, welche die Acetyltransferase *RhIA* besitzen, lediglich die Produktion von HAA katalysieren,^[227] wohingegen andere nur Monorhamnolipide produzieren und wieder andere, wie *Ps. aeruginosa*, die Möglichkeit, alle Rhamnolipid-Kongenere zu synthetisieren. *Ps. aeruginosa* verfügt nicht über ein monogenes Operon aller an der Rhamnolipidsynthese beteiligten Gene, wie die *Burkholderia*-Arten, sondern über *RhIC*, welches die Rhamnosyltransferase 2 kodiert. Durch diese wird die Dirhamnolipidsynthese unabhängig von anderen Genen.^[324] Durch diese Unterschiede in der genomischen Anordnung ergeben sich für einen allgegenwärtig-auftretenden Organismus höhere Überlebenschancen und Vorteile. Bislang wurde

3 Ergebnisse und Diskussion

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

auch über keinen Organismus berichtet, der sich auf die Produktion von Rhamnolipiden mit lediglich einer Kopfgruppenvariante spezialisiert hat.^[195,227] Weitere Untersuchungen sollten die Einflüsse der Alkylkettenlänge der Rhamnolipide in Betracht ziehen, da auch hier zwischen den Rhamnolipidproduzenten eine große Diversität herrscht.^[195,227]

Biotenside, wie Rhamnolipide, sind für eine Vielzahl unterschiedlicher Bereiche in der industriellen Anwendung von Interesse. Aufgrund ihrer Wirkung, die Löslichkeit und die Oberflächenspannung zu erhöhen, finden sie in der Kosmetikindustrie für Produkte wie Feuchtigkeitscremes, Shampoos und Schmiermittel Einsatzbereiche. Durch die hier gewonnenen Informationen können mögliche Anwendungen in der Agrar- und Pharmaindustrie aufgetan werden. In der Erforschung neuartiger, antibakterieller Substanzen oder auch zum Entwurf innovativer, alternativer Wirkstofftransportsysteme können Rhamnolipide in Betracht gezogen werden. Eine mögliche antimikrobielle Aktivität kann durch die hier beobachtete Destabilisierung, Störung und das *leakage* der Membran, welches mit einer Zelllyse der Wirtszelle gleichgesetzt werden kann, nach Interkalation der Rhamnolipide in die Membran erklärt werden. Durch die Kombination von Rhamnolipiden mit hydrophoben Antibiotika kann die Effizienz der Wirkstoffaufnahme erhöht werden. Durch die Erhöhung der Hydrophobizität der Zielmembran, ausgelöst durch die Rhamnolipide, wird eine Aufnahme der Antibiotika erleichtert. Zudem kann die große strukturelle Diversität der Rhamnolipide, das Design und die Synthese zielgerichteter und maßgeschneiderter Systeme mit möglichst effektiven Eigenschaften gewährleisten.

Aufgrund der hier erbrachten und diskutierten Ergebnisse kann eine zukünftige interdisziplinäre Studie zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Biomembranen und Biotensiden viele neue Erkenntnisse bringen, da abhängig von der Biotensid-Struktur verschiedene Membraneigenschaften und -Effekte sowie, wie z.B. eine verbesserte Aufnahme von hydrophoben Substanzen, „Abknospen“ und Spaltung von Vesikeln, Änderungen der Membranelastizität sowie fusogenen Eigenschaften und Induzieren des Membran-*leakages*, einschließlich der Zelllyse, gefördert werden können. Das komplette Verständnis der Struktur-Funktions-Beziehung dieser besonderen Moleküle würde den Biotensiden und ihren Kongeneren eine Vielzahl neuer Anwendungsbereiche eröffnen.

3.5 Vergleichende Studie des Einflusses der Anzahl von Rhamnose-Einheiten von Rhamnolipiden auf Lipidmodellmembranen unterschiedlicher Komplexität

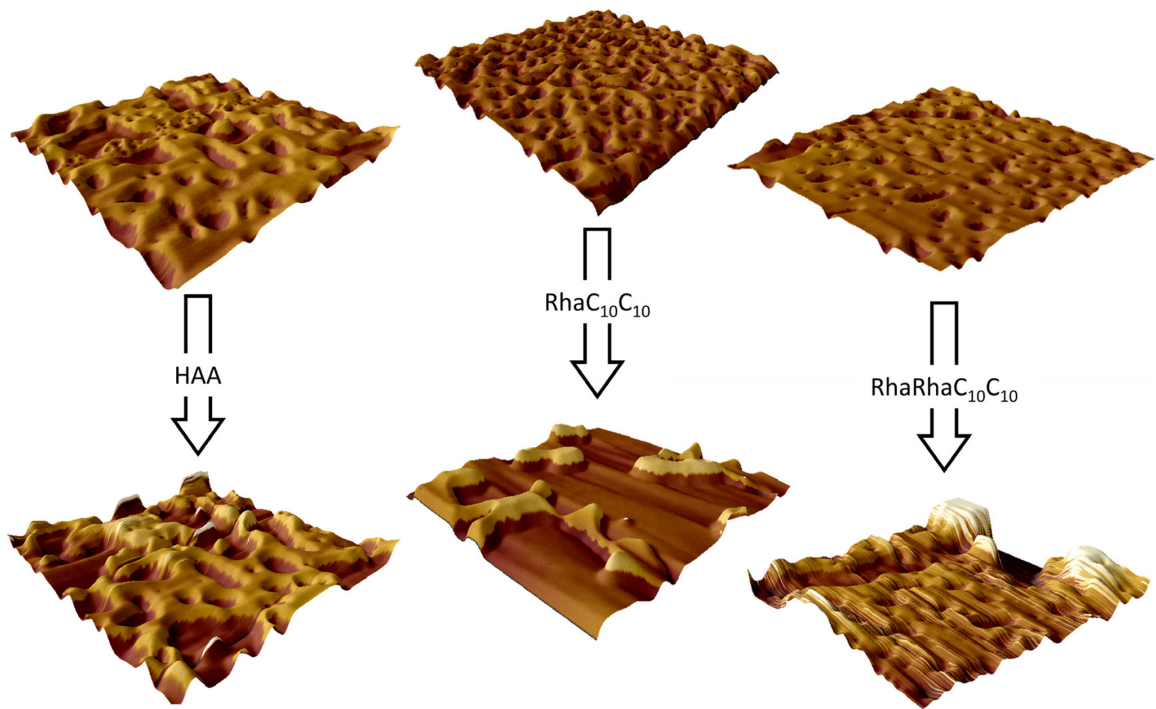


Abbildung 3-59: Dreidimensionale Darstellung der Membranoberflächen vor und nach Injektion der jeweiligen Rhamnolipid-Spezies.

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Die hier präsentierten Ergebnisse stammen aus der Kooperation mit dem Organisch-Chemischen Institut der WWU Münster, Arbeitsgruppe Prof. Dr. GLORIUS, und wurden in PCCP 22 (2020), 9775-9788 publiziert.

3.6.1 Imidazoliumbasierte Lipide

Im Jahre 1991 wurde das erste freie *N*-heterocyclische Carben (NHC) isoliert^[325] und ab diesem Zeitpunkt stieg das Interesse an NHCs insbesondere in den Bereichen der metallorganisch-chemischen Komplexe, Material- und Arzneimittelforschung sowie Katalyse.^[326-331] Zunächst wurde den Imidazoliumsalzen, welche der Gruppe der Carbene zugehörig sind, wenig Aufmerksamkeit geschenkt, obwohl diese durch Addition aliphatischer Kohlenwasserstoffketten ein hohes Potenzial zur Nachbildung von Lipidmembraneigenschaften besitzen. Ferner gehören die hier untersuchten Imidazoliumsalze der Klasse der ionischen Flüssigkeiten an, die im Allgemeinen als "Designer-Lösungsmittel" bezeichnet werden und beispielsweise in der Elektrokatalyse, in Extraktionsprozessen und Bioraffinerien oder als Elektrolyte für Stromquellen und Solarzellen verwendet werden.^[332,333] Heutzutage wird auch über den Einsatz lipidartiger, imidazoliumbasierter Moleküle als Arzneimittel gegen Krebs sowie als antimikrobielle und antimykotische Wirkstoffe für den klinischen Einsatz diskutiert.^[334,335] Die höchste Wirksamkeit gegen verschiedene Tumorzelllinien haben Imidazoliumsalze substituiert mit sperrigen, aromatischen Gruppen und langen Alkylketten gezeigt.^[334] Ein großer Vorteil von Imidazoliumsalzen ist die Leichtigkeit, strukturelle Veränderungen vorzunehmen, die die gewünschten biophysikalischen Eigenschaften, wie Lipophilie, Löslichkeit und Amphiphilie, modifizieren und anpassen können, um eine hohe Antitumoraktivität mit geringem zytotoxischen Verhalten gegenüber gesunden Zellen zu gewährleisten.^[334,335] *N*-substituierte Imidazolringe sind in zahlreichen bioaktiven Molekülen des menschlichen Stoffwechsels und in vielen Naturstoffen zu finden. Aufgrund ihres amphiphilen und hochpolaren heterozyklischen Ringes neigen diese Moleküle zu elektrostatischen Wechselwirkungen mit verschiedenen biologischen Systemen, insbesondere mit biologischen Membranen. Aktuelle Studien konnten eine signifikante Membrana-

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

ktivität von Imidazoliumsalzen zeigen.^[336–339] Alkylierte Imidazoliumverbindungen weisen aufgrund ihrer kationischen Kopfgruppe und variablen Alkylkettenlänge selbst eher tensidähnliche Eigenschaften auf.^[340–343]

Durch die Verwendung molekularer Hybridisierung, als Strategie zur Entwicklung von Arzneimitteln, hat die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. GLORIUS verschiedene alkylierte Moleküle mit einem Imidazoliumgrundgerüst entworfen und synthetisiert, die sich in der Länge ihrer beiden hydrophoben Alkylketten an der 4- und 5-Position des Imidazolrings und in ihrer kationischen Kopfgruppenstruktur und Substitution unterscheiden.^[49,50,344] Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit natürlichen Phospholipiden, wie unter anderem Dipalmitoylphosphatidylcholin, besitzen diese Moleküle die Möglichkeit, die physikochemischen Eigenschaften natürlicher Lipide und Lipidmembranen nachzuahmen. Es wurde gezeigt, dass einige dieser synthetischen Lipide eine beträchtliche Antitumoraktivität und Zelltoxizität besitzen.^[49,50] Dabei hängt ihre generelle Zytotoxizität stark von der Kettenlänge der Alkylketten an der 4- und 5-Position des Imidazolrings ab. Die Stärke der zellulären Toxizität nimmt mit zunehmender Länge der Alkylkette ab. Für eine C₁₅-Kette wurde die niedrigste und für eine C₇-Alkylkette die stärkste zelluläre Toxizität nachgewiesen^[49,50], wohingegen die Oberflächenaktivität bei längeren Alkylketten deutlich höher ist. Dadurch ergibt sich eine starke Korrelation zwischen den biophysikalischen Eigenschaften dieser Moleküle und ihrer biologischen Aktivität. Studien der Interaktion zwischen diesen Molekülen und Phospholipidmembranen zeigen, dass C₁₅IME·HI sich leicht in Lipidmembranen einfügt, wohingegen das etwas kürzere C₁₁IME·HI eine lytische und destabilisierende Wirkung aufweist und C₇IME·HI aufgrund seiner sehr kurzen Alkylkettenlänge kaum noch lytisch ist und die Membranstruktur nur geringfügig beeinflusst.^[49] Der Einbau von imidazoliumbasierten Lipiden mit kleinen und hydrophilen Kopfgruppensubstituenten in eine DPPC-Membran verursachte eine Rigidisierung der Membran, während sperrige und hydrophobe Substituenten die DPPC-Membran fluidisieren.^[344] Im Allgemeinen haben ionische Flüssigkeiten einen unordnenden Effekt und eine Verringerung der Membranelastizität gezeigt, was zu Störungen selbstorganisierter Zellmembranstrukturen führt.^[345]

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung eines neu konstruierten und synthetisierten Imidazoliumlipides, dem C₁₁IPr·HBr, welches eine sehr sperrige und hydrophobe Kopf-

3 Ergebnisse und Diskussion

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

gruppe besitzt. Dazu soll die Interaktion dieses Moleküls mit verschiedenen Lipidmembranen untersucht und mit der des $C_{11}IME\cdot HI$ Moleküls, welches schon untersucht wurde, verglichen werden.^[49,50,346,347] Die Strukturen beider Moleküle sind in Abbildung 3-60 gezeigt. Der generelle Einbau von Imidazoliumsalzen mit einer hydrophilen und polaren Kopfgruppe in eine Lipidmembran ist wesentlich einfacher als von Molekülen, die eine sperrige und hydrophobe Kopfgruppen aufweisen, wodurch diese Poren in der Membran verursachen und so eine Destabilisierung bewirken.^[344] Die hier vorgenommenen Untersuchungen wurden mit Modellbiomembranen unterschiedlicher Komplexität durchgeführt. Zuerst wurde eine Einkomponenten-Lipidmembran, aus DPPC, herangezogen und anschließend die Membrankomplexität durch Verwendung einer neutralen heterogenen Membran, aus DPPC/DOPC/Cholesterin (2:1:1) bestehend, erhöht. Zuletzt wurde noch eine aus fünf Komponenten bestehende 10 mol% anionische *raft*-Mischung aus den Lipiden DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25) verwendet. Diese Mischung simuliert am ehesten eine natürliche Lipidmembran, da die typische physiologische Konzentration anionischer Lipide in der Plasmamembran etwa 10 mol% beträgt.^[314,315] Darüber hinaus haben negativ geladene Lipide eine unordnende Wirkung auf Alkylketten in der Membran und in Kombination mit ionischen Flüssigkeiten einen vesikelstabilisierenden Einfluss gezeigt.^[348] Cholesterinhaltige Membransysteme mit mehreren Lipidkomponenten zeichnen sich durch die Phasenkoexistenz einer *raft*-artigen, flüssig-geordneten (l_o) und einer flüssig-ungeordneten (l_d) Phase bei Raumtemperatur aus.^[64,349] Das Vorhandensein dieser Domänen unterschiedlicher Zusammensetzung und Fluidität scheint für verschiedene membranassoziierte Prozesse, wie Signalübertragung, Exo- und Endozytose und Virusaufnahme, relevant zu sein.^[349-352] Die Einkomponenten-Membran aus DPPC-Doppelschichten weist keine Phasenkoexistenzgebiete auf, sondern besteht aus einzelnen lamellaren Phasen, die mit steigender Temperatur zwei scharfe, lamellare Phasenübergänge, einen L_{β}' - zu P_{β}' - (Gel-zu-Gel) Vorübergang bei etwa 35 °C und den Hauptphasenübergang von der Gel- in die flüssig-kristalline Phase (P_{β}'/L_{α}) bei ca. 41 °C besitzen.^[78,353-356]

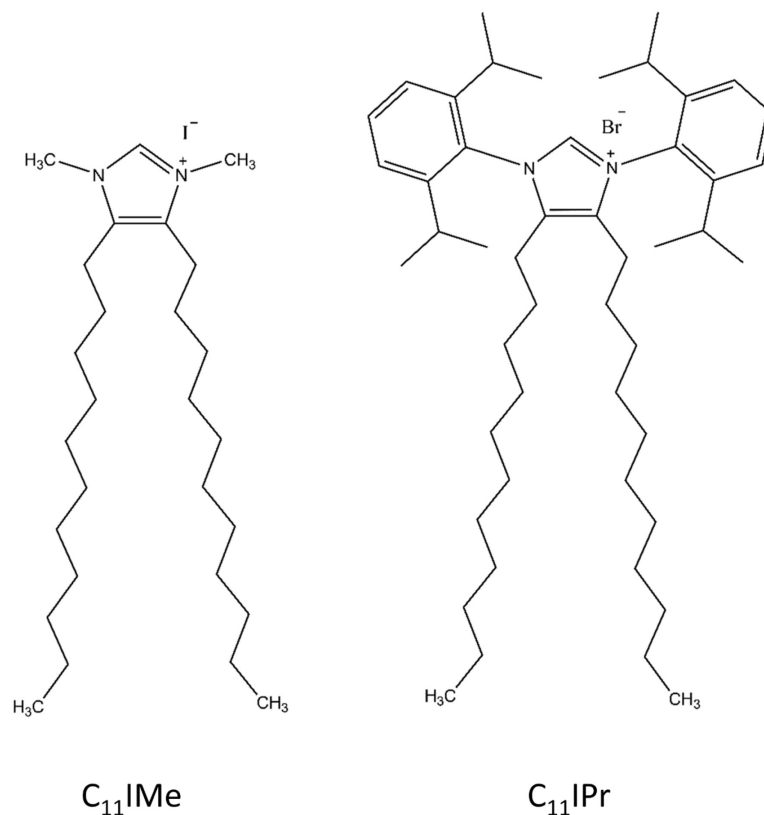
3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene
Lipidmodellmembranen

Abbildung 3-60: Chemische Struktur der untersuchten Imidazoliumsalze.

3.6.2 Bestimmung der kritischen Mizellkonzentration (CMC)

Um Aussagen über die Oberflächenaktivität des C_{11}IPr treffen zu können, wurde mittels Filmwaagenmessungen die CMC dieses Imidazoliumsalzes auf Wasser bestimmt. Die in Abbildung 3-61 gezeigte Isotherme der Oberflächenspannung gegen die Konzentration wurde aus vier unabhängigen Messungen gemittelt. Anhand dieser Messungen konnte die CMC zu $0,7 \pm 0,08 \mu\text{M}$ erhalten werden. Dieser Wert korreliert mit Literatur-bekanntem CMC-Werten anderer, aber strukturell ähnlicher, Imidazoliumsalze (Tabelle 3-7). Die hier ermittelte CMC des C_{11}IPr liegt ein wenig unterhalb der CMC des C_{11}IBn , was aus der Substitution vier zusätzlicher Isopropylreste an der Kopfgruppe resultiert und daher auch zu erwarten gewesen ist. Alle nachfolgenden Messungen der Imidazoliumsalze mit den verschiedenen Lipidsystemen wurden daher weit oberhalb der CMC dieser beiden Salze durchgeführt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

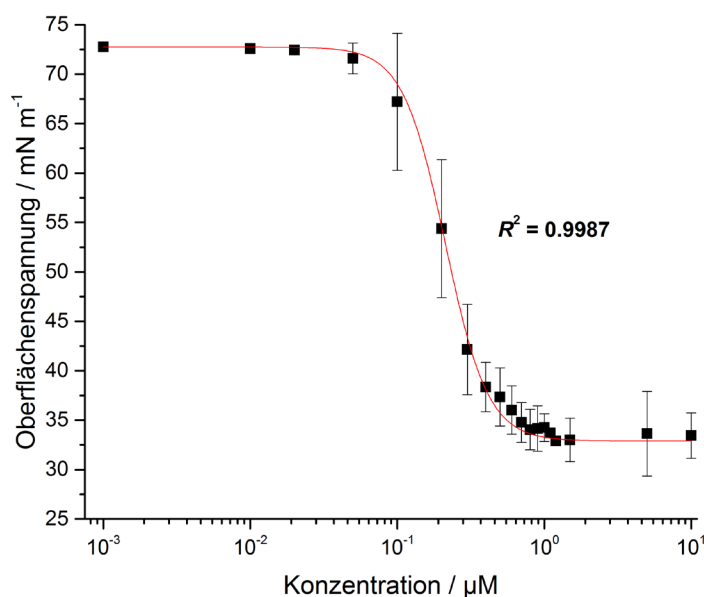


Abbildung 3-61: Bestimmung der CMC von C₁₁IPr. Auftragung der Oberflächenspannung des C₁₁IPrs gegen die Konzentration auf Wasser als Lösungsmittel bei 25 °C.

Tabelle 3-7: Vergleich der literaturbekannten CMC-Werte von C₁₁IMe und C₁₁IBn mit dem ermittelten Wert des C₁₁IPr.

Imidazoliumsalz	CMC / μM
C ₁₁ IMe ^[49,50]	8,5 (5 – 10)
C ₁₁ IBn ^[49]	2,3 (2,0 – 5,0)
C ₁₁ IPr	0,7 ± 0,1

3.6.3 FOURIER-Transform-Infrarotspektroskopie

Um einen möglichen Einbau der Imidazoliumsalze in eine Lipidmembran zu induzieren, wurden diese, wie vorher beschrieben, während der Vesikelpräparation beigemischt. Damit Rückschlüsse auf die Art und Weise des Einbaus in die Lipidmembran gewonnen werden konnten, wurden zuallererst FT-IR-Messungen durchgeführt. Diese erlauben Einblicke in die Konformationsordnung der Lipidketten der untersuchten Modellmembranen. Dabei wurden vor allem die Änderungen der Vibrationsschwingungen im IR-Spektrum im Bereich von 2800 cm^{-1} bis 3100 cm^{-1} betrachtet.^[316,354,355] Ein Indikator für den Gel-zu-fluid-Phasenübergang ist die asymmetrische CH₂-Streckschwingung im Bereich von 2916 cm^{-1} bis 2925 cm^{-1} . Bei dem temperaturinduzierten Übergang der Alkylketten von der *all-trans* in die *gauche* Konformation verändern sich die Maxima dieser spezifischen Bande mit dem

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Verhältnis beider Konformationen zueinander.^[316,354,355] Daher kann die Verschiebung des Maximums der Wellenzahl $\Delta\tilde{\nu}$ als spezifischer Marker für die Fluidität und die Änderungen im Phasenverhalten angesehen werden.

Die Imidazoliumsalze C₁₁Ime und C₁₁IPr wurden in drei verschiedenen Membransystemen untersucht. Die Komplexität dieser Systeme nahm vom einfachsten, bestehend aus reinem DPPC, über ein heterogenes Drei-Komponentensystem aus DPPC/DOPC/Cholesterin (2:1:1) bis hin zu einem 10 mol% anionisch geladenen heterogenen Fünfkomponentensystem (DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/Cholesterin; 45:5:20:5:25) zu. Die Untersuchungen wurden nicht nur temperaturabhängig, sondern auch konzentrationsabhängig vorgenommen, wobei die Konzentration des DPPC in allen Messungen um die hinzugefügte Menge an Imidazoliumsalz gesenkt worden ist. Die erhaltenen FT-IR-Spektren der jeweiligen Systeme sind in Abbildung 3-62 einzusehen. Für eine reine DPPC-Membran ist aus den Abbildungen (A) und (B) direkt ersichtlich, dass die Anwesenheit beider Imidazoliumsalze eine signifikante Verringerung der Hauptphasenübergangstemperatur T_m bewirkt. 7,5 mol% C₁₁Ime senken T_m um etwa drei Grad, wohingegen eine weitere Konzentrationserhöhung dieses Salzes keinen weiteren Einfluss auf den Übergang von der Gel- in die flüssig-kristalline Phase aufweist. Der fluidisierende Effekt des C₁₁IPr's hingegen wird durch höhere Konzentrationen weiterhin verstärkt und ist damit wesentlich prägnanter. 7,5 mol% bewirken ähnlich wie das C₁₁Ime eine Absenkung von T_m um ca. drei Grad. Mit zunehmender Imidazoliumsalzkonzentration zeigt sich hier jedoch auch eine weitere Absenkung der Hauptphasenübergangstemperatur. Bei 15 mol% eingebauten C₁₁IPr ist diese um etwa 10 Grad niedriger als für eine reine DPPC-Membran bestimmt worden ist. Dies zeigt eine signifikante Störung der Lipiddoppelschicht durch das eingebaute Imidazoliumsalz. Die ermittelten T_m -Werte sind in Tabelle 3-8 aufgeführt. Hierbei sei jedoch angemerkt, dass die mittels FT-IR bestimmten Daten nur eine grobe Tendenz vorgeben und für einen Vergleich mit den per DSC bestimmten T_m -Werten nicht sehr genau sind.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

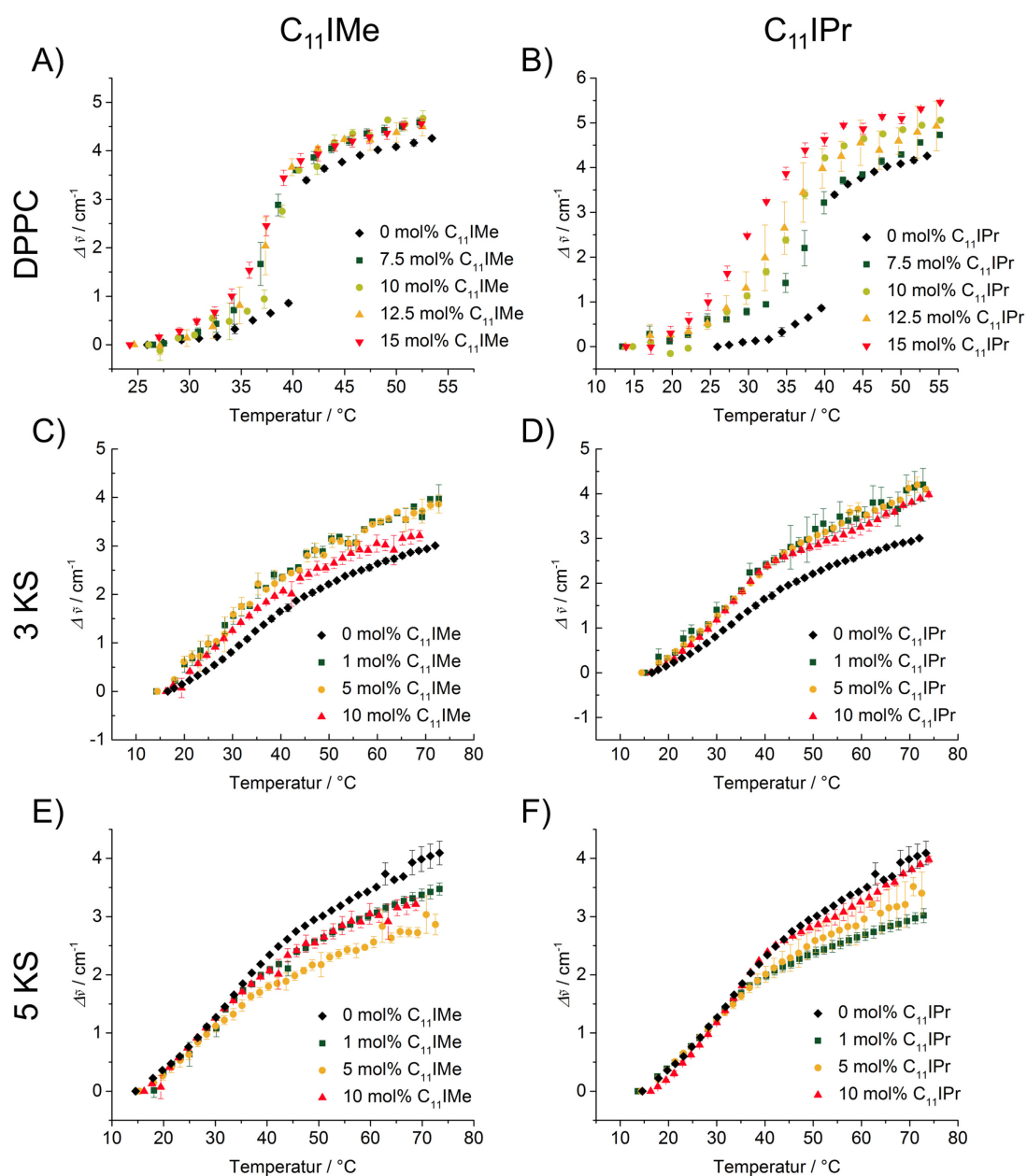


Abbildung 3-62: Normierte konzentrations- und temperaturabhängige FT-IR-Spektren des $C_{11}Ime$'s und $C_{11}IPr$'s in verschiedenen Modellmembransystemen. Normierte konzentrations- und temperaturabhängige FT-IR-Spektren der beiden untersuchten Imidazoliumsalze in verschiedenen Membranmodellsystemen. In der ersten Spalte (A, C, E) sind die Ergebnisse des $C_{11}Ime$'s gezeigt, in Spalte 2 die des $C_{11}IPr$'s eingebaut in reines DPPC (A, B), in das Dreikomponentensystem (DPPC/DOPC/Cholesterin; 2:1:1) (C, D) und in das heterogene anionische Fünfkomponentensystem (DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/Cholesterin; 45:5:20:5:25) (E, F).

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Tabelle 3-8: Aus den FT-IR-Spektren ermittelte Hauptphasenübergangstemperaturen, T_m , von C₁₁IME und C₁₁IPr in einer DPPC-Membran.

Anteil / mol%	T_m C ₁₁ IME / °C	T_m C ₁₁ IPr / °C
0	40,4 ± 0,2	40,4 ± 0,2
7,5	37,5 ± 0,2	37,8 ± 0,5
10	38,6 ± 0,4	34,6 ± 0,3
12,5	37,1 ± 0,3	33,6 ± 0,3
15	36,9 ± 0,3	29,9 ± 0,6

Die beobachtete Senkung der T_m -Werte kann auf eine Schwächung der intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Alkylresten der Lipide in der Membran zurückgeführt werden. Ein wesentlicher Grund hierbei ist die um fünf C-Atome kürzere Alkylkette der Imidazoliumsalze im Vergleich zum DPPC-Molekül. Der größere Einfluss des C₁₁IPr im Vergleich zum C₁₁IME kann mit seiner Kopfgruppensubstitution begründet werden, die wesentlich größer ist und dadurch eine deutlichere Störung der Membran verursacht.

Die aufgetragenen Maxima der spezifischen Vibrationsbande der reinen heterogenen 3 KS- und 5 KS-Mischungen in Abbildung 3-62 (C – F) weisen im Vergleich zum reinen DPPC keinen sprunghaften Anstieg der Maximalwerte auf, sondern besitzen aufgrund der heterogenen und komplexen Zusammensetzung einen breiten Phasenkoexistenzbereich von flüssig-geordneten und flüssig-ungeordneten Domänen innerhalb der Membran. Auch hier zeigt sich ein Einfluss beider Imidazoliumsalze auf die Membranordnung. Der Einbau des C₁₁IME und C₁₁IPr in die neutrale 3-KS-Membran bewirkt einen Anstieg der Wellenzahl der untersuchten CH₂-Vibrationsbande über den gesamten Temperaturbereich, welches ein Indiz für eine Abnahme der Alkylkettenordnung ist und einer Zunahme an *gauche*-Konformeren entspricht. Beide Salze weisen also einen Membran-fluidisierenden Charakter auf. Ähnliche Resultate wurden für das anionische 5-KS-Membransystem erhalten, bei dem auch eine steigende Imidazoliumsalzkonzentration eine erhöhte Fluidisierung des Membransystems bewirkt.

3.6.4 DSC-Messungen

Zur genauen Bestimmung des Einflusses der beiden Salze auf die Phasenübergangstemperatur von DPPC und für tiefere Einblicke in die Thermodynamik der Prozesse wurden DSC-Messungen vorgenommen. Eine Auswertung der DSC-Thermogramme für die 3 KS- und

3 Ergebnisse und Diskussion

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

5 KS-Lipidmembranen lieferte keine verwertbaren Ergebnisse, da diese beiden Lipidsysteme, wie zuvor beschrieben, keinen scharfen Phasenübergang, sondern eine breite Phasenkoexistenz aufweisen und somit die Einflüsse der Imidazoliumsalze in den Thermogrammen nicht genau auszumachen sind. Für DPPC hingegen wurden deutliche Einflüsse beider Salze auf das Phasenübergangsverhalten beobachtet (Abbildung 3-63 und Abbildung 3-64). Das Thermogramm des reinen DPPC zeigt zwei endotherme Übergänge, den Gel-zu-Gel-Vorübergang von der $L_{\beta'}$ - in die $P_{\beta'}$ - Phase bei etwa 37 °C und den Gel-zu flüssig-kristallinen Hauptübergang von der $P_{\beta'}$ - in die L_{α} -Phase bei ca. 41,9 °C. Wie schon in den FT-IR-Messungen zu sehen ist, sinkt die Hauptphasenübergangstemperatur, T_m , mit steigender Konzentration beider Imidazoliumsalze in der DPPC-Membran. Auch ein Sinken der Vorphasenübergangstemperatur, T_p , kann mit zunehmender $C_{11}IME$ -Konzentration beobachtet werden, wohingegen schon ab 1 mol% $C_{11}IPr$ der Vorübergang unterdrückt wird. Dies geschieht ebenfalls ab 5 mol% $C_{11}IME$ in der DPPC-Membran. Durch den Einbau von Fremdmolekülen wird eine Störung der effizienten Packung benachbarter Lipidmoleküle hervorgerufen, die essentiell zur Ausbildung der gewellten $P_{\beta'}$ - Phase ist und in dem Verschwinden des Vorüberganges resultiert. Eine weitere Erhöhung der $C_{11}IME$ -Konzentration führt zu einer Verbreiterung des Hauptphasenübergangs, welches ein Indiz für die Ausbildung einer Phasenkoexistenzregion ist.

Wie auch schon in den FT-IR-Messungen gesehen, weist der Einbau des $C_{11}IPr$ in die DPPC-Membran einen deutlicheren Effekt auf. Nicht nur, dass der Vorübergang schon ab Imidazoliumsalzkonzentrationen von über 1 mol% nicht mehr zu beobachten ist, auch die Verbreiterung des Hauptphasenüberganges tritt bei geringeren $C_{11}IPr$ -Konzentrationen im Vergleich zum $C_{11}IME$ auf. Bei genauerer Betrachtung der Thermogramme (Abbildung 3-63C) wird auffällig, dass bei hohen $C_{11}IPr$ -Konzentrationen nicht nur eine Peakverbreiterung, sondern auch zwei definierte, getrennte Peaks nebeneinander vorliegen. Dies deutet auf eine Abtrennung der $C_{11}IPr$ -Moleküle in eigene Domänen in der DPPC-Membran oder auf die Ausbildung mizellarer $C_{11}IPr$ -Strukturen hin.

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

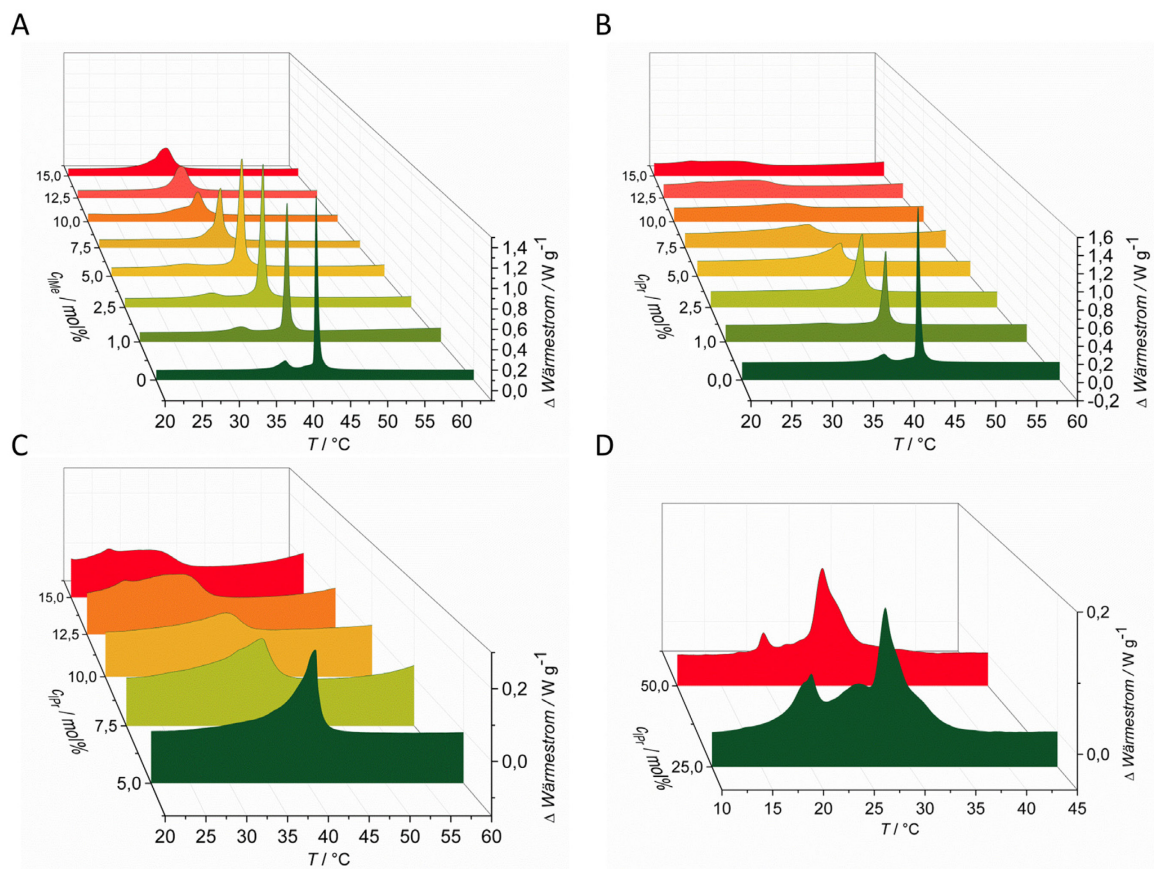


Abbildung 3-63: Erhaltene DSC-Thermogramme für verschiedene DPPC/C₁₁IMe- und DPPC/C₁₁IPr-Zusammensetzungen. A) Thermogramme der DPPC/C₁₁IMe-Lipidmischungen mit einem C₁₁IMe-Anteil von 0 – 15 mol%. B) Thermogramme der DPPC/C₁₁IPr-Lipidmischungen mit einem C₁₁IPr-Anteil von 0 – 15 mol%. C) Vergrößerung der Thermogramme der DPPC/C₁₁IPr-Mischungen mit einem C₁₁IPr-Anteil von 5 – 15 mol% zur besseren Darstellung der Peakverbreiterung bei höheren Imidazoliumsalzkonzentrationen. D) Thermogramme der DPPC/C₁₁IPr-Lipidmischungen mit einem C₁₁IPr-Anteil von 25 und 50 mol%.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

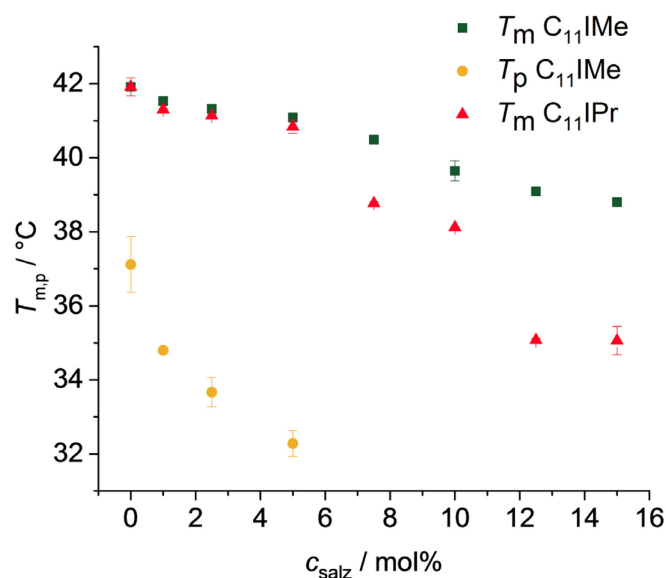


Abbildung 3-64: Auftragung der Vor- (T_p) und Haupt- (T_m) Phasenübergangstemperaturen der DPPC/Imidazoliumsalz-Mischungen gegen die Imidazoliumsalzkonzentration.

Die Untersuchung reiner $C_{11}\text{IPr}$ -Lösungen ergab, dass dieses Molekül nicht in der Lage ist, selbst mesoskopische Strukturen auszubilden, die thermotrope Phasenübergänge vollziehen. Dadurch können Doppelschichten und mizellare Strukturen rein aus $C_{11}\text{IPr}$ -Molekülen ausgeschlossen, und die beobachteten Effekte bei 25 und 50 mol% $C_{11}\text{IPr}$ in der DPPC-Membran auf abgetrennte $C_{11}\text{IPr}$ -Domänen oder DPPC-stabilisierte, gemischte mizellare Strukturen zurückgeführt werden. Untersuchungen mit hohen Konzentrationen $C_{11}\text{IME}$ sind schon literaturbekannt und ergaben ein Ausbleiben aller Phasenübergänge bei $C_{11}\text{IME}$ -Konzentrationen über 60 mol%.^[347]

3.6.5 Fluoreszenzspektroskopie

Um Informationen über Änderungen des Lipidordnungsparameters zu gewinnen, wurden fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen der drei in Kapitel 3.6.3 beschriebenen verschiedenen Lipidsysteme mit variablen $C_{11}\text{IME}$ - und $C_{11}\text{IPr}$ -Konzentrationen durchgeführt. Als Fluorophor wurde LAURDAN eingesetzt, welches eine Änderung seiner Fluoreszenzemissionswellenlänge abhängig von der Umgebungspolarität und somit des Membranphasenzustandes aufweist. In der Gelphase weist das LAURDAN ein Fluoreszenzintensitätsmaximum bei 440 nm auf, welches sich bei Temperaturerhöhung und damit einhergehendem

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Phasenübergang der Membran zu 490 nm verschiebt. Aus den Intensitäten bei diesen beiden Wellenlängen kann der *GP*-Wert ermittelt werden, welcher geräteunabhängig Auskunft über den Phasenzustand und den lateralen Ordnungsparameter der Membran gibt. Die erhaltenen Kurven sind in Abbildung 3-65 aufgetragen. Die erhaltene *GP*-Kurve für das reine DPPC (Abbildung 3-65A) zeigt den typisch, nahezu sigmoidalen Verlauf, wie er für einen kooperativen Phasenübergang zwischen zwei Zuständen zu erwarten ist. Bis zum Hauptphasenübergang bei 41,9 °C sind die *GP*-Werte annähernd konstant und sinken stark beim Übergang von der Gel- in die L_{α} -Phase. In der fluiden Phase besitzen die Alkylketten, aufgrund des hohen Anteils an *gauche*-Konformeren und Kinken, eine hohe Konformationsunordnung, wodurch, in diesem Fall, das umgebende Wasser leicht in die obere Region der Lipiddoppelschicht eindringen kann und so die Polarität dort erhöht. Diese Polaritätserhöhung resultiert in einem Anstieg der Fluoreszenzemissionsintensität des LAURDANS bei einer Wellenlänge von 490 nm und damit einer Abnahme der *GP*-Werte bis in den negativen Wertebereich. Die bestimmte Phasenübergangstemperatur deckt sich mit der in der DSC ermittelten Übergangstemperatur von 41,9 °C und dem Literaturwert.^[1,356] In der Gelphase überwiegt die *all-trans*-Konformation der Alkylketten und die laterale und Rotationsdiffusion sind eingeschränkt. Dadurch ist die Umgebung des LAURDANS weniger polar und das Fluoreszenzintensitätsmaximum bei 440 nm angesiedelt. Die erhaltenen *GP*-Werte des DPPCs liegen um 0,5, was einer dichtgepackten und kristallinen Gelphase entspricht.

Die Zugabe beider Imidazoliumsalze führt in allen untersuchten Membransystemen zu ähnlichen Ergebnissen. In der Gelphase bewirkt der Einbau beider Salze eine konzentrationsabhängige Abnahme der *GP*-Werte und eine Verbreiterung des Phasenüberganges. Unterhalb von T_m zeigt das C₁₁IMe einen wesentlich höheren Effekt auf die Verschiebung der *GP*-Werte als das C₁₁IPr. Dies hingegen zeigt den größeren Einfluss in der fluiden Phase, wo es die Lipidordnung im Vergleich zu den reinen Systemen deutlich erhöht. C₁₁IMe zeigt hier keinen signifikanten Einfluss mehr. Auch die Absenkung und Verbreiterung des Phasenüberganges ist durch das C₁₁IPr deutlich ausgeprägter als durch das C₁₁IMe.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

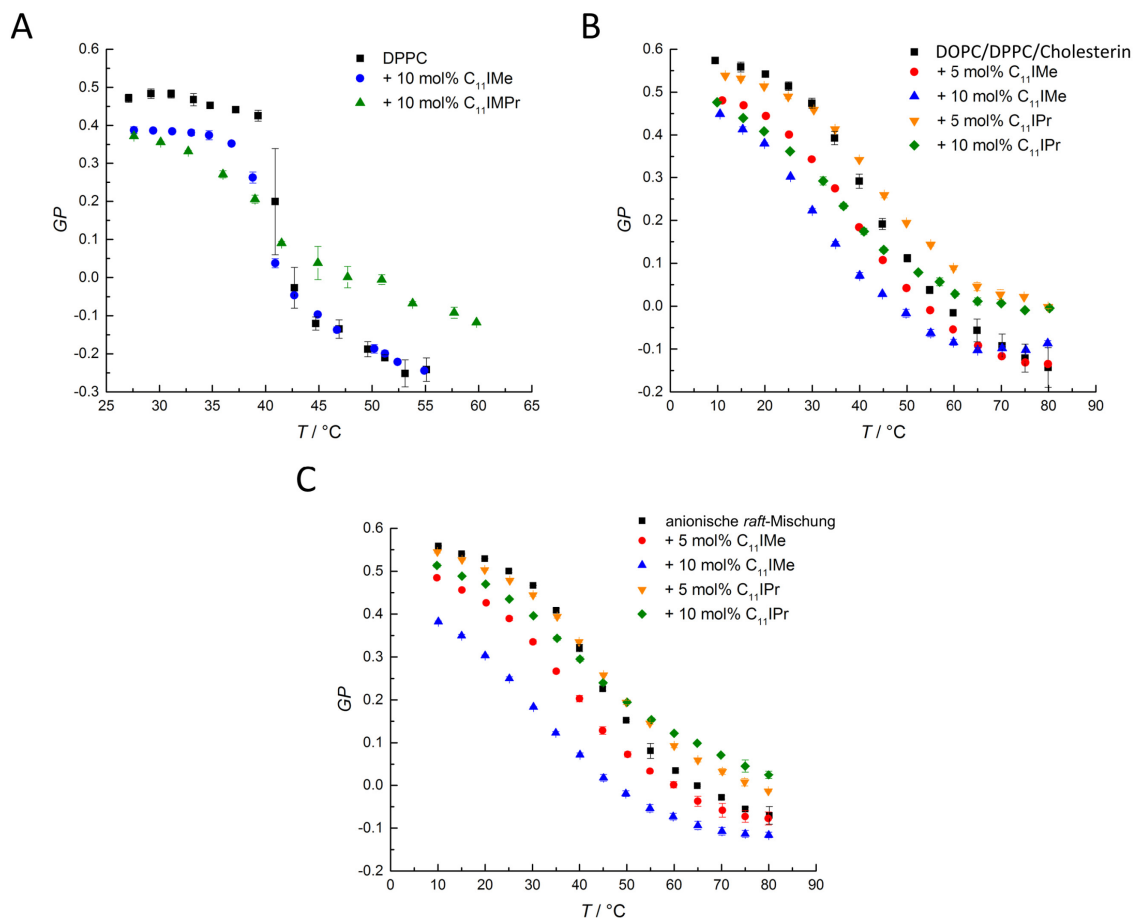


Abbildung 3-65: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen verschiedener Konzentrationen des C₁₁IMe und C₁₁IPr in den drei Lipidsystemen. Auftragung der GP-LAUDAN-Werte gegen die Temperatur für (A) DPPC, (B) DPPC/DOPC/Cholesterin (2:1:1) und (C) DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/Cholesterin (45:5:20:5:25) mit verschiedenen C₁₁IMe- und C₁₁IPr-Konzentrationen.

Die bestimmten T_m -Werte sind in nachfolgender Tabelle 3-9 aufgeführt. Allgemein kann gesagt werden, dass der Einbau des C₁₁IPr einen ähnlichen Effekt wie eine Cholesterin-Einlagerung in die Membran aufweist, welche durch einen ordnenden Effekt oberhalb und unordnenden Effekt unterhalb der Phasenübergangstemperatur gekennzeichnet ist.^[357] Da das 3- und 5-KS breite Phasenübergangsregionen aufweisen, ist für diese Systeme wieder keine Bestimmung einer genauen Phasenübergangstemperatur möglich. Das grundsätzliche Verhalten dieser beiden Lipidsysteme bei Einbau der Imidazoliumsalze war aber ähnlich zu dem des DPPCs.

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Tabelle 3-9: Fluoreszenzspektroskopisch bestimmte Hauptphasenübergangstemperaturen von DPPC mit und ohne C₁₁IME und C₁₁IPr.

System	$T_m / ^\circ\text{C}$
DPPC	$41,9 \pm 0,1$
DPPC + 10 mol% C ₁₁ IME	$40,8 \pm 0,1$
DPPC + 10 mol% C ₁₁ IPr	$38,4 \pm 0,1$

3.6.6 Zeta-Potenzial-Messungen

Um die Einflüsse der Imidazoliumsalzeinlagerungen auf die Oberflächenladungsdichte der Lipidmembranen zu untersuchen, wurden Messungen des Zeta-Potenzials ζ vorgenommen. Das ζ -Potenzial hängt bei den hier getätigten Untersuchungen besonders von der Einbaueffizienz der geladenen Imidazoliumsalze in die Lipiddoppelschicht ab, da es dem elektrischen Potenzial zwischen der hydrodynamischen Scherschicht eines Lipidvesikels einschließlich angrenzender Hydrathülle und einem entfernten Punkt im Umgebungsmedium entspricht. Der Einbau der positiv geladenen C₁₁IME- und C₁₁IPr-Moleküle in die neutral geladenen Vesikelsysteme sollte einen Anstieg bzw. einen Vorzeichenwechsel des Zeta-Potenzials bewirken, ähnlich einer Kationenadsorption an die Lipidgrenzfläche.^[354,358] Die erhaltenen Ergebnisse sind in nachfolgender Abbildung 3-66 gezeigt. Die reine zwitterionische DPPC-Membran weist ein Zeta-Potenzial von etwa 0 mV auf, welches sich bei Einlagerung von 10 mol% C₁₁IME auf bis zu etwa +12 mV erhöht. Dieser Anstieg ist ein Indiz für einen effizienten Einbau dieses Moleküls in die Membran. Im Vergleich dazu bewirkt eine Einlagerung von 10 mol% C₁₁IPr nur einen halb so großen Anstieg des Zeta-Potenzials, welches ein Hinweis auf eine etwas geringere Einbaueffizienz sein kann, oder wahrscheinlicher, aus einer Abschirmung der positiven Ladung aufgrund der großen und sterisch anspruchsvollen Kopfgruppe des C₁₁IPr resultiert.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

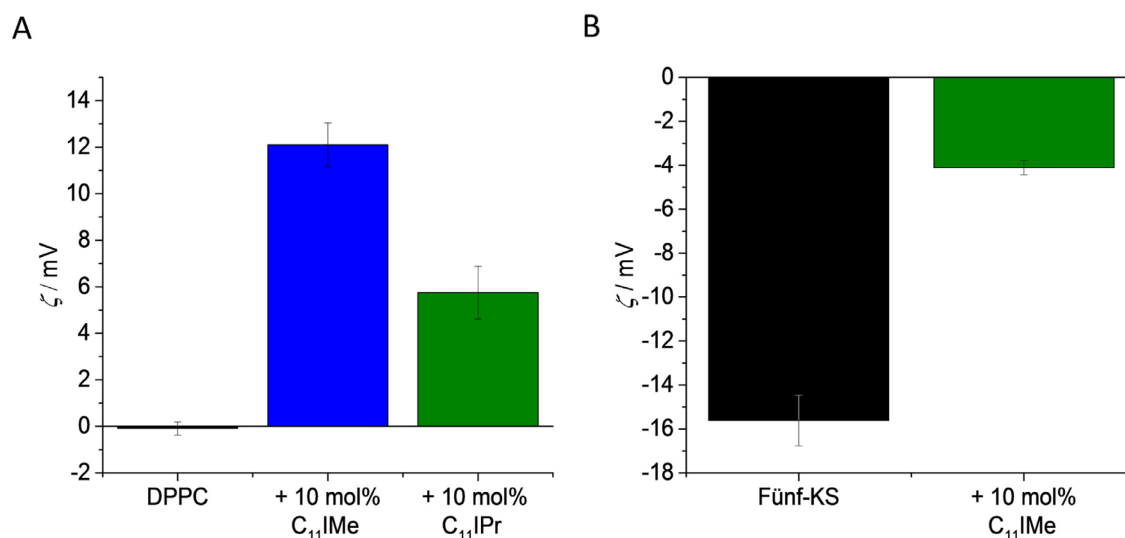


Abbildung 3-66: Zeta-Potenzial-Messungen einer (A) reinen DPPC-Membran und (B) anionischen 5 KS-raft-Mischung vor und nach Zugabe der Imidazoliumsalze. Der Einbau der Imidazoliumsalze bewirkt einen Anstieg des Zeta-Potenzials, welcher für das C₁₁Ime wesentlich ausgeprägter ist und für eine homogenere Einlagerung im Vergleich zum C₁₁IPr in die Membran spricht.

Die reine, anionische 5 KS-raft-Membran weist ein Zeta-Potential von ca. -16 mV auf, welches auch hier wieder um etwa 12 mV bei Einbau von 10 mol% C₁₁Ime ansteigt. Der Einbau von 10 mol% C₁₁IPr resultierte jedoch in einer Aggregation der Probenbestandteile jeweils direkt nach der Extrusion, wodurch keinerlei Zeta-Potenzial-Messungen mit diesem System durchgeführt werden konnten. Gründe für diese Aggregation können darin liegen, dass Zeta-Potenziale nahe Null zu einer spontanen Aggregation führen können, da die elektrostatischen Abstoßungen, die zu einer Vesikelstabilisierung beitragen, fehlen. Hohe Zeta-Potenziale um 20 mV sind bekannt dafür, Vesikel gegen Aggregation zu stabilisieren.^[1] Da der Einbau des C₁₁Ime aber auch in einem Zeta-Potenzial von -4 mV, also fast 0 mV, resultiert, ist die Ausbildung von π - π -Wechselwirkungen zwischen den Diisopropylphenyl-Gruppen eine weitere Möglichkeit, die zu einer Aggregation führen kann.^[359] Beide Effekte kombiniert könnten die beobachtete Aggregation auslösen.

3.6.7 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Zur detaillierten Untersuchung des Einflusses beider Imidazoliumsalze auf mesoskopische Strukturen und das Phasenverhalten von Lipidmembranen wurden konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Messungen durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss beider Imidazoliumsalze auf GUVs aus DPPC sowie dem 3- und 5KS bestehend untersucht. In die Lipidmembranen wurde das Fluorophor *N*-Rh-DHPE eingebaut, welches sich bevorzugt in die l_d -Phase einlagert und somit die fluiden Bereiche bei Vorliegen einer l_o - und l_d -Phasenkoexistenz markiert. Zuerst wurde der Einfluss des C_{11} IPr auf DPPC-GUVs untersucht (Abbildung 3-67). Der Effekt von C_{11} IME auf DPPC wurde schon mittels Fluoreszenzmikroskopie näher betrachtet und es konnte ein stark fluidisierender und unordnender Einfluss werden.^[346]

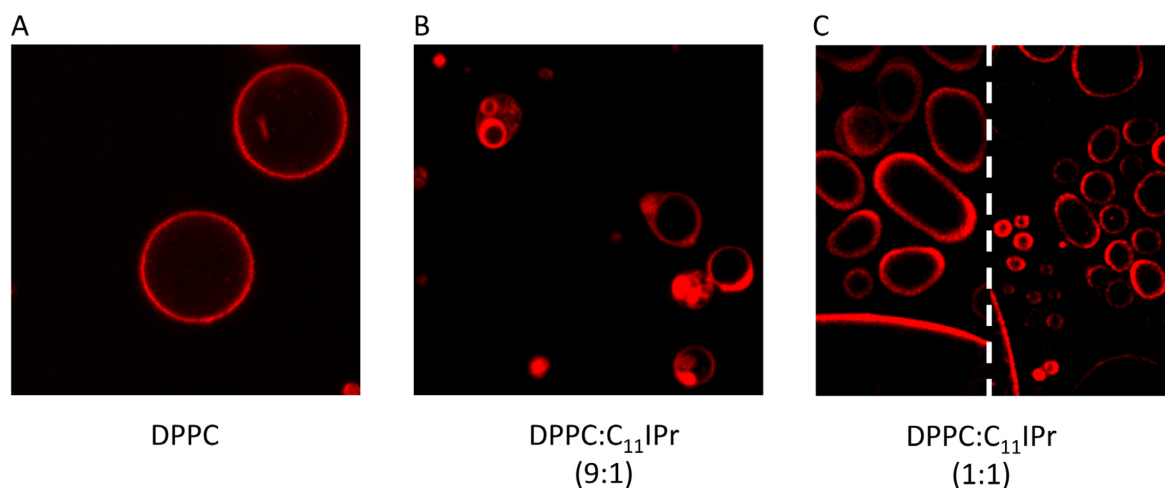


Abbildung 3-67: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von GUVs aus (A) DPPC, (B) DPPC/ C_{11} IPr (9:1) und (C) DPPC/ C_{11} IPr (1:1).

GUVs, welche rein aus DPPC bestehen, weisen eine sphärische Form auf. Der Einbau von 10 mol% C_{11} IPr führt schon zu deutlich sichtbaren Einschlüssen und Ausstülpungen an den Vesikeln. Bei einem gleichen molaren Anteil von DPPC und C_{11} IPr in den Vesikeln liegen diese stark oval verformt vor. Des Weiteren sind sehr große Vesikel und auch viele kleine Strukturen in dichter Nachbarschaft vorliegend zu sehen. Diese winzigen Strukturen können sowohl kleine Vesikel als auch abgetrennte, potenziell nicht-lamellare Aggregate sein. Im weiteren Verlauf wurde der Einfluss beider Imidazoliumsalze auf GUVs aus dem neutralen 3KS untersucht. Das thermotrope Verhalten dieses Systems ist in Abbildung 3-68 dargestellt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

DPPC/DOPC/Cholesterin (2:1:1)

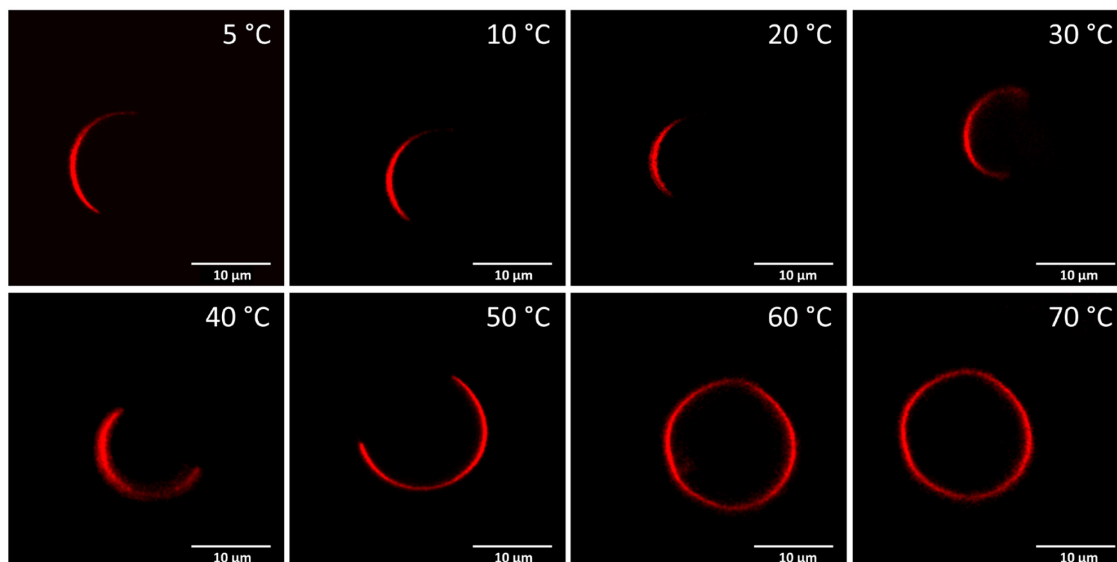


Abbildung 3-68: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen des thermotropen Phasenverhaltens des reinen 3 KS. Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen eines GUV im Bereich von 5 – 70 °C bei Atmosphärendruck. Die eingezeichnete Skala beträgt 10 µm und der verwendete Fluorophor war *N*-Rh-DHPE, welcher die l_d -Phase in den Aufnahmen rot markiert. Ab etwa 60 °C liegt das System komplett in der fluiden l_d -Phase vor.

Das neutrale reine 3 KS bildet ähnlich dem DPPC sphärische kugelförmige GUVs aus, die bis zu 60 °C noch in l_d - und l_o -Phase separiert vorliegen. Ab 60 °C ist der Fluorophor im gesamten GUV zu finden, was die vollständige Fluidisierung der Membran anzeigt. Außerdem sind oberhalb der Phasenübergangstemperatur die Vesikel nicht mehr gänzlich rund, sondern weisen eine Art leicht deformierbare Struktur auf, was einer Abnahme der Membranrigidität entspricht.^[360] Der Einfluss von C_{11} Ime und C_{11} Ipr auf die Morphologie und Struktur der GUVs aus dem 3 KS ist in Abbildung 3-69 gezeigt. Die Einflüsse von C_{11} Ime sowie C_{11} Ipr auf das thermotrope Verhalten sind in Abbildung 3-70 bzw. in Abbildung 3-71 dargestellt.

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

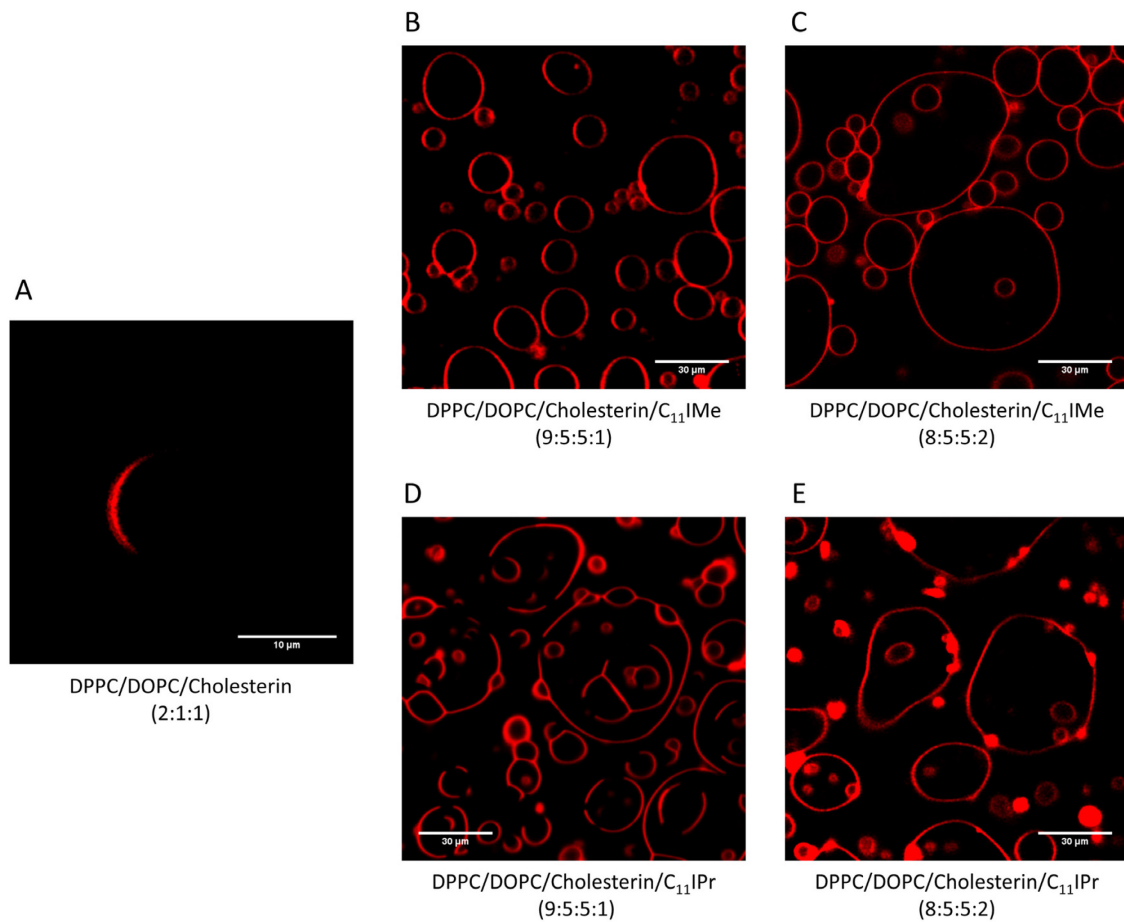


Abbildung 3-69: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von GUVs aus dem 3 KS mit und ohne C₁₁IME sowie C₁₁IPr. Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen zur Untersuchung des Einfluss von C₁₁IME sowie C₁₁IPr auf GUVs aus dem neutralen 3 KS bei 25 °C. (A) zeigt ein GUV aus dem reinen 3 KS, (B + C) zeigen die Auswirkungen von 5 bzw. 10 mol% C₁₁IME und (D + E) zeigen die Auswirkungen von 5 bzw. 10 mol% C₁₁IPr auf dieses Lipidmembransystem. Die Skala in (A) entspricht 10 µm und in (B – E) 30 µm.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

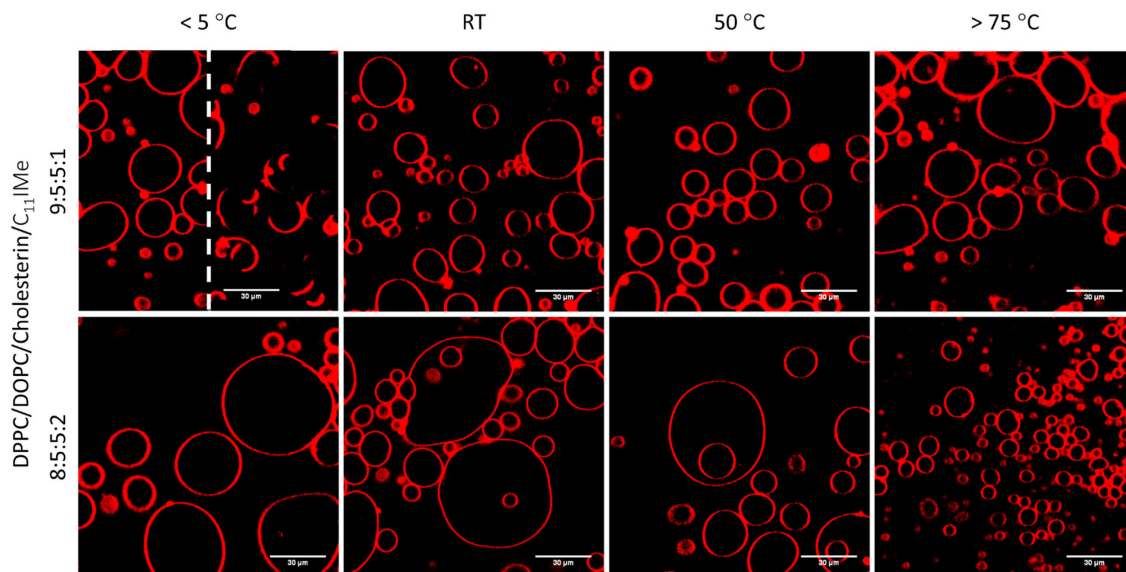


Abbildung 3-70: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von GUVs aus DPPC/DOPC/Cholesterin/C₁₁IMe im Temperaturbereich von 5 – 75 °C.

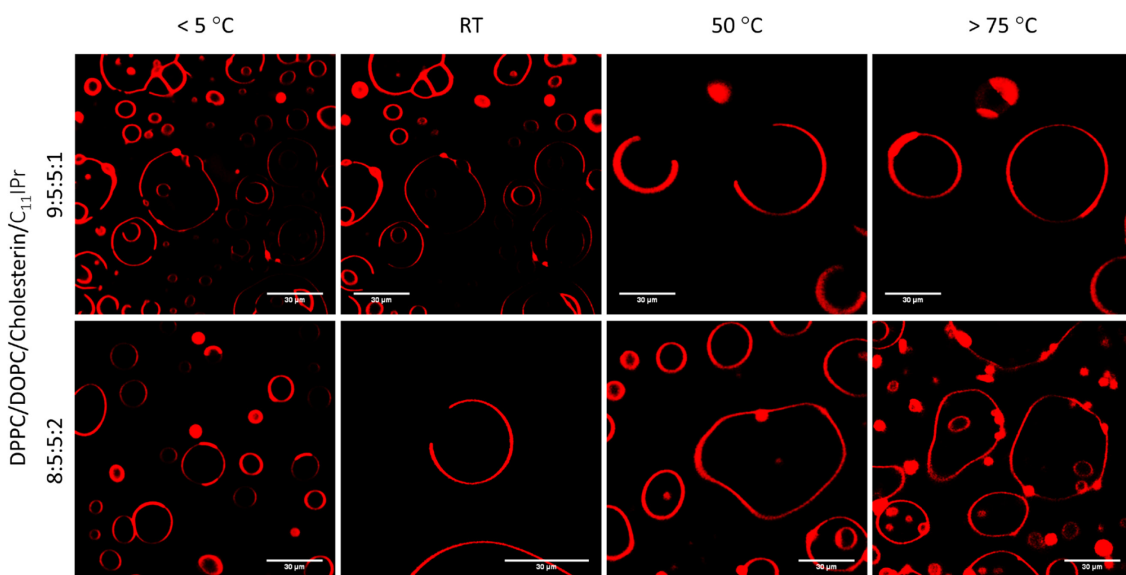


Abbildung 3-71: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von GUVs aus DPPC/DOPC/Cholesterin/C₁₁IPr im Temperaturbereich von 5 – 75 °C.

Bei einer 9:5:5:1 DPPC/DOPC/Cholesterin/C₁₁IMe-Mischung liegen kleine und größere GUVs nebeneinander vor. Eine *l_o-l_d*-Phasentrennung ist lediglich bei Temperaturen unterhalb von 5 °C auszumachen, wobei auch hier je nach Probe ein Ausbleiben dieser Phasentrennung beobachtet wurde. Dies kann auf geringfügige Konzentrationsunterschiede der

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

einzelnen Komponenten dieses Systems zwischen verschiedenen Messungen zurückgeführt werden. Somit weist das C₁₁IME einen stark fluidisierenden Effekt auf. Auch die Vesikelgrößen sind im Vergleich zum reinen System geringfügig angestiegen. Bei einer weiteren Konzentrationserhöhung des C₁₁IME's (10 mol%) konnte keinerlei Phasentrennung mehr beobachtet werden. Die Größe der GUVs variierte auch hier von sehr kleinen bis zu großen Vesikeln, die zusätzlich deformiert waren.

Derselbe Effekt auf die Vesikelgröße wurde auch für 5 mol% C₁₁IPr in der Lipidmembran beobachtet. Die kleinen und großen Vesikel wiesen jedoch teilweise noch eine Phasenseparation bis zu 50 – 55 °C auf. Zudem war auch eine vermehrte Aggregation der Vesikel zu beobachten, was auf Wechselwirkungen zwischen den eingebauten Molekülen verschiedener Vesikel hindeutet. Bei einem Verhältnis von 8:5:5:2 DPPC/DOPC/Cholesterin/C₁₁IPr bildeten sich neben großen, deformierten Vesikeln auch kleine sphärische sowie abgespaltene, eventuell mizellare Partikel. Die Phasenseparation fand hier noch bis zu 25 °C statt.

Als nächstes wurde das komplexere anionische 5 KS zu Untersuchungen des Einflusses der beiden Imidazoliumsalze herangezogen. Dabei wurden die beiden Moleküle in Konzentrationen von 1, 5 und 10 mol% in das Membransystem eingebaut. Die Konzentration des DPPC wurde wieder um die eingebaute Konzentration des jeweiligen Imidazoliumsalzes gesenkt. Abbildung 3-72 zeigt das temperaturabhängige Phasenverhalten des reinen 5 KS und in Abbildung 3-73 sowie Abbildung 3-74 ist der Einfluss des Einbaus verschiedener Konzentrationen des C₁₁IME sowie C₁₁IPr auf die Morphologie und das temperaturabhängige Phasenverhalten der GUVs dargestellt.

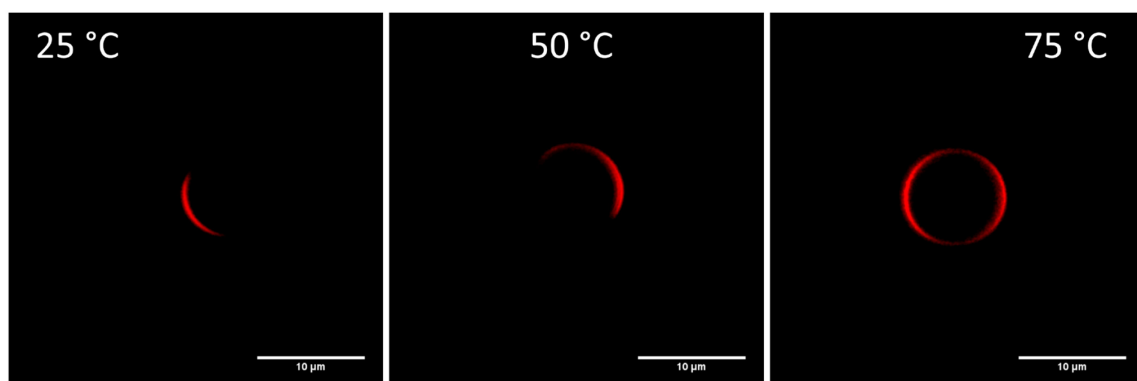


Abbildung 3-72: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahme des thermotropen Phasenverhaltens des reinen 5 KS.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

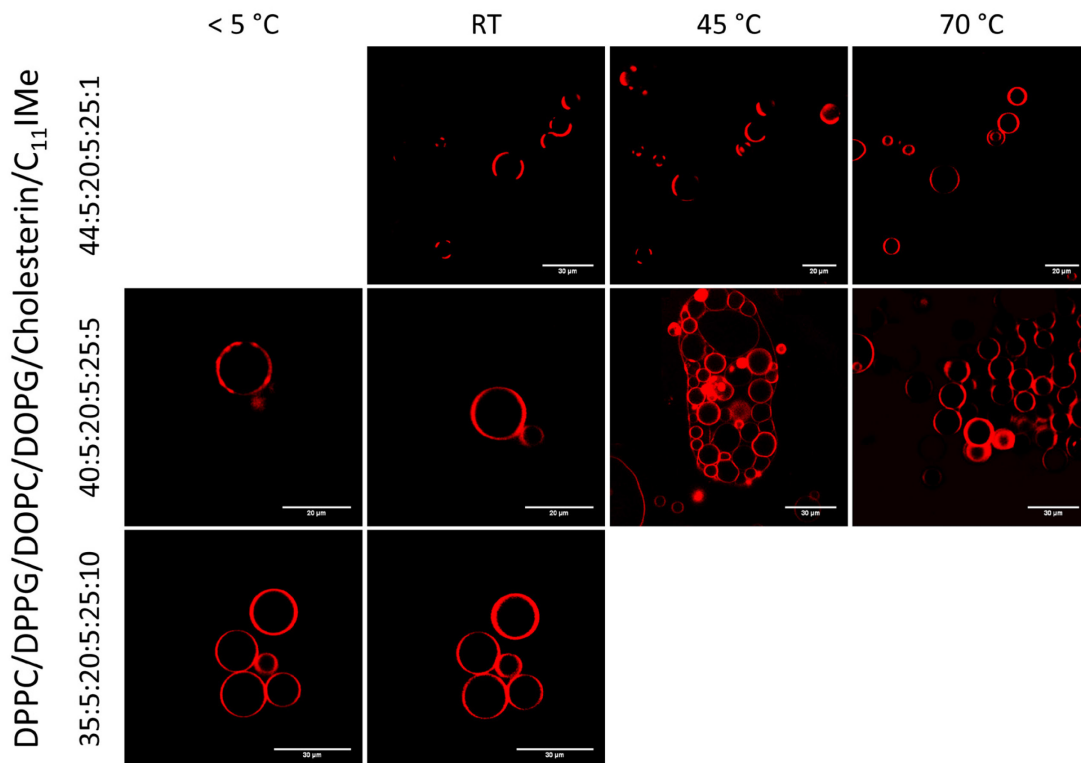


Abbildung 3-73: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahme des thermotropen Phasenverhaltens des 5 KS mit verschiedenen Konzentrationen an C_{11} IME.

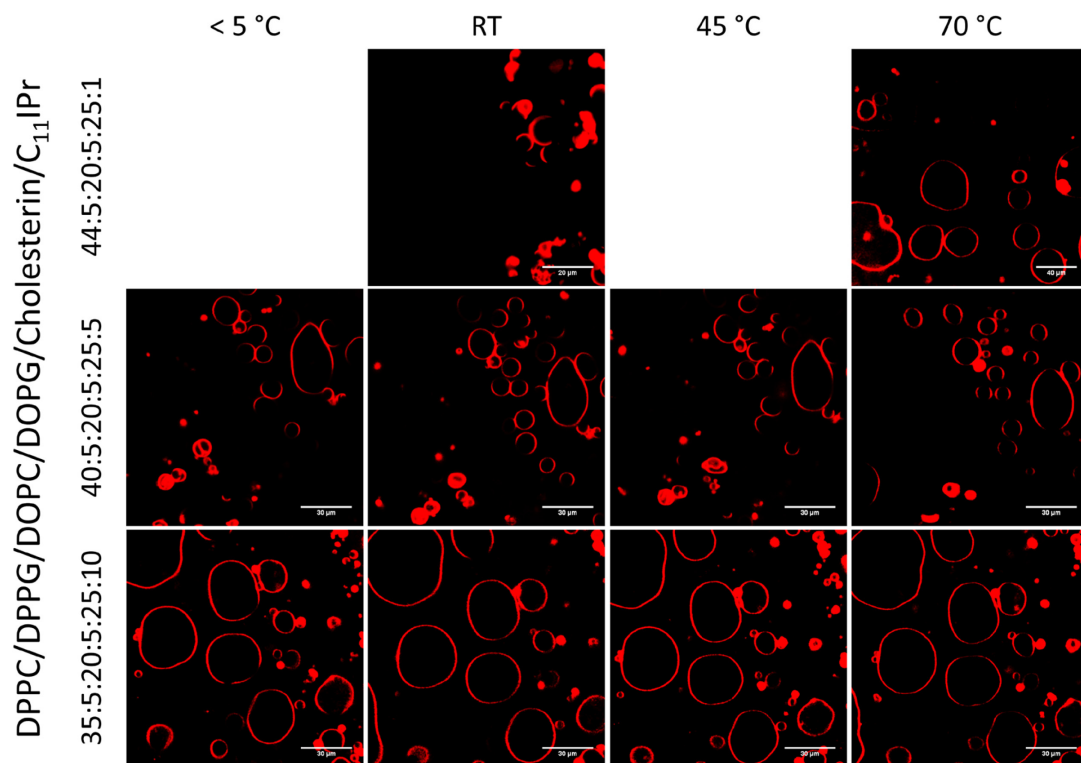


Abbildung 3-74: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahme des thermotropen Phasenverhaltens des 5 KS mit verschiedenen Konzentrationen an C_{11} IPr.

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Das reine 5 KS weist sphärische GUVs auf, die deutlich in die l_d - und l_o -Phasen separiert sind. Bei einer Temperaturerhöhung von 25 auf 50 °C nimmt der Anteil an fluoreszierender Membran zu, was auf eine Zunahme an l_d -Domänen hindeutet. Ab 75 °C ist die gesamte Membran rot gefärbt und somit komplett im fluiden Zustand. Eine genaue Bestimmung des Phasenübergangs ist hier, wie in der Fluoreszenzspektroskopie, aufgrund der Komplexität des Systems nicht möglich.

Das anionische 5-Komponenten-System mit 1 mol% $C_{11}IMe$ (44:5:20:5:25:1 DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/Cholesterin/ $C_{11}IMe$) zeigt weder morphologisch noch bezüglich seines temperaturabhängigen Phasenverhaltens Unterschiede zum reinen 5 KS. Ab 5 mol% $C_{11}IMe$ in den Vesikeln ist ein Anstieg der GUV-Größe im Vergleich zum reinen System zu erkennen und die Phasentrennung ist auch nur noch bei Temperaturen unterhalb von 7 °C auszumachen. Eine Verdopplung der eingebauten $C_{11}IMe$ -Konzentration lässt die Phasentrennung im untersuchten Temperaturbereich komplett verschwinden. Zusätzlich bilden sich noch kleine an den GUVs angelagerte, potenziell mizellare Strukturen aus. Der schon für das neutrale 3 KS fluidisierende Einfluss des $C_{11}IMe$ konnte somit auch hier wieder beobachtet werden.

Ein Einbau von 1 mol% $C_{11}IPr$ in das 5 KS (44:5:20:5:25:1 DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/Cholesterin/ $C_{11}IPr$) bewirkte, ähnlich wie 1 mol% $C_{11}IMe$, keine signifikanten Änderungen im Verhalten und der Struktur im Vergleich zum reinen 5 KS. Auch bei 5 mol% eingelagerten $C_{11}IPr$ verhielt sich dieses System in seinem thermotropen Phasenverhalten ähnlich dem mit 5 mol% $C_{11}IMe$, wies jedoch schon strukturelle Veränderungen auf. Kleine abgesonderte Partikel lagen neben großen deformierten sowie kleineren sphärischen Vesikeln vor. Bei einer weiteren Konzentrationserhöhung des $C_{11}IPr$ bildeten sich riesige deformierte GUVs und auch die Anzahl der kleinen abgesonderten Partikel stieg. Auch hier ist es möglich, dass dies mizellare Strukturen sind. Am auffälligsten ist jedoch der Anstieg in der Vesikelgröße. Eine Phasentrennung wurde auch bei Temperaturen unter 5 °C nicht beobachtet. In Abbildung 3-75 sind zur besseren Vergleichbarkeit repräsentative Bilder aller untersuchten Systeme bei 25 °C nebeneinander dargestellt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

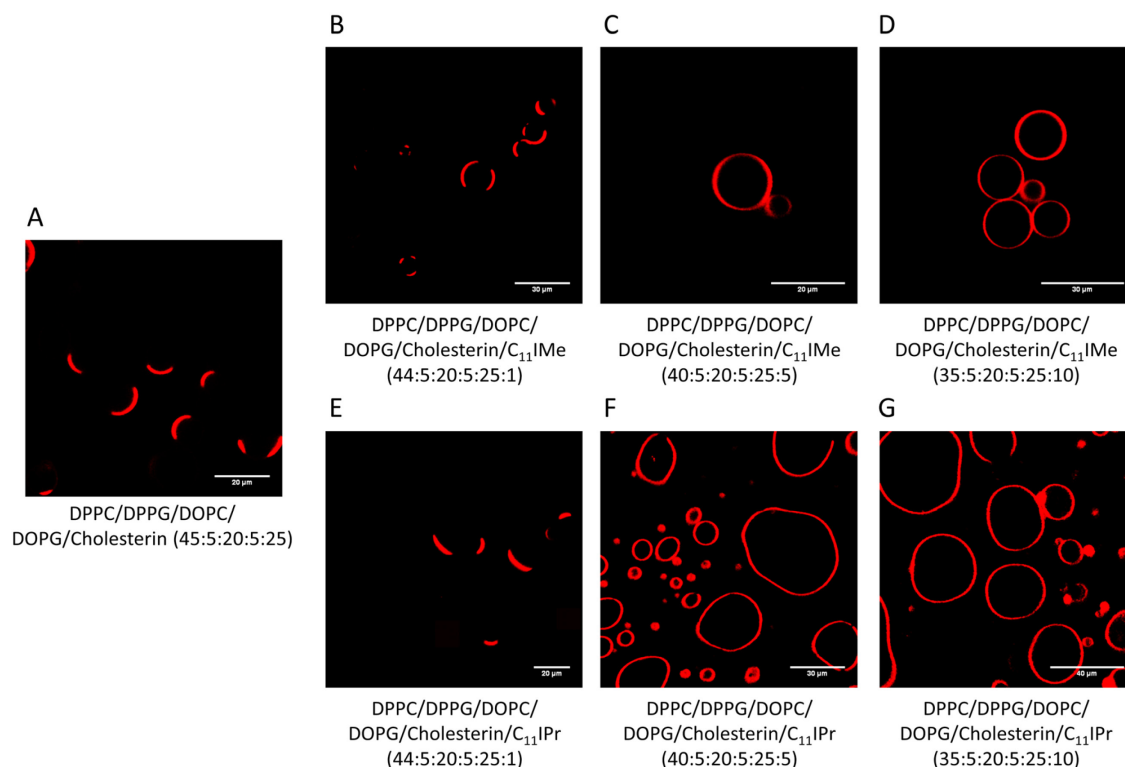


Abbildung 3-75: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahme des (A) reinen 5 KS mit verschiedenen Konzentrationen an (B-D) C₁₁IMe und (E-F) C₁₁IPr.

Grundsätzlich wurde der größte Effekt für 10 mol% C₁₁IPr beobachtet, da hierbei die Vesikel neben allen anderen bisher beschriebenen Einflüssen beträchtlich in ihrer Größe wuchsen. Augenscheinliche Abweichungen der beschriebenen Unterschiede in der Effektivität der beiden Imidazoliumsalze und ihrer Konzentrationen sind auf die ausgesuchten Fluoreszenzmikroskopiebilder zurückzuführen.

3.6.8 AFM-Messungen

Einflüsse der beiden Imidazoliumsalze auf die Struktur und die Morphologie einer Membran aus dem 3 sowie 5 KS auf submikrometer Skala wurden mit der AFM-Methode untersucht. Um Membranveränderungen durch externe Bedingungen möglichst gering zu halten, wurden die Messungen in einer Flüssigkeitszelle unter vollständiger Hydratation der Membransysteme durchgeführt. Die Proben wurden dazu auf einer planaren Micaoberfläche präpariert. Die erhaltenen AFM-Aufnahmen des 3KS mit und ohne C₁₁IMe sowie C₁₁IPr sind als zweidimensionale Darstellung in Abbildung 3-76 und als dreidimensionales Schema in Abbildung 3-77 dargestellt. Wie auch schon bei den Zeta-Potenzial-Messungen

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

schlugen die Versuche, eine stabile, unilamellare Doppelschicht aus dem anionischen 5KS mit dem C_{11} IME sowie C_{11} IPr zu bilden, fehl.

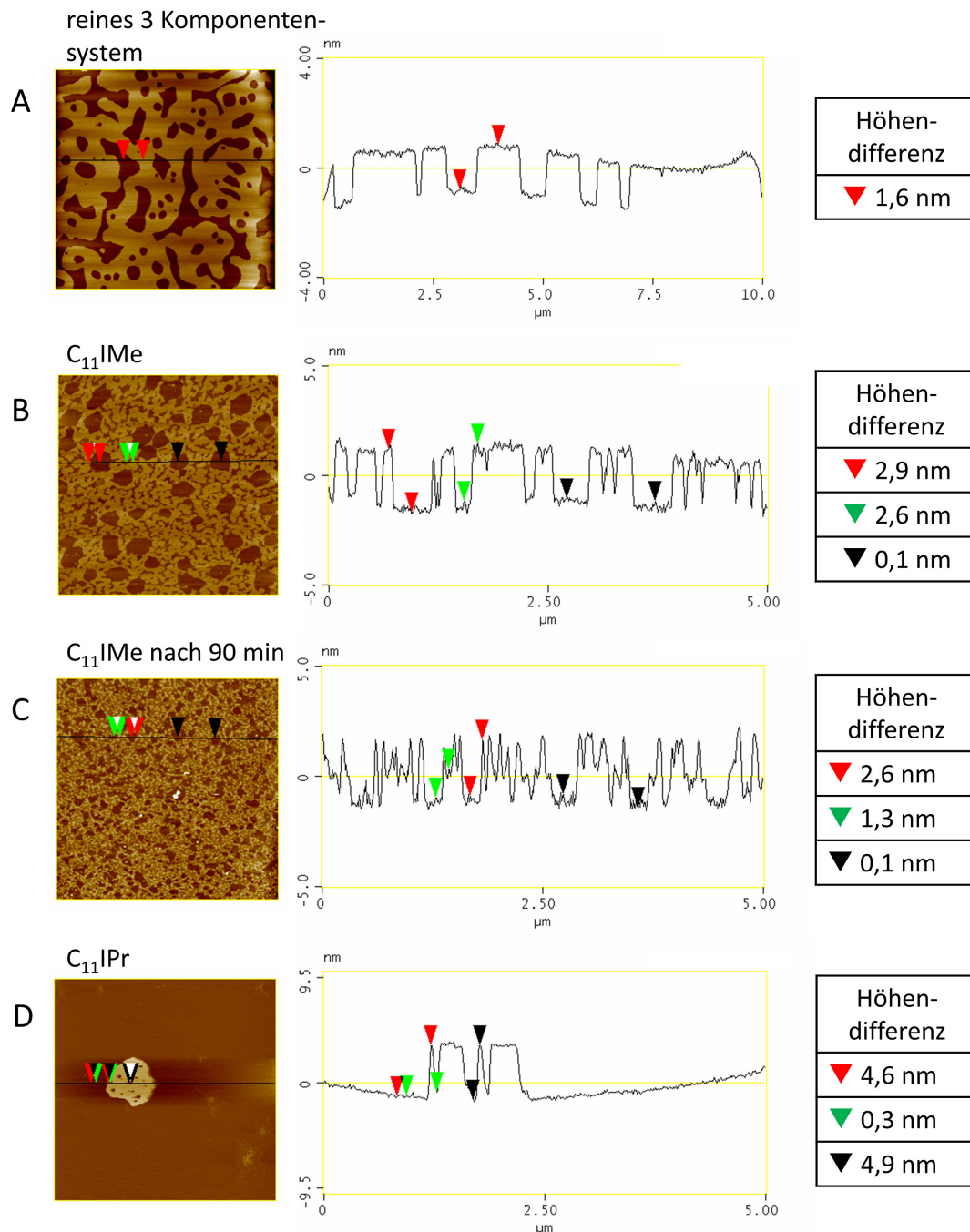


Abbildung 3-76: AFM-Aufnahmen des 3KS mit und ohne C_{11} IME und C_{11} IPr. (A) Aufnahme des reinen 3KS; (B) 3KS mit 10 mol% C_{11} IME, aufgenommen direkt nach der Probenherstellung; (C) 3KS mit 10 mol% C_{11} IME, aufgenommen 90 min nach der Probenherstellung; (D) 3KS mit 10 mol% C_{11} IPr. Die Abbildungen zeigen eine gescannte Probenoberfläche von $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ in (A) und $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ in (B-D).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

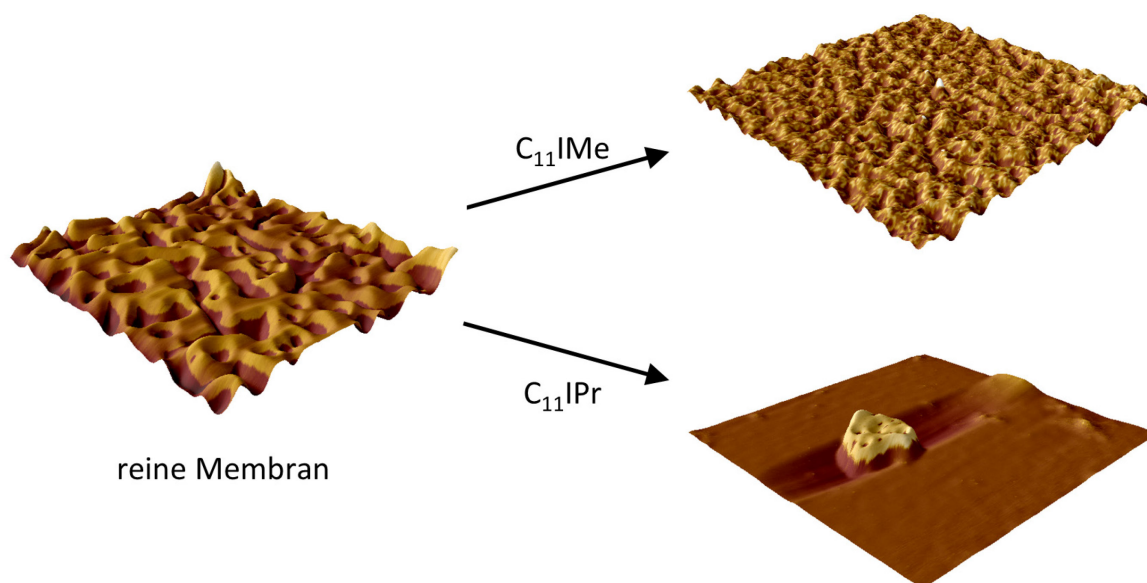


Abbildung 3-77: 3D-Darstellung des Einflusses von $C_{11}IME$ und $C_{11}IPr$ auf eine neutrale 3 KS-Membran.

Das reine neutrale 3 KS zeigt eine deutliche Phasentrennung in l_o - und l_d - Domänen. Die helleren Bereiche sind der l_o -Phase zuzuordnen und die dunkleren entsprechen der l_d -Phase. Die bestimmte Höhendifferenz zwischen beiden Phasen liegt mit etwa 1,6 nm in guter Übereinstimmung mit der Literatur.^[62,361,362]

Die Einlagerung von 10 mol% $C_{11}IME$ bewirkt unmittelbar nach der Doppelschichtpräparation eine Verkleinerung der Domänengrößen und eine feinere Verteilung der flüssig-ungeordneten Domänen. Grund dafür kann der Einbau des $C_{11}IME$ in die Grenzlinien zwischen den ungeordneten und geordneten Domänen sein, was eine Reduzierung der Grenzlinienspannung bewirkt. Durch den Einbau des $C_{11}IME$ an diese Stelle werden die *hydrophoben mismatches* signifikant reduziert. Die Höhendifferenz zwischen beiden Domänentypen hingegen stieg um etwa 1 nm auf etwa 2,8 nm an. Eine weitere Auffälligkeit dieses Membransystems mit eingelagertem $C_{11}IME$ war, dass 90 min nach Präparation der Proben die l_d -Phasen noch feiner aufgeteilt vorlagen (dispergiert) und nicht nur zwei verschiedene Höhenebenen der Domänen, sondern drei Höhenstufen in der Probe zu erkennen waren. Die Schichtdickendifferenz zwischen der l_d -Phase und l_o -Phase beträgt weiterhin etwa 2,5 nm, allerdings gibt es eine weitere Höhenstufe, die in Relation zur l_d -Phase um rund

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

1,3 nm höher liegt. Dies ist ein Indiz für eine eigenständige laterale Struktur bzw. Domänen aus abgetrennten C₁₁IME-Agglomeraten geringerer Höhe.

Der Einbau von 10 mol% C₁₁IPr resultierte direkt in einer signifikanten Aggregation des Imidazoliumsalzes in abgetrennte Bereiche. Der Höhenunterschied dieser Cluster zur 3 KS-Lipiddoppelschicht war mit 4,5 nm so groß, dass es nicht mehr möglich war, die l_o- und l_d-Phasen dieses Systems abzubilden.

3.6.9 Zusammenfassung

Imidazoliumsalze sind aufgrund ihrer hohen Stabilität, großen Variabilität und relativen Einfachheit in ihrer elementaren Synthese in den letzten Jahren sehr attraktiv für viele Anwendungen in den Materialwissenschaften und in biologischen Systemen geworden.^[332,333,340] Seit 2015 wurden Imidazoliumsalze mit langen Alkylketten in ihrem Rückgrat als Lipidanaloga etabliert. In diversen Untersuchungen wurde von ihren verschiedenen Einflüssen auf Phospholipidmembranen sowie von unterschiedlichen Arten der Interkalation in diese Membranen abhängig von ihrer jeweiligen Struktur berichtet. Des Weiteren konnten zytotoxische Effekte sowie Anti-Tumoraktivitäten festgestellt werden.^[49,50,344,346,347]

In dieser Studie wurde das neuartige Imidazoliumsalz 1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)-4,5-diundecylimidazoliumbromid (C₁₁IPr) auf seine Einflüsse und physiochemischen Eigenschaften auf Modellbiomembranen verschiedener Komplexität untersucht. Das komplexeste gewählte Membransystem bestand aus DPPC/DPPG/DOPC/DOPG/Cholesterin, somit 10 mol% anionisch geladenen Lipidmolekülen, und simulierte daher am besten natürlich vorkommende Membranen. Weitere untersuchte neutral geladene Membransysteme waren DPPC und DPPC/DOPC/Cholesterin. Die gewählten Untersuchungsmethoden waren sowohl von spektroskopischer, thermodynamischer als mikroskopischer Natur, um möglichst umfassende Einsichten in die Effekte der lipidierten Imidazoliumsalze zu erhalten. Der Fokus aller Untersuchungen lag dabei auf ihren Effekten auf die laterale Organisation der Lipiddoppelsicht, da diese in bisherigen Studien nicht im Fokus standen. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit schon publizierten oder auch hier in dieser Arbeit erbrachten Resultaten des 1,3-dimethyl-4,5-diundecylimidazoliumiodid (C₁₁IME), welches eine kleinere Kopfgruppe aufwies, verglichen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

Beide lipidartigen Imidazoliumsalze haben einen senkenden Effekt auf die Gel-zu-flüssig Phasenübergangstemperatur der Phospholipiddoppelschicht und somit einen fluidisierenden Einfluss gezeigt, der für C₁₁IPr bei allen untersuchten Systemen deutlicher ausgeprägt war. Dies war aufgrund der bisherigen Kenntnisse über den Einfluss einer großen Kopfgruppe zu erwarten.^[344] Der Gel-zu-Gel-Vorübergang des DPPC verschwand schon bei geringen Imidazoliumsalzkonzentrationen aufgrund der Ausbildung von Phasenkoexistenzgebieten, die zu Packungsfehlern in der Membran führen, wobei die Insertion beider Imidazoliumsalze in die Membran sehr effizient war, wie aus den Zeta-Potenzial-Messungen entnommen werden konnte. Aufgrund der kleineren Kopfgruppe des C₁₁IME ließ sich dies etwas besser in die Membransysteme einbauen als das C₁₁IPr. Im anionischen Membransystem war es durch den Einbau des C₁₁IME und C₁₁IPr sogar möglich, eine Ladungsumkehr zu bewirken. Dieser Effekt könnte für Arzneimittel oder Gentransporte sowie Lipidvesikel-gestützten Transport von negativ geladener DNA oder RNA genutzt werden.

In heterogenen Membranen war durch Einbau beider lipidartigen Imidazoliumsalze eine Absenkung der l_o- zu l_d- Phasenübergangstemperatur zu beobachten. Ferner war eine Verschlechterung der Ordnung der lateralen Domänenstruktur der Membran in Form von Bildung einer gewellteren lateralen Struktur aufgrund der Abnahme der Grenzflächenspannung an den Domänengrenzen festzustellen. Solche Änderungen der lateralen Organisation heterogener Mehrkomponentenmembranen resultieren in schwerwiegenden Auswirkungen auf membranunterstützte Signal- und Transportprozesse. Des Weiteren waren durch den Einbau beider Imidazoliumsalze in die Lipidvesikel signifikante Änderungen der Morphologie der GUVs zu sehen, welche mit steigender Imidazoliumsalz-Konzentration stärker ausgeprägt waren. Auch hier wies das C₁₁IPr den größeren Effekt der beiden Salze auf. In den AFM-Messungen waren starke Segregations-Prozesse beider Imidazoliumsalze in der anionischen Membran zu beobachten, was zu einer hohen positiven Ladungsdichte in diesen abgetrennten Bereichen führt. Dabei aggregierte das C₁₁IPr in wesentlich größeren Domänen als das C₁₁IME, wodurch eine stärkere Membrankrümmung hervorgerufen wird. Dies konnte auch in den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen beider *raft*-Membransysteme bestätigt werden, da dort vergrößerte und verzerrte Vesikel beobachtet werden konnten. Solche Effekte, die die Biegesteifigkeit verringern und die Membrankrümmung

3.6 Einfluss von imidazoliumbasierten Lipiden auf verschiedene Lipidmodellmembranen

steigern, werden als notwendig für die Einleitung von Membranfusionsprozessen erwogen, wodurch sich mögliche Anwendungen im Wirkstoff- oder Gentransfer ergeben.^[363,364]

Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigen deutlich (schematische Zusammenfassung in Abbildung 3-78), dass die Membraninteraktion von 4,5-dialkylimidazoliumsalzen nicht nur von der Kettenlänge, sondern auch im starken Ausmaß von der Sperrigkeit der Kopfgruppensubstitutionen und ihrer Wechselwirkungen abhängen. Diese Interaktionen können, abhängig von der Kopfgruppengröße, -Ladung und chemischen Zusammensetzung, von einem fluidisierenden Effekt bis zu ausgeprägten Veränderungen der lateralen Membranorganisation, Lipiddomänenstruktur und Vesikelform führen. Aus diesem Grund scheinen diese Salze gut anwendbar in biochemischen und biotechnologischen Prozessen zu sein. Des Weiteren besitzen sie ein großes Potenzial für antimikrobielle Aktivitäten, mittels Membranstörungen und Membran-*leakage*, für einen Wirkstofftransfer durch Verbesserung der Permeabilität, und für den Gentransfer durch Erhöhung fusogener Vesikeleigenschaften.

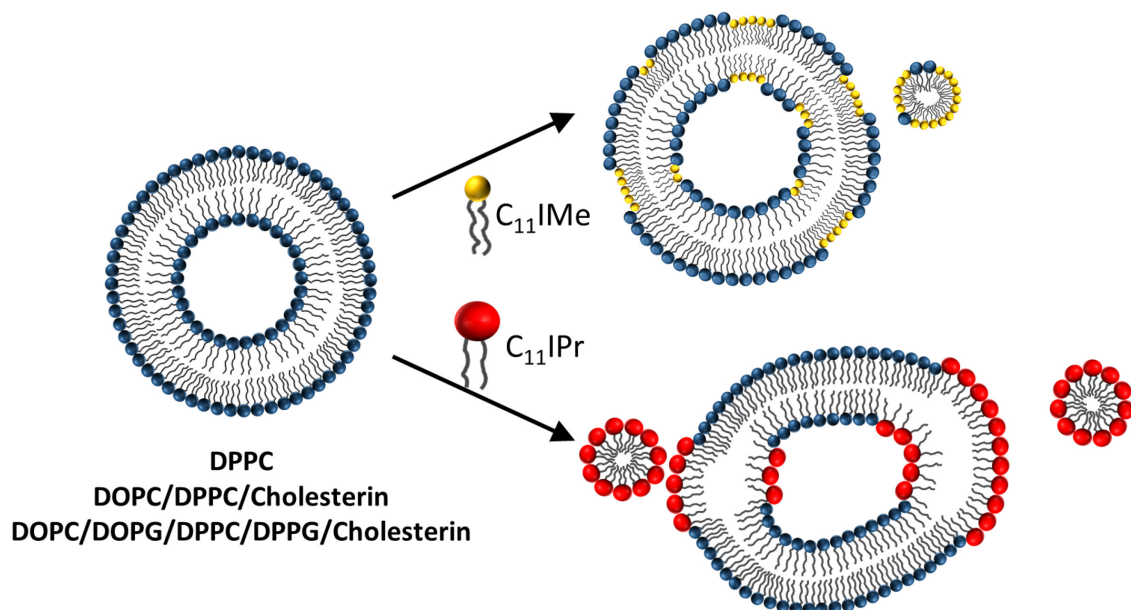


Abbildung 3-78: Schematische Darstellung des Einflusses beider untersuchter Imidazoliumsalze auf Lipidvesikel.

3.7 Untersuchung der Transfektionseigenschaften imidazoliumbasierter Lipide

Die hier beschriebenen Ergebnisse stammen aus der Kooperation mit dem Organisch-Chemischen Institut der WWU Münster, Arbeitsgruppe Prof. Dr. GLORIUS. Einige der hier präsentierten Ergebnisse wurden als interdisziplinäre Studie in Chem. Eur. J. (2020) publiziert.

3.7.1 Lipofektion

Die Möglichkeit, Organismen gezielt durch Genapplikation zu verändern, hat die Wissenschaft und insbesondere die Medizin in den letzten Jahrzehnten revolutioniert. Dabei stehen vor allem die Erforschung von Gen-Funktionen und die Behandlung vererbbarer Krankheiten mittels Gentherapie im Fokus der Forschung.^[365] Die Möglichkeiten der Durchführung eines Gentransfers sind dabei vielfältig und basieren auf unterschiedlichsten biologischen, physikalischen und synthetischen Verfahren. Alle diese Arten bieten ihre Vor- und Nachteile. Ein Gentransfer mittels viraler Vektoren besitzt eine hohe Effizienz, birgt aber auch ein großes Risiko von Immunreaktionen und Komplikationen bis hin zur Kanzerogenität *in vivo*.^[366–370] Physikalische Methoden, wie Elektroporation oder Mikroinjektion, sind zumeist nicht *in vivo* durchführbar, eine Ausnahme davon bildet die direkte Injektion. Synthetische Systeme hingegen haben den Vorteil, dass die Vesikel, welche zum Gentransfer genutzt werden, unter definierten Bedingungen synthetisiert und appliziert werden können. Definitionsgemäß wird unter Transfektion das Einbringen von Fremd-DNA in eine Zelle verstanden.^[371,372] Viren bilden dabei ein durch die Evolution optimiertes, effizientes Transfektionssystem. Eine weitere Möglichkeit bietet die Verwendung von kationischen Lipiden in Form von sogenannten Lipoplexen, die über elektrostatische Interaktionen mit der Membran interagieren und die DNA assoziieren. Dieser Prozess läuft meist über den Einschluss der Nukleinsäuren entweder in multilamellaren Schichten von kationischen Lipidmembranen, in denen sich Lipiddoppelschichten und Nukleinsäure-Ebenen abwechseln^[373–376], oder in Polymeren ab.^[377] *In vivo* weisen diese Systeme zwar eine geringe Effizienz auf, jedoch wird eine immunologische Inertie angenommen, wodurch die Gefahr von Komplikationen abgesenkt wird.^[368] Die kationischen Lipoplexe setzen sich zumeist aus kationischen Lipiden oder einer Mischung von neutralen Helferlipiden und kationischen Lipiden zusammen. Wichtig für einen Gentransfer sind vor allem das Vorhandensein einer Kopfgruppe mit positiver Ladung, einer hydrophilen oder lipophilen Ankergruppe und einem Spacer zur Verbindung dieser beiden zuvor genannten Komponenten.^[378] Die Erforschung der Verwendung neutraler Helferlipide, wie DOPE, Cholesterin oder DOTAP

3.7 Untersuchung der Transfektionseigenschaften imidazoliumbasierter Lipide

bewirkte eine Verbesserung der Transfektionseffizienz in eukaryotischen Zellen.^[363,368,377,379–382] Abhängig von den zellulären Spezifikationen wurde daher ein breites Spektrum an kationischen Lipiden und Polymeren für die Lipofektion vorgeschlagen.^[368,377] Ein weiterer großer Vorteil der Lipoplexe ist ihre einfache Präparation und Beladung mit DNA. Zu den hergestellten kationischen Lipiden wird lediglich die negativ geladene Cargo-DNA gegeben, was in einer unmittelbaren Umlagerung, dem Beladen oder schichtweisen Einschluss resultiert.^[363,377,380] Dieser DNA-Lipid-Komplex weist dabei auf der DNA abgewandten Seite eine positive Nettoladung auf, die eine Fusion mit anionischen biologischen Zellmembranen induziert. Die Mechanismen der Fusion und Endozytose sowie der anschließenden Freisetzung der DNA sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt und aktuell werden dazu verschiedene Ansätze diskutiert.^[363,368,377,380,382–384] Bekannt ist, dass sogenannte Helferlipide wie DOPE oder Cholesterin die Transfektionseffizienz dieser Lipoplexe, vermutlich durch eine verstärkte Tendenz zur Induktion transienter und lokaler, nicht-lamellarer Phasen in der Lipoplexmembran, stark erhöhen.^[363,368,380–382]

3.7.2 Transfektionsförderndes imidazoliumbasiertes Lipid

In einer nachfolgenden Studie wurde ein weiteres neuartiges Imidazoliumsalz-basiertes Lipid (Abbildung 3-79) untersucht, welches auf der Basis der schon erhaltenen Ergebnisse so entworfen wurde^[49,50,336–339], dass eine geringe Störung der Membranintegrität und verstärkte Fusions- und Transfektionseigenschaften gegeben sein sollten. Aufgrund seiner strukturabgeleiteten, zu erwartenden transfektionsfördernden Eigenschaften wird es im folgenden Text als TM bezeichnet.

Die Untersuchungen zum Einbau des TMs in biologische Membranen fanden mit den in Kapitel 3.6.1 beschriebenen Membransystemen statt und die Studien zum Transfektionspotenzial wurden mit der 5 Komponenten-Membran als anionische Zielmembran und einer DOPE/DPPC- (1:1) Lipidmischung als Trägersystem des TMs durchgeführt. DOPE ist ein Lipid mit einer neutralen Nettoladung und einer kleinen Ethanolamin-Kopfgruppe, welches in einer Membran eine negative Krümmung verursacht und bevorzugt nichtlamellare Phasen ausbildet.^[11] Diese beiden Eigenschaften sind für die Einleitung einer Membranfusion als nützlich beschrieben.^[385]

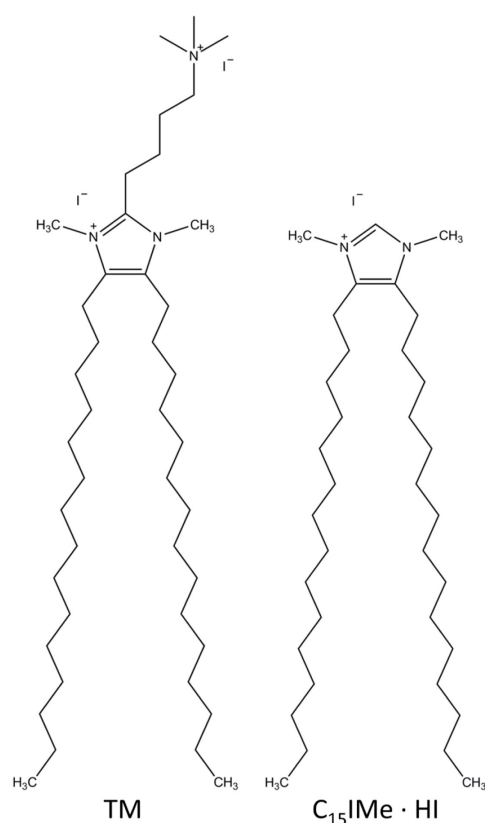


Abbildung 3-79: Chemische Struktur des transfektionsfördernden (imidazoliumbasierten) Moleküls (TM) und des Vergleichsmoleküls C₁₅IME·HI.

Im Vergleich zu den beiden imidazoliumbasierten Molekülen aus Kapitel 3.6 besitzt das hier untersuchte TM zwei benachbarte positive Ladungen in der Kopfgruppenregion. Um deren Einfluss auf das fusogene Potenzial dieses Moleküls herausstellen zu können, wurden Vergleichsexperimente mit dem C₁₅IME·HI durchgeführt, welches dieselbe Grundstruktur wie TM aufweist, dem aber die zweite positive Ladung an der 2'-Position des Imidazoliumringes fehlt.

3.7.3 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie erlaubt es, tiefere Einblicke in das Phasenübergangsverhalten und Änderungen des Ordnungsparameters zu gewinnen. Auch hier wurde wieder als Fluoreszenzsonde LAURDAN in einer DPPC, DPPC/DOPE/Cholesterin (2:1:1) (im Folgenden als 3 KS-T bezeichnet) und dem heterogenen, anionischen *raft*-Membransystem (5 KS) verwendet. Die Auftragung der *GP*-Werte erfolgte wieder über Mittelung der Intensitätswerte bei den Wellenlängen von 440 nm sowie 490 nm gegen die jeweilige Temperatur

3.7 Untersuchung der Transfektionseigenschaften imidazoliumbasierter Lipide

(Abbildung 3-80). Die erhaltenen Kurven für DPPC und DPPC/TM weisen beide einen nahezu sigmoidalen Verlauf auf. Bis zu einer Temperatur von 41 °C, ab der der Phasenübergang von der Gel- zur fluiden (L_{α}) Phase stattfindet, sind die GP -Werte des DPPCs nahezu konstant über 0,5. Unterhalb der Hauptübergangstemperatur, T_m , liegen die Alkylketten des Lipids in einer *all trans*-Konformation vor, wodurch die laterale und Rotationsdiffusion der Lipide eingeschränkt ist und somit die Umgebung des Fluorophors weniger polar ist. Daraus resultieren das Fluoreszenzemissionsmaximum bei 440 nm und hohe GP -Werte von 0,5 in der dichtgepackten und geordneten Gelphase.

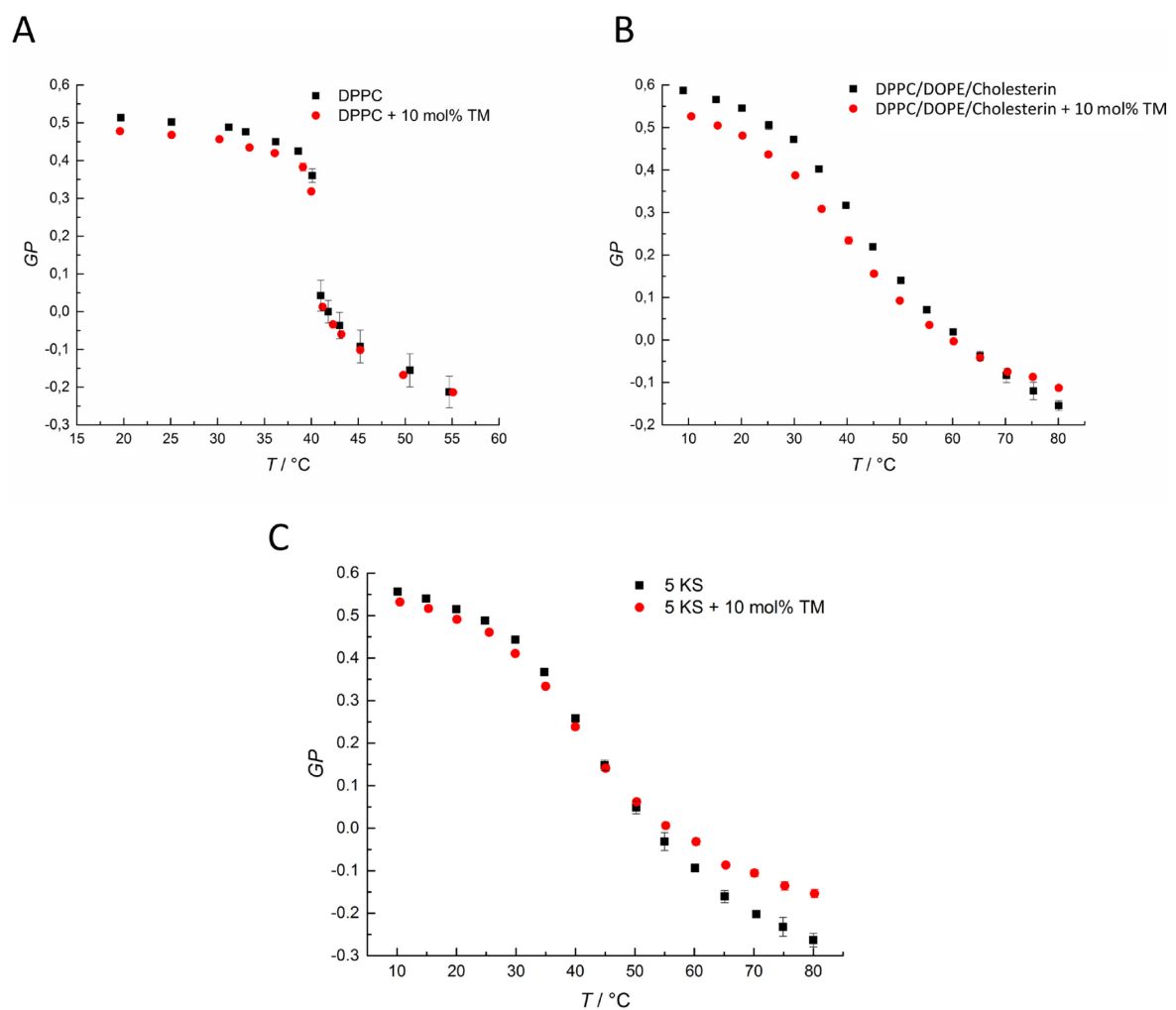


Abbildung 3-80: Auftragung der GP -Werte gegen die Temperatur zur Untersuchung des Einflusses des TMs auf Lipidmodellmembranen. Erhaltene Fluoreszenzspektroskopie-Ergebnisse für das Phasenverhalten einer (A) DPPC- und einer (B) DPPC/DOPE/Cholesterin- (2:1:1) Membran sowie (C) der Membran aus dem 5 KS mit und ohne Einlagerung von 10 mol% TM. Aufgetragen sind die erhaltenen GP -Werte gegen die Temperatur.

Oberhalb von T_m , in der fluiden (L_α) Phase, besitzen die Alkylketten eine hohe konformationelle Unordnung aufgrund der Ausbildung von *gauche* Konformeren und Kinken. Dadurch ist es Wassermolekülen möglich, zwischen die oberen Regionen der Doppelschicht zu diffundieren und somit die Fluorophorumgebung polarer zu gestalten. Daraus ergeben sich ein Anstieg der Fluoreszenzemissionswerte bei 490 nm und eine Abnahme der GP -Werte. Dabei kongruiert T_m mit der Literatur.^[1] Die Kurven des heterogenen 3 KS-T und 5 KS hingegen, weisen keinen scharfen Übergang auf, sondern besitzen einen breiten Übergangsbereich, da es in diesen Lipidmischungen einen großen Koexistenzbereich von l_o - und l_d -Domänen gibt. Ein Temperaturanstieg bewirkt dabei eine Zunahme der l_d -Domänen, die mit einer vermehrten Fluidität und konformationellen Unordnung einhergeht.^[62] Die Einlagerung des TM in diese drei Membransysteme weist nur kleine Unterschiede der Konformationsordnung und des Phasenverhaltens im Vergleich zu den reinen Membransystemen auf. In der Gelphase sind die GP -Werte etwas abgesenkt, was geringfügige Änderungen der Lipidpackungsdichte widerspiegelt. Die Phasenübergangstemperatur des DPPC ist dabei kaum beeinflusst und in der fluiden Phase zeigt das 5 KS eine kleine Zunahme der GP -Werte und somit des lateralen Ordnungsparameters nach TM-Einlagerung an.

3.7.4 AFM-Messungen

Zur weiteren Untersuchung des Domänenverhaltens des 5 KS mit inserierten TM wurden AFM Messungen vorgenommen. In Abbildung 3-81 sind die erhaltenen AFM-Aufnahmen für beide Systeme gezeigt. Abbildung 3-81A) zeigt die erhaltene Doppelschicht des reinen 5 KS auf der Mica-Oberfläche. Dabei ist eine deutliche Trennung zwischen den Domänen der l_o - und l_d - Phasen zu erkennen. Der Höhenunterschied zwischen beiden Domänen beträgt ca. 1,5 nm, was mit den Literaturwerten und den Ergebnisse aus den Kapiteln 3.4.3 und 3.6.8 korrespondieren.^[62,361,362] Durch den Einbau von 10 mol% TM in das Membransystem wird eine Verkleinerung der fluiden l_d -Domänen erkennbar. Des Weiteren verringert sich der Höhenunterschied zwischen beiden Domänen nur geringfügig auf 1,2 nm. Daraus lässt sich ableiten, dass der Einbau des TMs in die naturähnliche, 5 Komponenten-*raft*-Membran, im Gegensatz zu den erhaltenen Ergebnissen für die anderen beiden imidazoliumbasierten Lipidsalze, keine signifikanten Einflüsse auf die laterale Organisation der Membranstrukturen hat.

3.7 Untersuchung der Transfektionseigenschaften imidazoliumbasierter Lipide

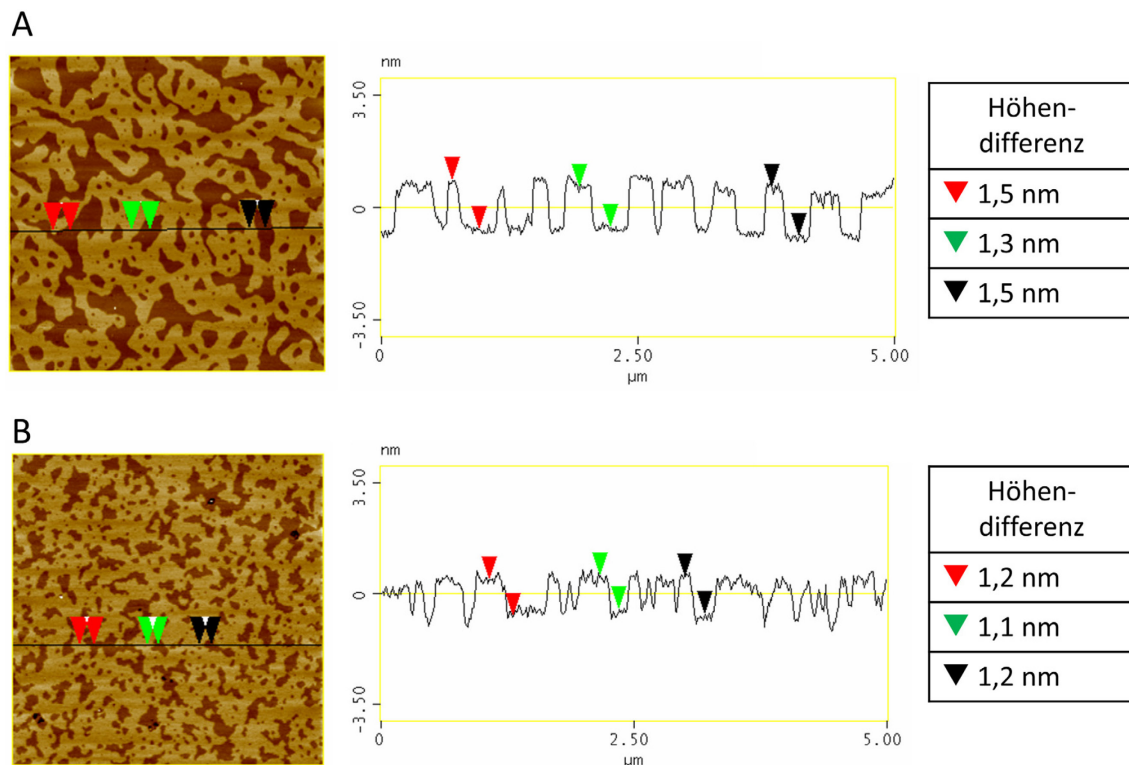


Abbildung 3-81: AFM-Aufnahmen des 5 KS mit und ohne TM. In (A) ist die reine 5 KS AFM-Aufnahme gezeigt, wohingegen (B) AFM-Aufnahmen des 5 KS + 10 mol% TM zeigt. Die abgebildete Fläche in beiden Abbildungen beträgt $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$.

3.7.5 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Auf Basis der zuvor erhaltenen Ergebnisse, welche eine stabile Einlagerung des TMs in die Doppelschichtsysteme, einhergehend mit lediglich geringen Veränderungen der Membranzintegrität, aufwiesen, wurden anschließend Fluoreszenzmikroskopie-Messungen durchgeführt, um den Einfluss des TMs auf die laterale Domänenstruktur und Morphologie der Vesikel auf μm -Größenskala sowie die Fähigkeit zur Induktion einer Vesikelfusion von GUVs verschiedener Kompositionen genauer zu untersuchen. Dazu wurde im ersten Schritt der Einfluss der Einlagerung des TMs in das 3 KS (DPPC/DOPC/Cholesterin; 2:1:1) temperaturabhängig untersucht.

Wie in Abbildung 3-82 zu sehen ist, liegen die Vesikel bis zu $50 \text{ }^\circ\text{C}$ in die l_o - und l_d -Phase separiert vor. Erst ab $75 \text{ }^\circ\text{C}$ ist keinerlei Phasenkoexistenz mehr zu beobachten. Dies steht in Übereinstimmung mit dem Phasenverhalten des reinen 3 KS, wie es in Abbildung 3-68 in Kapitel 3.6.7 beschrieben wurde.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.7 Untersuchung der Transfektionseigenschaften imidazoliumbasierter Lipide

Ein Unterschied zu dem reinen 3 KS ist das Auftreten von Vesikelaggregationen, die eine Wechselwirkung und Kopplung der Lipidgrenzflächen durch das eingelagerte TM anzeigen. Die Insertion des TMs in GUVs aus dem anionischen heterogenen 5 Komponenten-*raft*-System zeigt wesentlich deutlichere und ausgeprägtere Effekte (das thermotrope Phasenverhalten des reinen anionischen 5 KS ist in Abbildung 3-72 in Kapitel 3.6.7 erläutert).

DOPC/DPPC/Cholesterin/TM (5:8:5:2)

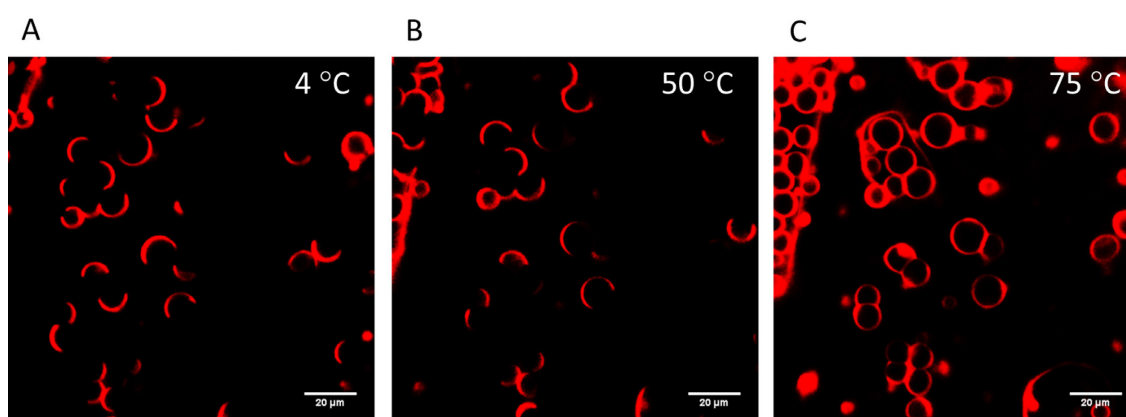


Abbildung 3-82: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von GUVs bestehend aus dem 3 KS mit TM bei 25, 50 und 75 °C. Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen zur Untersuchung des Einflusses von TM auf GUVs aus dem neutralen 3 KS bei 25 °C (A), 50 °C (B) und 75 °C (C). In den Abbildungen ist lediglich die l_d -Phase zu sehen, da der Fluorophor *N*-Rh-DHPE verwendet wurde. Die Skala entspricht 20 µm.

Wie in Abbildung 3-83 zu sehen ist, führt die Einlagerung des TM in das 5 KS zu einer starken Aggregation der GUVs und eine Phasenseparation, welche lediglich an der Interaktionsfläche der aggregierten Vesikeln zu erkennen ist, liegt bei Temperaturen unter 65 °C vor. Eine Temperaturerhöhung auf über 65 °C bewirkt den Übergang in die fluide l_d -Phase, ähnlich wie es für das reine 5 KS beobachtet wurde. Aufgrund der einheitlich auftretenden Aufteilung der l_o - und l_d -Phasen, wobei die l_o -Phase vor allem an den Interaktionsflächen der aggregierten Vesikel auszumachen ist, kann ein ordnender Effekt des TMs auf die Lipidmoleküle angenommen werden. Dabei kommt es zur Ausbildung von Bereichen mit hoher Konzentration anionischer Lipidmoleküle, die mit den durch das TM induzierten kationischen Bereichen der Nachbarvesikel interagieren. Eine schematische Darstellung dieser Lipidneuanordnung ist in der nachfolgenden Abbildung gezeigt.

3.7 Untersuchung der Transfektionseigenschaften imidazoliumbasierter Lipide

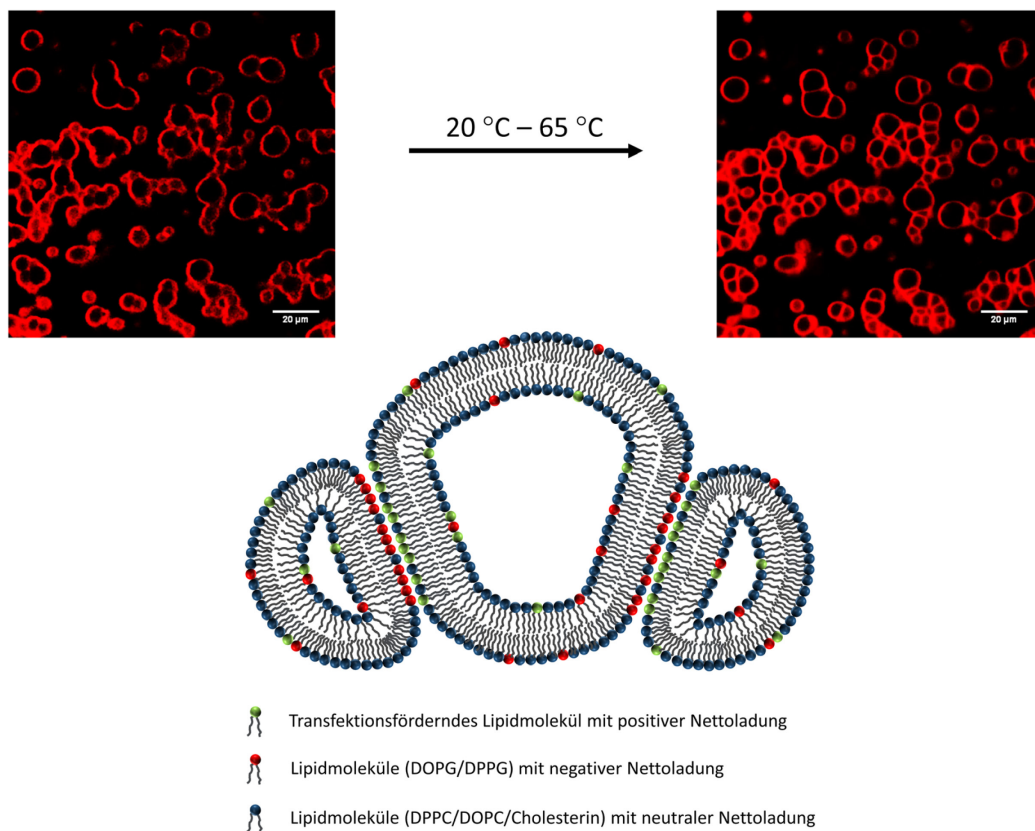


Abbildung 3-83: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von GUVs bestehend aus dem 5 KS mit TM bei 20 und 65 °C. Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen zur Untersuchung des Einflusses von TM auf GUVs aus dem anionischen 5 KS bei 20 °C und 65 °C (C). Eine klare Akkumulation der GUVs, durch Einbau des TMs, ist zu erkennen. Ferner ist ein ordnender Effekt des TMs auf die Lipidmoleküle zu erkennen, da die l_o -Phase nur noch an den Vesikelgrenzflächen auszumachen ist. Bei 65 °C findet der Übergang aus dem Phasenkoexistenzbereich der l_o - und l_d -Phase zur gesamt fluiden Membranphase statt. In den Abbildungen ist lediglich die l_d -Phase zu sehen, da der Fluorophor *N*-Rh-DHPE verwendet wurde. Die Skala entspricht 20 μm . Eine schematische Darstellung des vermuteten Mechanismus des ordnenden Einflusses der TM ist unterhalb der Mikroskopiebilder angefügt.

Aufgrund dieses Aggregationsverhaltens, induziert durch das TM, wurde ein mögliches Fusionspotenzial dieses kationischen Moleküls vermutet. Die Eigenschaften des TMs, eine Membranfusion einzuleiten, wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopie-basierten Assays genauer untersucht. Dazu wurde ein neues Membransystem bestehend aus DPPC/DOPE (1:1) (2 KS) als Trägermembransystem für das TM verwendet. Dieses nutzt die bereits nachgewiesenen förderlichen Eigenschaften des DOPE zur Bildung kationischer Lipoplexe und deren Fusion mit weiteren Vesikeln.^[368,381,382,386] Zur Unterscheidung von dem anionischen 5 KS, welches als Ziel dieser Vesikel diente, wurde für das 2 KS der grün

fluoreszierende Farbstoff NBD-DHPE, welcher die l_0 -Phase markiert, genutzt. Für das anionische 5 KS wurde wieder das rot fluoreszierende *N*-Rh-DHPE eingesetzt. Die GUVs beider Systeme wurden mittels Elektroformation und PVA-unterstützter Vesikelbildung hergestellt. Für die nachfolgend beschriebenen Effekte war es dabei unerheblich, welches der beiden GUV-Systeme mit Elektroformation oder PVA-unterstützter Bildung präpariert worden ist, da die Ergebnisse sich nicht unterschieden. Um Aussagen bezüglich der Qualität der Vesikelfusion treffen zu können, wurde der Pufferlösung entweder während der Vesikelpräparation mittels Elektroformation oder während der Injektion, der auf PVA gebildeten GUVs, der „blaue“ Fluorophor ATTO 647 beigemischt. Somit können durch ein Austreten bzw. Eindringen des ATTO 647 Rückschlüsse auf etwaige Porenbildung oder *Leakage*-Effekte gezogen werden. Die Ergebnisse dieser Fusionsexperimente sind in Abbildung 3-84 dargestellt. In Reihe (A) dieser Abbildung sind die Mikroskopieaufnahmen des Fusionsexperimentes der DOPE/DPPC (1:1)-GUVs (grün) und der GUVs aus dem 5 KS bestehend (rot) gezeigt. Hierbei wurde noch kein TM zugesetzt. Die GUVs des Trägersystems wurden mittels Elektroformation gebildet und sind daher auf der Coverslip-Oberfläche immobilisiert. Die anionischen 5 KS-GUVs hingegen wurden auf PVA präpariert und in die Mikroskopiezelle zu den DOPE/DPPC-GUVs zusammen mit dem Farbstoff ATTO 647 injiziert. Dabei konnten keinerlei Wechselwirkungen oder Aggregationen zwischen beiden Vesikelarten festgestellt werden. Auch ein Eindringen des Farbstoffs in die Vesikel wurde nicht beobachtet. Auch nach 3 Stunden Inkubationszeit wurden keine Vorgänge beobachtet, die Rückschlüsse auf eine stattfindende Fusion, Lipidaustauschprozesse oder Aggregation zuließen.

Dieselben Resultate wurden auch für invers hergestellte Vesikel (5 KS mittels Elektroformation und DOPE/DPPC-GUVs mittels PVA-unterstützter Präparation) erhalten. In Zeile (B) wurden beide Vesikelarten wie in (A) beschrieben hergestellt, jedoch wurde dem Trägersystem 10 mol% TM beigemischt. In der letzten Spalte, der Überlagerung aller Kanäle, kann eine eindeutige Koexistenz beider Fluorophore innerhalb der Vesikelmembran festgestellt werden.

3.7 Untersuchung der Transfektionseigenschaften imidazoliumbasierter Lipide

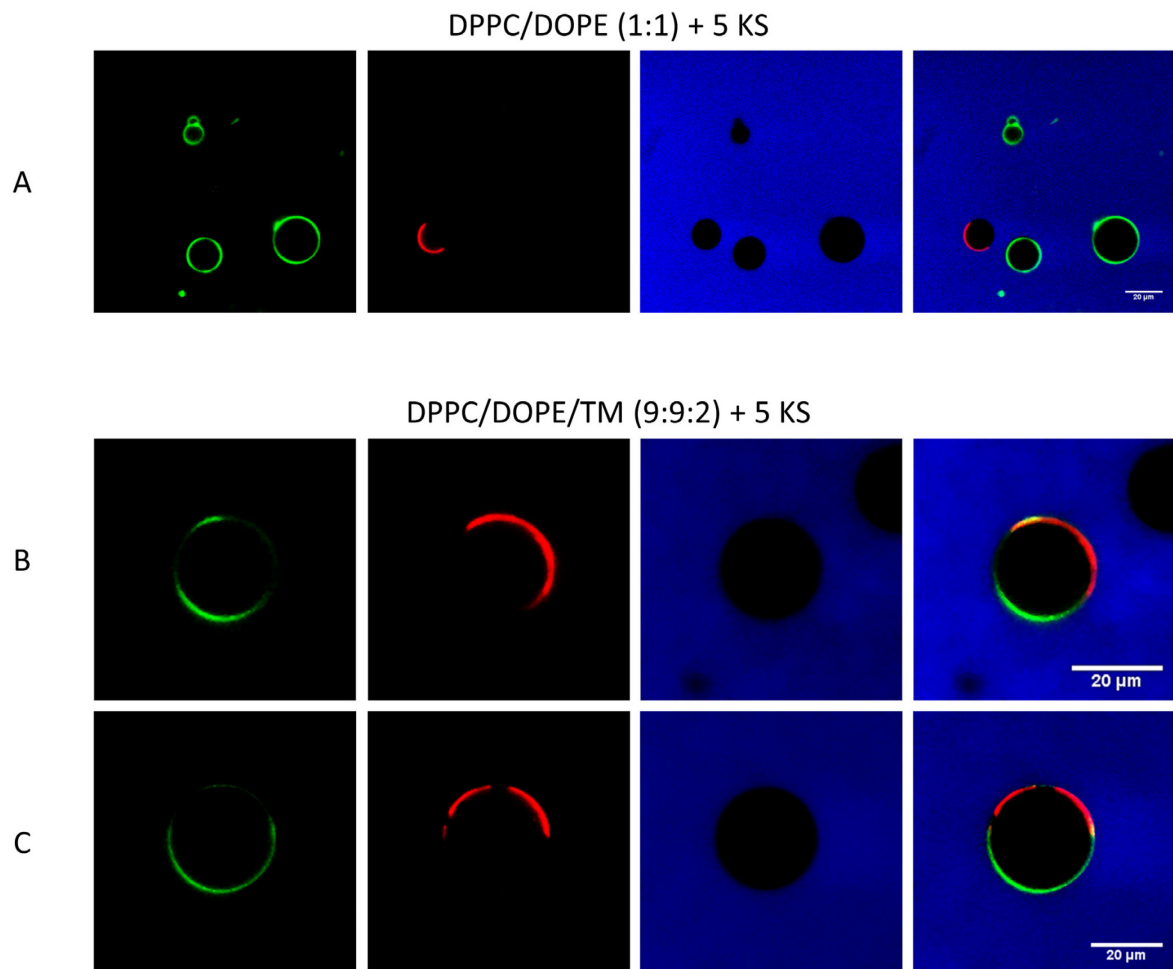


Abbildung 3-84: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen zum Fusionsverhalten des TM. Repräsentative konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Querschnittsaufnahmen der TM-Vesikelfusionsexperimente. Die erste Spalte zeigt die mit NBD-DHPE markierten l_o -Domänen der GUVs, die zweite Spalte N -Rh-DHPE-markierte l_d -Domänen, die dritte Spalte zeigt den mit ATTO 647 markierten Puffer, der nach der Herstellung hinzugefügt wurde, und die letzte Spalte das übereinandergelegte Bild der drei einzelnen Kanäle. Die grünen Vesikel in (A) zeigen GUVs, die aus dem DPPC/DOPE (1:1) Gemisch ohne TM gebildet wurden und in diesem Experiment immobilisiert sind. Die roten Vesikel wurden aus dem anionischen heterogenen 5 Komponenten *raft*-System gebildet, das der Bulklösung zugesetzt wurde. In Reihe (B) ist das DPPC/DOPE-System mit zugesetzten 10 mol% TM grün fluoreszierend dargestellt. Dieses System wurde ebenfalls immobilisiert. Die roten Vesikel zeigen die anionische 5 KS-Mischung, die zugesetzt wurde. In (C) sind die fluoreszierenden Marker die gleichen wie in (B), aber beide Vesikelarten wurden auf PVA präpariert und miteinander, frei in Lösung beweglich, gemischt. Der Maßstab der Bilder beträgt 20 μm .

3 Ergebnisse und Diskussion

3.7 Untersuchung der Transfektionseigenschaften imidazoliumbasierter Lipide

Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine stattgefundene Fusion beider Vesikelarten. Auch eine klare l_o - und l_d -Phasenkoexistenz bei Raumtemperatur kann beobachtet werden. Jedoch ist keine blaue Fluoreszenz des ATTO 647 innerhalb des Vesikels festzustellen, womit *Leakage*-Effekte oder Porenbildungen ausgeschlossen werden können. In der dritten Reihe (C) wurden die gleichen Vesikelzusammensetzungen wie in (B) benutzt, jedoch liegen hier beide Vesikelarten frei in Lösung vor, da beide GUV-Typen mittels PVA-unterstützter Präparation gebildet worden sind. Im letzten Bild der Reihe ist eine deutliche Fusion zu erkennen, die auch hier wieder ohne Eintritt des ATTO 647 stattfand. Somit konnte eine effektive Induktion der Vesikelfusion bei geringer Störung der Membranorganisation für das neu entworfene Imidazoliumsalz festgestellt werden und erlaubt somit eine mögliche Anwendung als Additiv zur Transfektion.

Zur Verifikation der Relevanz der Molekülstruktur des TM und insbesondere der zweiten positiven Ladung an dem Anker an der 2'-Position des Imidazoliumringes, wurden äquivalent zu dem oben beschriebenen Fusionsexperiment, Untersuchungen mit dem in der Literatur gut charakterisierten 1,3-dimethyl-4,5-dipentadecylimidazoliumiodid ($C_{15}IMe$), durchgeführt.^[50,346,347] Dieses weist im Vergleich zum TM dieselbe Molekülstruktur auf, nur fehlt der Anker mit der zweiten positiven Ladung an der 2'-Position des Imidazoliumringes. Die Struktur dieses Moleküls sowie die erhaltenen Ergebnisse dieses neuen Fusionsexperimentes sind in Abbildung 3-85 dargestellt. Auch hier zeigte sich nach kurzer Inkubationszeit der separat hergestellten Vesikelsysteme eine Durchmischung beider Fluorophore in den Vesikeln. Dies ist ein Beleg für eine erfolgreiche Fusion beider Vesikeltypen. Daraus kann ein generelles Fusionspotenzial der Imidazoliumsalze, bei entsprechender Kettenlänge und Ladung, abgeleitet werden. Die zusätzliche positive Ladung des TM ist daher nicht zwingend zur Einleitung einer Fusion notwendig, da die nötige Ladungsdichte durch die Zusammenlagerung in Clustern, wie auch für das monovalente $C_{11}IMe$ und $C_{11}IPr$ gezeigt, erreicht werden kann. Die zweite positive Ladung des TM kann jedoch zur Bindung anderer Moleküle oder DNA genutzt werden, um diese erfolgreich in Zellen einzubringen.

3.7 Untersuchung der Transfektionseigenschaften imidazoliumbasierter Lipide

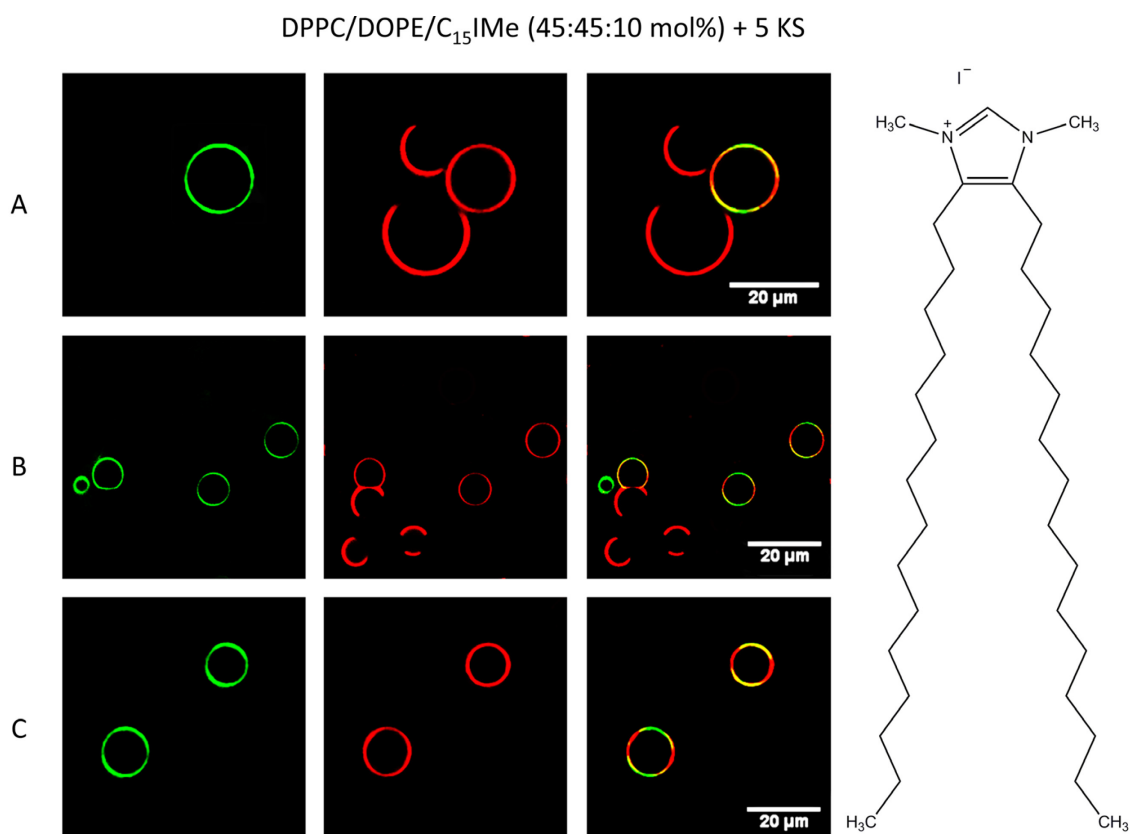


Abbildung 3-85: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen zum Fusionsverhalten des C₁₅IMe. Repräsentative konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Querschnittsaufnahmen der C₁₅IMe-Vesikelfusionsexperimente. Die erste Spalte zeigt die mit NBD-DHPE markierten I_o-Domänen der GUVs, die zweite Spalte N-Rh-DHPE-markierte I_d-Domänen und die dritte Spalte das übereinandergelegte Bild der beiden einzelnen Kanäle. Die grünen Vesikel in (A) zeigen GUVs, die aus dem DPPC/DOPE/ C₁₅IMe- (9:9:2) Gemisch gebildet wurden und die roten Vesikel wurden aus dem anionischen heterogenen *raft* 5 KS gebildet. (A), (B) und (C) zeigen lediglich die Fusionsergebnisse verschiedener Proben. Der Maßstab der Bilder beträgt 20 µm.

3.7.6 Zusammenfassung

Das neu entworfene C₁₅-kettige Imidazoliumsalz TM wies im Vergleich zu den kurzkettigeren C₁₁IMe und C₁₁IPr im neutralen heterogenen 3 KS sowie im anionischen fünf-Komponenten-*raft*-System keine wesentlichen Einflüsse auf die laterale Organisation der Lipiddoppelschichten und keinerlei Störungen der Membran auf. Die Einlagerung in die Doppelschicht erfolgte stabil und ohne weitere Störungen. Im anionischen 5 KS induzierte es eine starke Aggregation der negativ geladenen Vesikel, die aus einem Lipid-sortierenden Effekt der anionisch geladenen Lipidmoleküle resultierte und die Anordnung und Interaktion mit den gegenteilig geladenen TM an der Vesikelgrenzfläche bewirkte. Mittels Fluo-

3 Ergebnisse und Diskussion

3.7 Untersuchung der Transfektionseigenschaften imidazoliumbasierter Lipide

reszenzmikroskopie-basiertem Assay war es möglich, das Potenzial des TM, eine Vesikelfusion einzuleiten, zu bestimmen. Hier zeigten sich effiziente Vesikelfusionseigenschaften, wodurch das TM als ein mögliches Molekül zur Transfektion in Betracht gezogen werden kann. In einer nachfolgenden Studie zur Untersuchung des Transfektionspotenzials des TMs an lebendigen Zellen durch die Arbeitsgruppe Prof. Dr. GERKE (Institut für medizinische Biochemie WWU Münster) konnten auch fusionsfördernde Eigenschaften dieses Moleküls nachgewiesen werden. Diese lagen allerdings unter dem als Standard eingesetzten Lipofectamin 2000TM.

In allen Untersuchungen wies das strukturell ähnliche, jedoch ohne zweite positive Ladung versehene C₁₅Ime ebenso wie das TM Fusionspotenzial auf, wodurch auf allgemeine Fusionsseigenschaften der imidazoliumbasierten Lipidmoleküle geschlossen werden kann. Eine nachfolgende, zelluläre Studie an HeLa-Zellen (menschlichen Epithelzellen) zeigte jedoch, dass für eine erfolgreiche Transfektion die zweite positive Ladung an der Kopfgruppe essentiell ist. Aufgrund der großen Variabilität dieser Klasse von Molekülen sowie relativ einfachen Synthese und leicht vorzunehmenden Strukturveränderungen können durch weiterführende Studien Strukturoptimierungen hinsichtlich der Fusions- und Transfektionspotenziale dieser Moleküle vorgenommen werden und so effiziente und neuartige fusionsinduzierende Moleküle entworfen werden, die es ermöglichen, gezielt bestimmte Wirkstoffe in ausgewählte Zellen einzubringen, ohne den Organismus zu schädigen.

3.7 Untersuchung der Transfektionseigenschaften imidazoliumbasierter Lipide

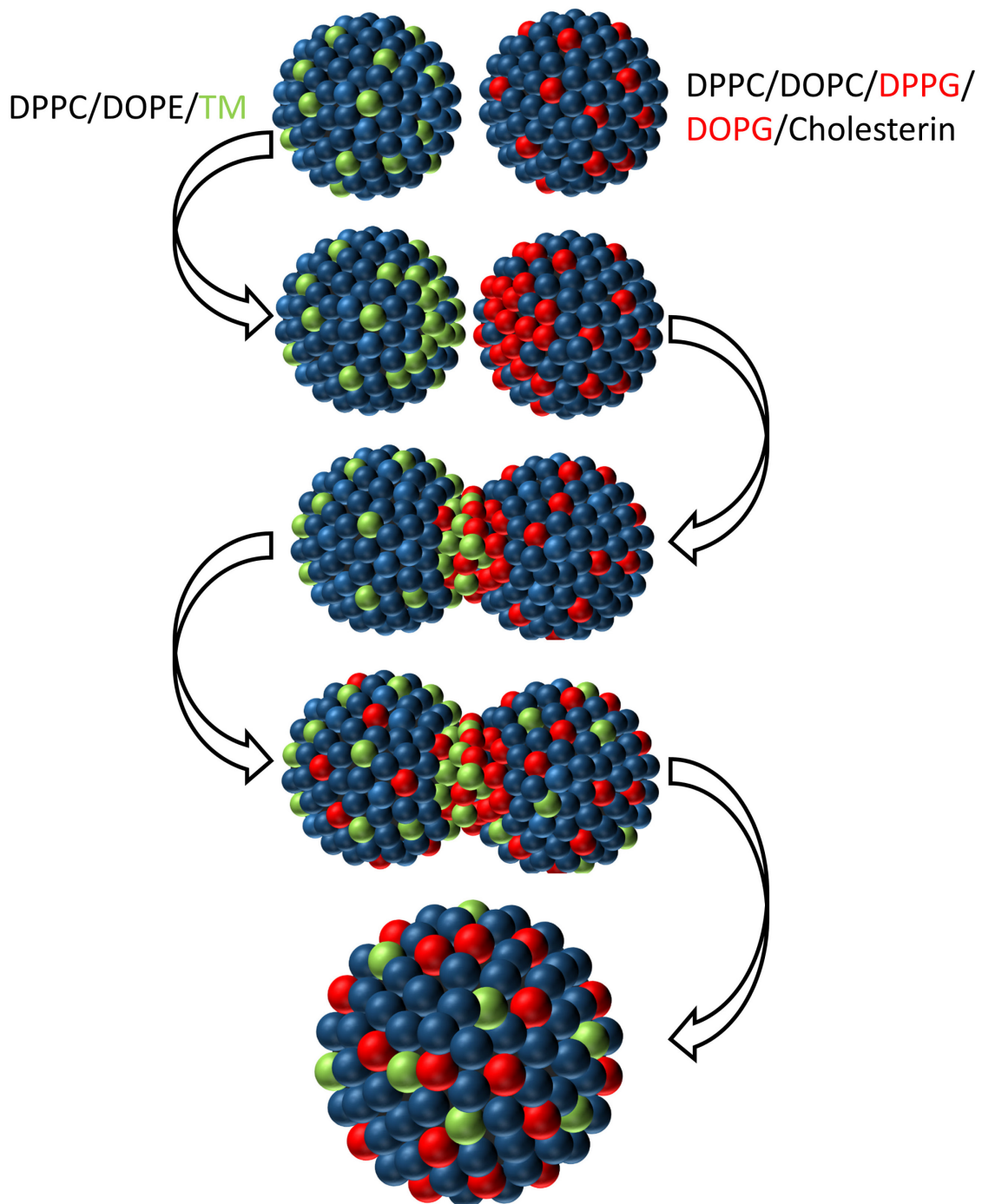


Abbildung 3-86: Schematische Darstellung des vermuteten Fusionsprozesses induziert durch TM. Schematische Illustration des vermuteten Fusionsprozesses, der durch TM sowie andere Imidazoliumsalze induziert wird. Dabei kommt es nach einer Annäherung der beiden gegensätzlich geladenen Vesikelarten zu einem Lipidmolekül sortierenden Effekt und in den nächsten Schritten zur Anlagerung, dem Austausch von Lipidmolekülen zwischen den Vesikeln und final zur Verschmelzung der beiden GUVs zu einem größeren GUV mit sowohl anionischen als auch kationischen Lipidmolekülen in der Membran.

4. Fazit und Ausblick

Plasmamembranen ermöglichen erst, dass viele Lebensprozesse stattfinden können und sind somit für das Leben unerlässlich. Durch Membranen grenzen sich Zellen und verschiedene Zellorganelle von ihrer Umgebung ab und erlangen so ihre Individualität.^[1] Durch ihre selektive Permeabilität kontrollieren und erhalten Zellmembranen die interzelluläre Zusammensetzung aufrecht.^[387] Durch Veränderung der Lipidkomposition der Zellmembran ist es Organismen möglich, sich an verschiedene Umgebungsbedingungen anzupassen, wodurch das Leben bis in die entferntesten Bereiche der Erde vordringen konnte.^[388,389] Diese Anpassung geschieht jedoch nicht nur durch Variation der Membranzusammensetzung, sondern auch durch externe Moleküle, Osmolyte, Cosolventien und weitere Verbindungen. In dieser Arbeit wurden einige Moleküle und insbesondere ihr Einfluss auf Lipidmembranen verschiedener Komplexität untersucht, Theorien der Interaktion aufgestellt und Anwendungsmöglichkeiten erörtert. Nachfolgend sollen die Ergebnisse dieser Projekte noch einmal kurz zusammengefasst werden:

I. HOCHDRUCKFLUORESZENZMIKROSKOPIE

Zur Etablierung der Hochdruckfluoreszenzmikroskopie ist es von Vorteil, das barotrope Phasenverhalten verschiedener Modellsysteme bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht und katalogisiert zu haben. Dies erleichtert die Bewertung des Einflusses weiterer variierender Bedingungen, wie z.B. der Zugabe von Osmolyten, bei späteren Untersuchungen, da zum einen die Referenzmessungen schon durchgeführt worden sind und zum anderen auch die optimalen Untersuchungsbedingungen ausgesucht werden können und nicht langwierig erarbeitet werden müssen. Dazu wurden hier die ersten Messungen mit einer heterogenen, anionischen fünf Komponenten *raft*-Membran vorgenommen.

- Bei den hier gewählten Starttemperaturen konnte festgestellt werden, dass das gewählte Membransystem sich schon im Übergangsbereich von der ungeordneten (l_d -) zur geordneten (l_o -) Phase befand. Die Größe der nicht markierten l_o -Domänen lag teilweise unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops und der verwendeten CCD-Kamera. Durch steigenden Druck wurde

3.7 Untersuchung der Transfektionseigenschaften imidazoliumbasierter Lipide

der Anteil an geordneten Domänen innerhalb der untersuchten Vesikel größer. Dies resultiert aus der Membrankomprimierung und der damit einhergehenden Abnahme der Membranfläche pro Molekül, wodurch die Alkylketten eine *all-trans*-Konformation einnehmen.

- Weitere Untersuchungen mit verschiedenen Membransystemen und bei unterschiedlichen Temperaturen sind hier noch vonnöten.

II. UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VERSCHIEDENER GLYKANSYSTEME AUF DAS BAROTROPE UND THERMOTROPE PHASENVERHALTEN SOWIE DIE PHASENORGANISATION VERSCHIEDENER MODELLMEMBRANEN

Zur Untersuchung des Einflusses von Glykanen auf Lipidmodellmembranen wurde zum einen der Effekt eines immobilisierten Dextran-Netzwerkes auf die Lipidseparation innerhalb des aufliegenden zweidimensionalen Lipidfilms genauer betrachtet. Des Weiteren wurde in einer fortführenden Studie der Einfluss von Hyaluronsäure sowie, in einem neuen Projekt, eines Dextran/PEG-ATPS im Umgebungsmedium auf Lipidmembranen untersucht. Letztgenanntes Projekt soll zu einem späteren Zeitpunkt unter Hochdruckeinfluss fortgeführt werden.

- Die Untersuchungen des Einflusses der Hyaluronsäure auf DPPC-MLVs ergaben, dass dieser durch die Verwendung von HA mit geringem Molekulargewicht in salzreicher Umgebung gesteigert werden kann. Dabei war ein leicht ordnender Effekt in der fluiden Lipidphase zu beobachten, welcher jedoch für direkte Wechselwirkungen zu schwach ausfiel. Aus diesem Grund wird ein auf synergistischen und entropiebasierten Effekten der verschiedenen Bestandteile der Synovialflüssigkeit beruhender Wirkmechanismus der Hyaluronsäure postuliert.
- Die Untersuchung des Einflusses eines Glykan-Netzwerkes auf die Phasenseparation einer komplexen heterogenen *raft*-Modellmembranmischung zeigte eine deutliche Auswirkung auf das Phasenseparationsverhalten dieses Lipidsystems. Eine Separation der l_0 - und l_a -Domänen je nach Homogenität bzw. Inhomogenität der Dextranschicht konnte hierbei beobachtet werden.

Die l_o -Phase wies im Gegensatz zur l_d -Phase eine deutlich ausgeprägtere Affinität in Bereichen inhomogener Dextranverteilung zum Glykan-Netzwerk auf. In homogenen beschichteten Bereichen hingegen war auch eine homogene Verteilung beider Lipidphasen zu beobachten. Dies liefert Rückschlüsse auf das Verhalten natürlicher Membranen, die in Kontakt mit homogenen bzw. inhomogenen Glykan-Netzwerken stehen. Zellen in Kontakt mit homogenen Glykan-Netzwerken können aktuell nicht aufzulösende Domänen ausbilden, wohingegen durch inhomogene Glykan-Netzwerke *raft*-Strukturen stabilisiert werden könnten.

- Mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen konnte ein erfolgreicher Einbau des PEG/Dextran-ATPS in heterogene anionische fünf Komponenten *raft*-Vesikel gezeigt werden. Die Entmischung der beiden Phasen innerhalb der Vesikel zeigte eine deutliche Tendenz des Dextrans zur Innenseite der vesikulären Membran, welche vor allem in Dextran-reicher extrazellulärer Umgebung Ausstülpungen der ungeordneten l_d -Domänen bewirkten. Durch die Ausbildung dieser Ausstülpungen kann die flüssig-flüssig Grenzfläche zwischen den beiden ATPS-Komponenten innerhalb des Vesikels drastisch reduziert werden und ein energetisch günstigeres quasi-sphärisches Vesikel gebildet werden.

III. EINFLUSS VERSCHIEDENER OSMOLYTE AUF LIPIDMODELLMEMBRANEN

Osmolyte bzw. Extremolyte erlauben es Organismen, unter extremen Bedingungen, wie drastischen Temperaturveränderungen oder hohen Salzkonzentrationen, zu überleben. Aufgrund ihrer biologischen Inertheit können sich diese Stoffe in hohen Konzentrationen im Zytoplasma akkumulieren, ohne die zellulären Funktionen zu beeinflussen. Die Wirkung dieser Osmolyte ist bisher gut charakterisiert, aber der zugrundeliegende Wirkmechanismus wurde bisher vor allem für Lipidmembranen unzureichend analysiert. Aus diesem Grund sollten hier die Wirkungen der Osmolyte Ectoin, Hydroxyectoin und β -Hydroxybutyrat durchleuchtet werden.

- In der Literatur wurde bisher ein fluidisierender Effekt von Ectoin und Hydroxyectoin auf Lipidmonoschichten beschrieben. Daher wurden hier DPPC-

3.7 Untersuchung der Transfektionseigenschaften imidazoliumbasierter Lipide

Doppelschichten mittels kalorimetrischer und spektroskopischer Methoden untersucht.

- Dabei wurde ein stabilisierender Effekt der drei Osmolyte auf die geordnete Gelphase in unterschiedlichen Stärken festgestellt. Da sich die laterale Ordnung der DPPC-MLVs durch die Osmolyte nicht veränderte, konnte eine Einlagerung der drei Substanzen ausgeschlossen werden. Die stabilisierende Wirkung von Ectoin und Hydroxyectoin auf Zellen und Zellsysteme gegen verschiedene Stressfaktoren konnte somit hier gezeigt werden.
- Als grundlegende Mechanismen wurden daher eine Änderung der Hydratationseigenschaften an den Grenzflächen der Lipidphasen sowie Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen der Kopfgruppenregionen angenommen.

IV. EINFLUSS DES MONORHAMNOLIPIDS RHAC₁₀C₁₀ AUF VERSCHIEDENE LIPIDMODELLMEMBRANEN

&

V. VERGLEICHENDE STUDIE DES EINFLUSSES DER ANZAHL VON RHAMNOSE-EINHEITEN VON RHAMNOLIPIDEN AUF LIPIDMODELLMEMBRANEN UNTERSCHIEDLICHER KOMPLEXITÄT

Rhamnolipide gehören zur Gruppe der oberflächenaktiven Glykolipide und bestehen aus einem Glykon-Anteil, der sich aus einer oder zwei Rhamnose-Einheiten zusammensetzt, und einem Aglykon-Anteil, der sich aus ein bis drei Alkylketten bildet, die über eine α -1,2-glykosidische Bindung verbunden sind. Zugehörig zur Klasse der Biotenside bilden sie einen möglichen „grünen“ Ersatz für chemische Tenside. Ihr großer Vorteil gegenüber chemischen Tensiden ist die Herstellung durch erneuerbare Ressourcen. Hauptbezugsquelle von Rhamnolipiden sind vor allem die Klasse der Beta- und Gammaproteobacteria. Die Bedeutung von Rhamnolipiden für das Leben des produzierenden Organismus konnte nicht vollends aufgeklärt werden und wurde lediglich auf theoretischem Wege von den physiko-chemischen Eigenschaften dieser Moleküle abgeleitet. Trotz einiger bisher beschriebener Erkenntnisse über Rhamnolipide ist ein tieferes Verständnis des zugrunde liegenden Mechanismus der Wechselwirkung zwischen Rhamnolipiden und Zellmembranen

für die weitere Entwicklung und Forschung erforderlich. Dazu ist es unabdingbar, die Wechselwirkungen von Monorhamnolipiden, Dirhamnolipiden sowie ihrer Synthesevorstufen auf Modellbiomembranen unterschiedlicher Zusammensetzung zu untersuchen, um so weitere Aussagen zu ihrer Funktion und Wirkung treffen zu können. Eine Neuerung in dieser Arbeit ist zum einen, dass zum ersten Mal in einer Studie der Einfluss der Anzahl der Rhamnose-Einheiten an der Kopfgruppe durch parallel durchgeführte Experimente direkt gegenübergestellt wird und so ein direkter Vergleich möglich ist, als auch die Untersuchung und Charakterisierung des Einflusses der Rhamnolipidvorstufe 3-(3-Hydroxydecanoyloxy)decanoat (HAA) auf Modellmembranen, mit der bislang noch keinerlei biophysikalische Untersuchungen mit Modellmembranen durchgeführt worden sind.

- Wie auch in der Literatur beschrieben, konnten in den hier durchgeführten Studien für Mono- und Dirhamnolipide sowie das bisher noch nicht charakterisierte HAA ähnliche Auswirkungen auf Phospholipiddoppelschichten identifiziert werden. Durch eine Störung der Alkylketten wird die Kooperativität des Phasenüberganges reduziert und mit zunehmender Anzahl an Hydroxylgruppen die Kopfgruppenhydratation erhöht.
- Der Einbau aller drei Rhamnolipide in Phospholipidmembranen bewirkte eine deutliche Änderung des Phasenverhaltens, der lateralen Lipidordnung und der Morphologie der zugehörigen Vesikel, wobei der thermotrope Phasenübergang von der Gel- in die fluide Phase noch vorhanden und lediglich zu niedrigeren Temperaturen verschoben war.
- Die Aufnahme aller drei Moleküle in Phospholipidmembranen hatte signifikante Auswirkungen auf deren Phasenverhalten, ihre laterale Ordnung und Morphologie. Unterschiede zwischen den drei untersuchten Molekülen waren erst bei höheren Konzentrationen festzustellen, wobei alle Moleküle eine „Abknospung“ von Membrandomänen bewirkten und strukturelle Veränderungen der geordneten und ungeordneten Domänen nach sich zogen. Das HAA und Dirhamnolipid wiesen vor allem eine verstärkte Ausbildung von geordneten Membranbereichen auf, wohingegen das Monorhamnolipid eher ungeordnete Membrandomänen förderte. Die Verkleinerung und ein nahezu

3.7 Untersuchung der Transfektionseigenschaften imidazoliumbasierter Lipide

vollständiges Verschwinden der l_d -Domänen wurde auch für hohe Konzentrationen an Cholesterin in Lipidmembranen beschrieben. Somit könnten die hier beobachteten Effekte aus einer kooperativen Wirkung des HAAs und Cholesterins resultieren.

- Weiterführende interdisziplinäre Untersuchungen der Wechselwirkungen von Rhamnolipiden mit Biomembranen können für viele weitere beobachtete Effekte der Rhamnolipide Erklärungen liefern und durch Verständnis der gesamten Struktur-Funktions-Beziehung diese Moleküle für eine Vielzahl neuer Anwendungsbereiche zur Verfügung stellen.

VI. EINFLUSS VON IMIDAZOLIUMBASIERTEN LIPIDEN AUF VERSCHIEDENE LIPIDMODELLMEMBRANEN

Dieses Projekt hatte die Charakterisierung des Einflusses eines neuartigen imidazoliumbasierten Lipidsalzes auf Lipidmodellmembranen zum Ziel. Dabei wurden die Auswirkungen dieses Salzes auf Membranmodelle untersucht, die sich hinsichtlich ihrer Ladung und Komplexität signifikant unterschieden. Im Fokus standen die Untersuchungen der Einbaueffizienz in Modellmembranen sowie anschließend die ausführliche Charakterisierung des Einflusses auf das thermotrope Phasenverhalten, die Phasenseparation, die laterale Ordnung und die Morphologie von Membranen.

- In neutralen und anionischen Modellmembranen zeigten die beiden hier untersuchten Moleküle, die sich in der Größe ihrer Kopfgruppe signifikant unterschieden, eine Verringerung der Phasenübergangstemperatur. Dabei wies das Molekül mit der sterisch anspruchsvolleren Kopfgruppe, $C_{11}IPr$, in neutralen Membransystemen den ausgeprägteren Effekt auf. Der Phasenübergang wurde von beiden Molekülen schon in geringen Konzentrationen unterdrückt. Dies weist auf eine deutliche Störung der Lipidpackung hin. Auch die laterale Ordnung der Membranen wurde sowohl in der Gel- als auch fluiden Phase gestört und war für das Molekül mit der kleineren Kopfgruppe, $C_{11}IMe$, prägnanter. $C_{11}IPr$ zeigte vor allem einen ordnenden Effekt in der fluiden Phase, was auf eine Clusterbildung der synthetischen Lipide innerhalb der Membran zurückgeführt werden kann.

- Die Einbaueffizienz war, wie zu erwarten, für das Molekül mit der kleineren Kopfgruppe deutlich besser. Für das C₁₁IPr ließ sich die Bildung von mizellaren und aggregierten Strukturen beobachten, die auf eine geringere Einbaueffizienz schließen lassen. In anionischen Membransystemen besaß das C₁₁IME eine Einbaueffizienz ähnlich der in neutralen Membransystemen, wohingegen das C₁₁IPr zur Aggregation neigte.
- Der Einbau beider Moleküle hatte einen großen Einfluss auf die Morphologie der untersuchten Vesikel. In sowohl neutralen als auch anionischen Membransystemen bewirkte das C₁₁IME die Ausbildung elliptischer Vesikelformen. Der größere Einfluss war auch hier für das C₁₁IPr zu beobachten, welches die Vesikel drastisch verformte und vergrößerte. Daneben kam es zur Ausbildung von Aggregaten oder mizellarer bzw. gemischt-mizellarer Strukturen. Auch die Untersuchung des Einflusses beider Imidazoliumsalze mittels AFM zeigte einen deutlich clusterbildenden sowie aggregierenden Effekt des C₁₁IPr's in neutralen Membransystemen und einen destabilisierenden Einfluss in anionischen Lipidsystemen.

VII. UNTERSUCHUNG DER TRANSFEKTIONSEIGENSCHAFTEN IMIDAZOLIUMBASIERTER LIPIDE

Ein weiteres neuartiges zweifach imidazoliumbasiertes Lipidsalz mit zusätzlicher positiver Ladung wurde in diesem Teil der Arbeit genauer untersucht. Neben grundlegenden Untersuchungen zur Einbaueffizienz und Auswirkungen auf die Membraneigenschaften stand hier vor allem eine mögliche Anwendung in Transfektionsprozessen im Vordergrund. Dabei wurde das Potenzial dieses Moleküls zur Induktion von Transfektion und Membranfusion genauer untersucht und mit dem eines strukturell sehr ähnlich aber nur einfach positiv geladenen imidazoliumbasierten Lipid verglichen.

- Im Gegensatz zu den in Projekt VI beschriebenen imidazoliumbasierten Salzen, zeigte das TM keinen signifikanten Effekt auf die laterale Ordnung sowie die Phasenübergangstemperatur in neutralen und anionischen Modellmembranen.

3.7 Untersuchung der Transfektionseigenschaften imidazoliumbasierter Lipide

- Auffällig für dieses Molekül bei Einbau in das anionischen 5 KS war jedoch die zunehmende Anzahl an aggregierten GUVs. Dies kann auf einen sortierenden Effekt der Lipidmoleküle innerhalb der Membran an den Kontaktflächen verschiedener Vesikel zurückzuführen sein.
- Nach Einbau dieses Moleküls in Trägervesikel, bestehend aus DPPC/DOPE, wiesen diese GUVs ein deutliches Fusionspotenzial mit Vesikeln aus dem anionischen fünf Komponenten *raft*-System aufgebaut auf. Durch einen Vergleich der Fusionsinduktion mit dem strukturell ähnlichen, jedoch monovalenten C₁₅IMe, konnte gezeigt werden, dass die zweite positive Ladung des TMs für die Fusion unerheblich ist und die Klasse der imidazoliumbasierten Lipide ein generelles Fusionspotenzial besitzt.

5. Anhang

5.1 Literaturverzeichnis

- [1] R. Winter, F. Noll, C. Czeslik, *Methoden Der Biophysikalischen Chemie*, Viegweg+Teuber, Wiesbaden, **2011**.
- [2] E. Sackmann, *Biomembranen: physikalische Prinzipien der Selbstorganisation und Funktion als integrierte Systeme zur Signalerkennung, -verstärkung und -übertragung auf molekularer Ebene*, Westdt. Verl, Opladen, **1988**.
- [3] W. Dowhan, *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 199–232.
- [4] G. L. Nicolson, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2014**, *1838*, 1451–1466.
- [5] E. Sackmann, R. Lipowsky, in *Struct. Dyn. Membr. - Cells Vesicles Handb. Biol. Phys.*, Elsevier North Holland, **1995**, 1–63.
- [6] G. van Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 112–124.
- [7] A. H. Merrill, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6387–6422.
- [8] Ü. Coskun, K. Simons, *Structure* **2011**, *19*, 1543–1548.
- [9] M. Sinensky, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1974**, *71*, 522–525.
- [10] C. Tanford, *Science* **1978**, *200*, 1012–1018.
- [11] P. R. Cullis, B. De Kruijff, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* **1979**, *559*, 399–420.
- [12] J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, B. W. Ninham, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1976**, *72*, 1525.
- [13] J. M. Seddon, R. H. Templer, in *Struct. Dyn. Membr. - Cells Vesicles Handb. Biol. Phys.*, Elsevier North Holland, **1995**, 97–160.
- [14] G. van Meer, A. I. P. M. de Kroon, *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 5–8.
- [15] H. Stein, S. Spindler, N. Bonakdar, C. Wang, V. Sandoghdar, *Front. Physiol.* **2017**, *8*.
- [16] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2002**.
- [17] N. Erwin, *Biophysikalische Einblicke in Die Wechselwirkungen von Lipidierten Signalproteinen Mit Membranen Und Regulatorproteinen*, TU Dortmund, **2018**.
- [18] R. Winter, D. Lopes, S. Grudzielanek, K. Voggt, *J. Non-Equilib. Thermodyn.* **2007**, *32*, 41–97.
- [19] M. B. Sankaram, T. E. Thompson, *Biochemistry* **1990**, *29*, 10676–10684.
- [20] J. Hjort Ipsen, G. Karlström, O. G. Mouritsen, H. Wennerström, M. J. Zuckermann, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1987**, *905*, 162–172.
- [21] J. A. F. Op den Kamp, *Annu. Rev. Biochem.* **1979**, *48*, 47–71.
- [22] A. Kusumi, Y. Sako, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, *8*, 566–574.
- [23] J. N. Israelachvili, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1977**, *469*, 221–225.
- [24] O. G. Mouritsen, M. Bloom, *Biophys. J.* **1984**, *46*, 141–153.
- [25] J. R. Silvius, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2003**, *1610*, 174–183.
- [26] K. Simons, D. Toomre, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 31–39.
- [27] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, *387*, 569–572.
- [28] E. Sezgin, I. Levental, S. Mayor, C. Eggeling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 361–374.
- [29] P. Gill, T. T. Moghadam, B. Ranjbar, *J. Biomol. Tech.* **2010**, *21*, 27.
- [30] Y. Zhai, L. Okoro, A. Cooper, R. Winter, *Biophys. Chem.* **2011**, *156*, 13–23.

- [31] S. A. Sanchez, M. A. Tricerri, E. Gratton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 7314–7319.
- [32] “ImageJ Download,” can be found under <https://imagej.net/Downloads>, **2019**.
- [33] T. Ferreira, W. Rasband, *IJ 146r Revis. Ed.* **2012**, 198.
- [34] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675.
- [35] A. B. Subramaniam, G. Guidotti, V. N. Manoharan, H. A. Stone, *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 128–133.
- [36] K. S. Horger, D. J. Estes, R. Capone, M. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1810–1819.
- [37] F.-C. Tsai, B. Stuhmann, G. H. Koenderink, *Langmuir* **2011**, *27*, 10061–10071.
- [38] A. Weinberger, F.-C. Tsai, G. H. Koenderink, T. F. Schmidt, R. Itri, W. Meier, T. Schmatko, A. Schröder, C. Marques, *Biophys. J.* **2013**, *105*, 154–164.
- [39] M. I. Angelova, D. S. Dimitrov, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* **1986**, *81*, 303–311.
- [40] J. Steinkühler, P. De Tillieux, R. L. Knorr, R. Lipowsky, R. Dimova, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 11838.
- [41] C. Herold, G. Chwastek, P. Schwille, E. P. Petrov, *Langmuir* **2012**, *28*, 5518–5521.
- [42] Y. Zhou, C. K. Berry, P. A. Storer, R. M. Raphael, *Biomaterials* **2007**, *28*, 1298–1306.
- [43] A. G. Ayuyan, F. S. Cohen, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 2172–2183.
- [44] M. R. Helfrich, L. K. Mangeney-Slavin, M. S. Long, K. Y. Djoko, C. D. Keating, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13374–13375.
- [45] T. Wilson, *J. Microsc.* **2011**, *244*, 113–121.
- [46] D. Semwogerere, E. Weeks R., *Encycl. Biomater. Biomed. Eng.* **2005**, 1–10.
- [47] R. N. Lewis, W. Pohle, R. N. McElhaney, *Biophys. J.* **1996**, *70*, 2736–2746.
- [48] J. Stetefeld, S. A. McKenna, T. R. Patel, *Biophys. Rev.* **2016**, *8*, 409–427.
- [49] D. Wang, C. Richter, A. Rühling, P. Drücker, D. Siegmund, N. Metzler-Nolte, F. Glorius, H.-J. Galla, *Chem. - Eur. J.* **2015**, *21*, 15123–15126.
- [50] D. Wang, C. Richter, A. Rühling, S. Hüwel, F. Glorius, H.-J. Galla, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *467*, 1033–1038.
- [51] T. Q. Luong, S. Kapoor, R. Winter, *Chemphyschem Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.* **2015**, *16*, 3555–3571.
- [52] D. H. Bartlett, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2002**, *1595*, 367–381.
- [53] R. Winter, C. Jeworrek, *Soft Matter* **2009**, *5*, 3157–3173.
- [54] P. F. McMillan, D. C. Clary, R. Winter, W. Dzwolak, *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **2005**, *363*, 537–563.
- [55] “Geodatenmanufaktur,” can be found under <https://www.geodatenmanufaktur.de/howtos/wassertemperatur.html>, **2020**.
- [56] S. Zeitung, “Neuer Tieftauch-Rekord im Marianengraben,” can be found under <https://www.sueddeutsche.de/wissen/tauchen-tiefsee-marianengraben-1.4445396>, **2020**.
- [57] R. Hazael, F. Meersman, F. Ono, P. F. McMillan, *Life Basel Switz.* **2016**, *6*, 34.
- [58] F. Meersman, I. Daniel, D. H. Bartlett, R. Winter, R. Hazael, P. F. McMillan, *Rev. Mineral. Geochem.* **2013**, *75*, 607–648.
- [59] F. M. Menger, M. I. Angelova, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 789–797.
- [60] F. M. Menger, K. D. Gabrielson, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2091–2106.
- [61] T. Oberholzer, P. L. Luisi, *J. Biol. Phys.* **2002**, *28*, 733–744.

- [62] S. Kapoor, A. Werkmüller, C. Denter, Y. Zhai, J. Markgraf, K. Weise, N. Opitz, R. Winter, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2011**, 1808, 1187–1195.
- [63] N. L. C. McCarthy, O. Ces, R. V. Law, J. M. Seddon, N. J. Brooks, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 8675–8678.
- [64] S. L. Veatch, S. L. Keller, *Biophys. J.* **2003**, 85, 3074–3083.
- [65] M. Gao, C. Held, S. Patra, L. Arns, G. Sadowski, R. Winter, *ChemPhysChem* **2017**, 18, 2951–2972.
- [66] M. Manisegaran, S. Bornemann, I. Kiesel, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, 21, 18533–18540.
- [67] S. Sukenik, S. Dunsky, A. Barnoy, I. Shumilin, D. Harries, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, 19, 29862–29871.
- [68] D. C. F. Wieland, P. Degen, T. Zander, S. Gayer, A. Raj, J. An, A. Dédinaïté, P. Claesson, R. Willumeit-Römer, *Soft Matter* **2016**, 12, 729–740.
- [69] M. Kreuzer, Solid-supported Lipid membranes and their response to varied environmental conditions, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2012**.
- [70] J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner, J. Kolar, *Veterinární Medicína* **2008**, 53, 397–411.
- [71] O.-A. Neumüller, *Römpps Chemie Lexikon*, Frankh'sche Verlagshandlung, Stuttgart, **1979**.
- [72] T. Kaltofen, Biophysikalische Aspekte der Schmierung natürlicher Gelenke - Dissertation T. Kaltofen, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2008**.
- [73] T. Zander, D. C. F. Wieland, A. Raj, M. Wang, B. Nowak, C. Krywka, A. Dédinaïté, P. M. Claesson, V. M. Garamus, A. Schreyer, R. Willumeit-Römer, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2016**, 142, 230–238.
- [74] M. Wang, C. Liu, E. Thormann, A. Dédinaïté, *Biomacromolecules* **2013**, 14, 4198–4206.
- [75] J. R. E. Fraser, T. C. Laurent, U. B. G. Laurent, *J. Intern. Med.* **1997**, 242, 27–33.
- [76] R. Winter, *Chem. Unserer Zeit* **1990**, 71–81.
- [77] T. Zander, The Interaction of DPPC and Hyaluronan - Dissertation T. Zander, Universität Hamburg, **2016**.
- [78] M. Herzog, L. Li, H.-J. Galla, R. Winter, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, 173, 327–334.
- [79] A. P. Minton, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 10577–10580.
- [80] R. Kleene, M. Schachner, *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, 5, 195–208.
- [81] A. Varki, N. Sharon, in *Essent. Glycobiol.* (Eds.: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), **2009**.
- [82] A. Varki, *Glycobiology* **2017**, 27, 3–49.
- [83] J. D. Esko, N. Sharon, in *Essent. Glycobiol.* (Eds.: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), **2009**.
- [84] A. Varki, J. B. Lowe, in *Essent. Glycobiol.* (Eds.: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), **2009**.
- [85] E. V. Maytin, *Glycobiology* **2016**, 26, 553–559.
- [86] V. Hascall, J. D. Esko, in *Essent. Glycobiol.* (Eds.: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), **2009**.

- [87] J. A. McDonald, T. D. Camenisch, *Glycoconj. J.* **2002**, *19*, 331–339.
- [88] H. Watanabe, Y. Yamada, K. Kimata, *J. Biochem. (Tokyo)* **1998**, *124*, 687–693.
- [89] M. A. O’Neill, T. Ishii, P. Albersheim, A. G. Darvill, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2004**, *55*, 109–139.
- [90] S. J. Free, *Adv. Genet.* **2013**, *81*, 33–82.
- [91] R. A. Burton, G. B. Fincher, *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 456.
- [92] T. Hayashi, R. Kaida, *Mol. Plant* **2011**, *4*, 17–24.
- [93] C. Hammond, I. Braakman, A. Helenius, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 913–917.
- [94] A. J. Petrescu, T. D. Butters, G. Reinkensmeier, S. Petrescu, F. M. Platt, R. A. Dwek, M. R. Wormald, *EMBO J.* **1997**, *16*, 4302–4310.
- [95] C. A. Jakob, P. Burda, J. Roth, M. Aebi, *J. Cell Biol.* **1998**, *142*, 1223–1233.
- [96] E. M. Quan, Y. Kamiya, D. Kamiya, V. Denic, J. Weibezahn, K. Kato, J. S. Weisman, *Mol. Cell* **2008**, *32*, 870–877.
- [97] Y. Zhu, T.-W. Liu, S. Cecioni, R. Eskandari, W. F. Zandberg, D. J. Vocadlo, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 319–325.
- [98] H. Hirayama, A. Hosomi, T. Suzuki, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2015**, *41*, 110–120.
- [99] P. K. Grewal, P. V. Aziz, S. Uchiyama, G. R. Rubio, R. D. Lardone, D. Le, N. M. Varki, V. Nizet, J. D. Marth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 20218–20223.
- [100] P. K. Grewal, S. Uchiyama, D. Ditto, N. Varki, D. T. Le, V. Nizet, J. D. Marth, *Nat. Med.* **2008**, *14*, 648–655.
- [101] J. C. Dumville, S. C. Fry, *Plant Physiol. Biochem. Paris* **2000**, *38*, 125–140.
- [102] S. D. Simpson, D. A. Ashford, D. J. Harvey, D. J. Bowles, *Glycobiology* **1998**, *8*, 579–583.
- [103] B. L. Ridley, M. A. O’Neill, D. Mohnen, *Phytochemistry* **2001**, *57*, 929–967.
- [104] I. Ofek, N. Sharon, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1990**, *151*, 91–113.
- [105] K. E. M. Persson, F. J. McCallum, L. Reiling, N. A. Lister, J. Stubbs, A. F. Cowman, K. Marsh, J. G. Beeson, *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 342–351.
- [106] M. L. Zupancic, M. Frieman, D. Smith, R. A. Alvarez, R. D. Cummings, B. P. Cormack, *Mol. Microbiol.* **2008**, *68*, 547–559.
- [107] H. E. Mensah-Brown, N. Amoako, J. Abugri, L. B. Stewart, G. Agongo, E. K. Dickson, M. F. Ofori, J. A. Stoute, D. J. Conway, G. A. Awandare, *J. Infect. Dis.* **2015**, *212*, 1288–1297.
- [108] R. L. Richards, J. Moss, C. R. Alving, P. H. Fishman, R. O. Brady, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, *76*, 1673–1676.
- [109] M. A. Karmali, M. Petric, C. Lim, P. C. Fleming, G. S. Arbus, H. Lior, *J. Infect. Dis.* **1985**, *151*, 775–782.
- [110] J. U. Baenziger, D. Fiete, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 9795–9799.
- [111] J. Holmgren, I. Lonroth, J. Mansson, L. Svennerholm, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1975**, *72*, 2520–2524.
- [112] D. Steil, C.-L. Schepers, G. Pohlentz, N. Legros, J. Runde, H.-U. Humpf, H. Karch, J. Müthing, *J. Lipid Res.* **2015**, *56*, 2322–2336.
- [113] E. N. Kitova, P. I. Kitov, D. R. Bundle, J. S. Klassen, *Glycobiology* **2001**, *11*, 605–611.
- [114] A. M. Wands, A. Fujita, J. E. McCombs, J. Cervin, B. Dedic, A. C. Rodriguez, N. Nischan, M. R. Bond, M. Mettlen, D. C. Trudgian, A. Lemoff, M. Quiding-Järbrink, B. Gustavsson, C. Steentoft, H. Clausen, H. Mirzaei, S. Teneberg, U. Yrlid, J. J. Kohler, *eLife* **2015**, *4*, e09545.

- [115] E. Byres, A. W. Paton, J. C. Paton, J. C. Löfling, D. F. Smith, M. C. J. Wilce, U. M. Talbot, D. C. Chong, H. Yu, S. Huang, X. Chen, N. M. Varki, A. Varki, J. Rossjohn, T. Beddoe, *Nature* **2008**, *456*, 648–652.
- [116] M. Osumi, *Micron* **1998**, *29*, 207–233.
- [117] T. C. Laurent, J. R. E. Fraser, *FASEB J.* **1992**, *6*, 2397–2404.
- [118] C. Somerville, S. Bauer, G. Brininstool, M. Facette, T. Hamann, J. Milne, E. Osborne, A. Paredez, S. Persson, T. Raab, S. Vorwerk, H. Youngs, *Science* **2004**, *306*, 2206–2211.
- [119] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, **2002**.
- [120] J. D. Marth, *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 1015–1016.
- [121] T. Baumgart, S. T. Hess, W. W. Webb, *Nature* **2003**, *425*, 821–824.
- [122] B. L. Stottrup, S. L. Veatch, S. L. Keller, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 2942–2950.
- [123] L. J. Pike, *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 1597–1598.
- [124] H. M. McConnell, M. Vrljic, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, *32*, 469–492.
- [125] M. F. Hagan, O. M. Elrad, R. L. Jack, *J. Chem. Phys.* **2011**, *135*.
- [126] Y. Yan, J. Huang, B. Z. Tang, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 11870–11884.
- [127] A. B. Subramaniam, S. Lecuyer, K. S. Ramamurthi, R. Losick, H. A. Stone, *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla* **2010**, *22*, 2142–2147.
- [128] R. Parthasarathy, C. Yu, J. T. Groves, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2006**, *22*, 5095–5099.
- [129] N. Kahya, D. Scherfeld, K. Bacia, B. Poolman, P. Schwille, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 28109–28115.
- [130] Y. Kaizuka, J. T. Groves, *Biophys. J.* **2004**, *86*, 905–912.
- [131] S. Munro, *Cell* **2003**, *115*, 377–388.
- [132] D. Lingwood, K. Simons, *Science* **2010**, *327*, 46–50.
- [133] J. Malinsky, M. Opekarová, W. Tanner, *Yeast* **2010**, *27*, 473–478.
- [134] M. E. Young, T. S. Karpova, B. Brügger, D. M. Moschenross, G. K. Wang, R. Schneiter, F. T. Wieland, J. A. Cooper, *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 927–934.
- [135] M. Iqbal, Y. Tao, S. Xie, Y. Zhu, D. Chen, X. Wang, L. Huang, D. Peng, A. Sattar, M. A. B. Shabbir, H. I. Hussain, S. Ahmed, Z. Yuan, *Biol. Proced. Online* **2016**, *18*.
- [136] M. van Berlo, K. C. Luyben, L. A. van der Wielen, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **1998**, *711*, 61–68.
- [137] A. L. Grilo, M. R. Aires-Barros, A. M. Azevedo, *Sep. Purif. Rev.* **2016**, *45*, 68–80.
- [138] T. J. Peters, *Cell Biochem. Funct.* **1987**, *5*, 233–234.
- [139] R. Hatti-Kaul, Ed., *Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols*, Humana Press, **2000**.
- [140] J. Asenjo, B. Andrews, *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 8826–8835.
- [141] P. Å. Albertsson, *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *5*, 351–358.
- [142] E. J. Wood, *Biochem. Educ.* **1991**, *19*, 39–40.
- [143] M. T. Zafarani-Moattar, S. Hamzehzadeh, S. Nasiri, *Biotechnol. Prog.* **2012**, *28*, 146–156.
- [144] P. G. Mazzola, A. M. Lopes, F. A. Hasmann, A. F. Jozala, T. C. Penna, P. O. Magalhaes, C. O. Rangel-Yagui, A. P. Jr, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2008**, *83*, 143–157.

- [145] M. Salamanca, J. Merchuk, B. Andrews, J. Asenjo, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **1998**, *711*, 319–329.
- [146] B. Perez, L. P. Malpiedi, G. Tubío, B. Nerli, P. de Alcântara Pessôa Filho, *J. Chem. Thermodyn.* **2013**, *56*, 136–143.
- [147] S. Raja, V. R. Murty, V. Thivaharan, V. Rajasekar, V. Ramesh, *Sci. Technol.* **2011**, *1*, 7–16.
- [148] R. Dimova, R. Lipowsky, *Adv. Mater. Interfaces* **2017**, *4*, 1600451.
- [149] S. Cinar, H. Cinar, H. S. Chan, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 7347–7354.
- [150] S. B. Zimmerman, L. D. Murphy, *FEBS Lett.* **1996**, *390*, 245–248.
- [151] H. Johansson, D. Brooks, C. Haynes, *Int. Rev. Cytol.* **2000**, *192*, 155–170.
- [152] M. S. Long, C. D. Jones, M. R. Helfrich, L. K. Mangeney-Slavin, C. D. Keating, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 5920–5925.
- [153] H. Walter, D. E. Brooks, *FEBS Lett.* **1995**, *361*, 135–139.
- [154] Y. Liu, R. Lipowsky, R. Dimova, *Front. Chem.* **2019**, *7*.
- [155] M. S. Long, A.-S. Cans, C. D. Keating, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 756–762.
- [156] G. Johansson, H. Walter, *Int. Rev. Cytol.* **2000**, *192*, 33–60.
- [157] M. Andes-Koback, C. D. Keating, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9545–9555.
- [158] L. M. Dominak, C. D. Keating, *Langmuir* **2007**, *23*, 7148–7154.
- [159] M. A. Eiteman, *J. Chromatogr. A* **1994**, *668*, 13–19.
- [160] C. A. Costa, J. S. Cabral, Eds., *Chromatographic and Membrane Processes in Biotechnology*, Springer Netherlands, **1991**.
- [161] J. N. Baskir, T. A. Hatton, U. W. Suter, *Macromolecules* **1987**, *20*, 1300–1311.
- [162] A. D. Diamond, J. T. Hsu, *Biotechnol. Bioeng.* **1989**, *34*, 1000–1014.
- [163] A. D. Diamond, J. T. Hsu, *J. Chromatogr. A* **1990**, *513*, 137–143.
- [164] Y.-T. Wu, D.-Q. Lin, Z.-Q. Zhu, *Fluid Phase Equilibria* **1998**, *147*, 25–43.
- [165] C. D. Keating, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 2114–2124.
- [166] R. Dimova, R. Lipowsky, *Soft Matter* **2012**, *8*, 6409.
- [167] A.-S. Cans, M. Andes-Koback, C. D. Keating, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7400–7406.
- [168] G. Lentzen, T. Schwarz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *72*, 623–634.
- [169] R. Graf, S. Anzali, J. Buenger, F. Pfluecker, H. Driller, *Clin. Dermatol.* **2008**, *26*, 326–333.
- [170] A. D. Brown, in *Adv. Microb. Physiol.* (Eds.: A.H. Rose, J.G. Morris), Academic Press, **1978**, 181–242.
- [171] E. A. Galinski, H. P. Pfeiffer, H. G. Trüper, *Eur. J. Biochem.* **1985**, *149*, 135–139.
- [172] L. Inbar, A. Lapidot, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 16014–16022.
- [173] E. A. Galinski, *Experientia* **1993**, *49*, 487–496.
- [174] L. Inbar, F. Frolow, A. Lapidot, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *214*, 897–906.
- [175] W. Schuh, H. Puff, E. A. Galinski, H. G. Trüper, *Z. Naturforsch.* **1985**, 780–784.
- [176] G. Zaccai, I. Bagyan, J. Combet, G. J. Cuello, B. Demé, Y. Fichou, F.-X. Gallat, V. M. Galvan Josa, S. von Gronau, M. Haertlein, A. Martel, M. Moulin, M. Neumann, M. Weik, D. Oesterhelt, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31434.
- [177] E. A. Galinski, M. Stein, B. Amendt, M. Kinder, *Comp Biochem Physiol* **1997**, 357–365.
- [178] S. Kolp, M. Pietsch, E. A. Galinski, M. Gütschow, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1764*, 1234–1242.
- [179] K. Lippert, E. A. Galinski, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *37*, 61–65.
- [180] T. Dirschka, *Aktuelle Dermatol.* **2008**, *34*, 115–118.

- [181] J. M. Berg, L. Stryer, J. L. Tymoczko, *Stryer Biochemie*, Springer Spektrum, **2013**.
- [182] J. C. Newman, E. Verdin, *Annu. Rev. Nutr.* **2017**, *37*, 51–76.
- [183] D. D. Martin, D. H. Bartlett, M. F. Roberts, *Extrem. Life Extreme Cond.* **2002**, *6*, 507–514.
- [184] S. Obruca, P. Sedlacek, F. Mravec, O. Samek, I. Marova, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 1365–1376.
- [185] G. Soto, L. Setten, C. Lisi, C. Maurelis, M. Mozzicafreddo, M. Cuccioloni, M. Angeletti, N. D. Ayub, *Extremophiles* **2012**, *16*, 455–462.
- [186] R. K. Harishchandra, S. Wulff, G. Lentzen, T. Neuhaus, H.-J. Galla, *Biophys. Chem.* **2010**, *150*, 37–46.
- [187] M. Dwivedi, M. Brinkkötter, R. K. Harishchandra, H.-J. Galla, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2014**, *1838*, 2716–2727.
- [188] J. Smiatek, R. K. Harishchandra, O. Rubner, H.-J. Galla, A. Heuer, *Biophys. Chem.* **2012**, *160*, 62–68.
- [189] R. K. Harishchandra, A. K. Sachan, A. Kerth, G. Lentzen, T. Neuhaus, H.-J. Galla, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2011**, *1808*, 2830–2840.
- [190] H. Ebel, P. Grabitz, T. Heimburg, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 7353–7360.
- [191] D. Otzen, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2011**, *1814*, 562–591.
- [192] M. J. Scott, M. N. Jones, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2000**, *1508*, 235–251.
- [193] F. G. Jarvis, M. J. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 4124–4126.
- [194] J. D. Desai, I. M. Banat, *Fuel Energy Abstr.* **1997**, *38*, 221.
- [195] A. M. Abdel-Mawgoud, F. Lépine, E. Déziel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 1323–1336.
- [196] P. Singh, S. S. Cameotra, *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 142–146.
- [197] J. Rühl, E.-M. Hein, H. Hayen, A. Schmid, L. M. Blank, *Microb. Biotechnol.* **2012**, *5*, 45–58.
- [198] T. Tiso, R. Zauter, H. Tulke, B. Leuchtler, W.-J. Li, B. Behrens, A. Wittgens, F. Rosenau, H. Hayen, L. M. Blank, *Microb. Cell Factories* **2017**, *16*.
- [199] D. E. Otzen, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2017**, *1859*, 639–649.
- [200] S. Lang, D. Wullbrandt, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 22–32.
- [201] J. R. Edwards, J. A. Hayashi, *Arch. Biochem. Biophys.* **1965**, *111*, 415–421.
- [202] N. Shaw, *Bacteriol. Rev.* **1970**, *34*, 365–377.
- [203] A. Itoh, H. Honda, F. Tomato, T. Suzuki, *J. Antibiot. (Tokyo)* **1971**, 855–859.
- [204] N. B. Rendell, G. W. Taylor, M. Somerville, H. Todd, R. Wilson, P. J. Cole, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **1990**, *1045*, 189–193.
- [205] Y. Zhang, R. M. Miller, *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 2101–2106.
- [206] E. Déziel, F. Lépine, D. Dennie, D. Boismenu, O. A. Mamer, R. Villemur, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1999**, *1440*, 244–252.
- [207] E. Déziel, F. Lépine, S. Milot, R. Villemur, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **2000**, *1485*, 145–152.
- [208] E. Haba, A. Abalos, O. Jáuregui, M. J. Espuny, A. Manresa, *J. Surfactants Deterg.* **2003**, *6*, 155–161.
- [209] N. W. Gunther, A. Nunez, W. Fett, D. K. Y. Solaiman, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 2288–2293.
- [210] A. Sharma, R. Jansen, M. Nimtz, B. N. Johri, V. Wray, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 941–947.

- [211] M. Nitschke, S. G. V. A. O. Costa, J. Contiero, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *160*, 2066–2074.
- [212] Y.-P. Guo, Y.-Y. Hu, R. R. Gu, H. Lin, *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *331*, 356–363.
- [213] M. Jadhav, S. Kalme, D. Tamboli, S. Govindwar, *J. Basic Microbiol.* **2011**, *51*, 385–396.
- [214] T. Rezanka, L. Siristova, K. Sigler, *Extrem. Life Extreme Cond.* **2011**, *15*, 697–709.
- [215] A. Abalos, A. Pinazo, M. R. Infante, M. Casals, F. García, A. Manresa, *Langmuir* **2001**, *17*, 1367–1371.
- [216] J. Howe, J. Bauer, J. Andrä, A. B. Schromm, M. Ernst, M. Rössle, U. Zähringer, J. Rademann, K. Brandenburg, *FEBS J.* **2006**, *273*, 5101–5112.
- [217] M. Nitschke, S. G. V. A. O. Costa, J. Contiero, *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 1593–1600.
- [218] J. Andrä, J. Rademann, J. Howe, M. H. J. Koch, H. Heine, U. Zähringer, K. Brandenburg, *Biol. Chem.* **2006**, *387*.
- [219] M. L. Chen, J. Penfold, R. K. Thomas, T. J. P. Smyth, A. Perfumo, R. Marchant, I. M. Banat, P. Stevenson, A. Parry, I. Tucker, I. Grillo, *Langmuir* **2010**, *26*, 18281–18292.
- [220] A. M. Pajarron, C. G. de Koster, W. Heerma, M. Schmidt, J. Haverkamp, *Glycoconj. J.* **1993**.
- [221] T. Urakami, C. Ito-Yoshida, H. Araki, T. Kijima, K. I. Suzuki, K. Komagata, *Int. J. Syst. Bacteriol. USA* **1994**.
- [222] S. Häußler, M. Nimtz, T. Domke, V. Wray, I. Steinmetz, *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 1588–1593.
- [223] D. Dubeau, E. Déziel, D. E. Woods, F. Lépine, *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 263.
- [224] J. C. Mata-Sandoval, J. Karns, A. Torrents, *J. Chromatogr. A* **1999**, *864*, 211–220.
- [225] N. W. Gunther, A. Nuñez, L. Fortis, D. K. Y. Solaiman, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 914–920.
- [226] O. Pornsunthorntawe, P. Wongpanit, S. Chavadej, M. Abe, R. Rujiravanit, *Biore-sour. Technol.* **2008**, *99*, 1589–1595.
- [227] A. Germer, T. Tiso, C. Müller, B. Behrens, C. Vosse, K. Scholz, M. Froning, H. Hayen, L. M. Blank, *Appl. Environ. Microbiol.* **2020**, *86*.
- [228] R. Beal, W. B. Betts, *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *89*, 158–168.
- [229] G. S. Shreve, S. Inguva, S. Gunnam, *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **1995**, *4*, 331–337.
- [230] K. Hisatsuka, T. Nakahara, N. Sano, K. Yamada, *Agric. Biol. Chem.* **1971**, *35*, 686–692.
- [231] R. A. Al-Tahhan, T. R. Sandrin, A. A. Bodour, R. M. Maier, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 3262–3268.
- [232] S. Itoh, T. Suzuki, *Agric. Biol. Chem.* **1972**, *36*, 2233–2235.
- [233] R. C. Read, P. Roberts, N. Munro, A. Rutman, A. Hastie, T. Shryock, R. Hall, W. McDonald-Gibson, V. Lund, G. Taylor, *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **1992**, *72*, 2271–2277.
- [234] R. Kownatzki, B. Tümmler, G. Döring, *Lancet Lond. Engl.* **1987**, *1*, 1026–1027.
- [235] G. Sierra, *Antonie Van Leeuwenhoek* **1960**, *26*, 189–192.
- [236] C. D. McClure, N. L. Schiller, *J. Leukoc. Biol.* **1992**, *51*, 97–102.
- [237] A. Kharazmi, Z. Bibi, H. Nielsen, N. Høiby, G. Döring, *APMIS* **1989**, *97*, 1068–1072.

- [238] M. Alhede, T. Bjarnsholt, P. Ø. Jensen, R. K. Phipps, C. Moser, L. Christophersen, L. D. Christensen, M. van Gennip, M. Parsek, N. Høiby, T. B. Rasmussen, M. Givskov, *Microbiol. Read. Engl.* **2009**, *155*, 3500–3508.
- [239] M. Van Gennip, L. D. Christensen, M. Alhede, R. Phipps, P. Ø. Jensen, L. Christophersen, S. J. Pamp, C. Moser, P. J. Mikkelsen, A. Y. Koh, T. Tolker-Nielsen, G. B. Pier, N. Høiby, M. Givskov, T. Bjarnsholt, *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **2009**, *117*, 537–546.
- [240] S. Lang, E. Katsiwela, F. Wagner, *Lipid Fett* **1989**, *91*, 363–366.
- [241] A. V. Sotirova, D. I. Spasova, D. N. Galabova, E. Karpenko, A. Shulga, *Curr. Microbiol.* **2008**, *56*, 639–644.
- [242] M. Benincasa, A. Abalos, I. Oliveira, A. Manresa, *Antonie Van Leeuwenhoek* **2004**, *85*, 1–8.
- [243] E. Haba, A. Pinazo, O. Jauregui, M. J. Espuny, M. R. Infante, A. Manresa, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *81*, 316–322.
- [244] D. Haferburg, R. Hommel, H.-P. Kleber, S. Kluge, G. Schuster, H.-J. Zschiegner, *Acta Biotechnol.* **1987**, *7*, 353–356.
- [245] P. Cosson, L. Zulianello, O. Join-Lambert, F. Faurisson, L. Gebbie, M. Benghezal, C. Van Delden, L. K. Curty, T. Köhler, *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 3027–3033.
- [246] X. Wang, L. Gong, S. Liang, X. Han, C. Zhu, Y. Li, *Harmful Algae* **2005**, *2*, 433–443.
- [247] M. E. Stanghellini, R. M. Miller, *Plant Dis.* **1997**, *81*, 4–12.
- [248] L. Rodrigues, J. A. Teixeira, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2010**, *672*, 65–74.
- [249] H. Chong, Q. Li, *Microb. Cell Factories* **2017**, *16*, 137.
- [250] A. Wittgens, T. Tiso, T. T. Arndt, P. Wenk, J. Hemmerich, C. Müller, R. Wichmann, B. Küpper, M. Zwick, S. Wilhelm, R. Hausmann, C. Syltatk, F. Rosenau, L. M. Blank, *Microb. Cell Factories* **2011**, *10*, 80.
- [251] D. H. Dusane, S. Dam, Y. V. Nancharaiah, A. Kumar, V. P. Venugopalan, S. S. Zinjarde, *Aquat. Biosyst.* **2012**, *8*, 17.
- [252] D. H. Dusane, Y. V. Nancharaiah, S. S. Zinjarde, V. P. Venugopalan, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, *81*, 242–248.
- [253] T. R. Neu, *Microbiol. Rev.* **1996**, *60*, 151–166.
- [254] M. E. Davey, N. C. Caiazza, G. A. O’Toole, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 1027–1036.
- [255] B. R. Boles, M. Thoendel, P. K. Singh, *Mol. Microbiol.* **2005**, *57*, 1210–1223.
- [256] A. Nickzad, E. Déziel, *Lett. Appl. Microbiol.* **2014**, *58*, 447–453.
- [257] I. Aleksic, M. Petkovic, M. Jovanovic, D. Milivojevic, B. Vasiljevic, J. Nikodino-
vic-Runic, L. Senerovic, *Front. Microbiol.* **2017**, *8*.
- [258] A. Sotirova, D. Spasova, E. Vasileva-Tonkova, D. Galabova, *Microbiol. Res.* **2009**, *164*, 297–303.
- [259] S. P. Denyer, J.-Y. Maillard, *J. Appl. Microbiol.* **2002**, *92*, 35–45.
- [260] L. V. de Araujo, C. R. Guimarães, R. L. da S. Marquita, V. M. J. Santiago, M. P. de Souza, M. Nitschke, D. M. G. Freire, *Food Control* **2016**, *63*, 171–178.
- [261] M. Zezzi do Valle Gomes, M. Nitschke, *Food Control* **2012**, *25*, 441–447.
- [262] E. Yalçın, A. Ergene, *J. Appl. Biol. Sci. JABS E-ISSN2146-0108* **2009**, *3*, 163–168.
- [263] S. Cameotra, R. Makkar, *Curr. Opin. Microbiol.* **2004**, *7*, 262–266.
- [264] I. M. Banat, R. S. Makkar, S. S. Cameotra, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *53*, 495–508.
- [265] T. Stipcevic, A. Piljac, G. Piljac, *Burns* **2006**, *32*, 24–34.

- [266] P. Vatsa, L. Sanchez, C. Clement, F. Baillieul, S. Dorey, *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 5095–5108.
- [267] L. Rodrigues, I. M. Banat, J. Teixeira, R. Oliveira, *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *57*, 609–618.
- [268] K. K. Sekhon Randhawa, P. K. S. M. Rahman, *Front. Microbiol.* **2014**, *5*.
- [269] M. Nitschke, S. G. V. A. O. Costa, *Trends Food Sci. Technol.* **2007**, *18*, 252–259.
- [270] N. Kosaric, *Food Technol. Biotechnol.* **2001**, *39*.
- [271] T. Tiso, S. Thies, M. Müller, L. Tsvetanova, L. Carraresi, S. Bröring, K.-E. Jaeger, L. M. Blank, in *Consequences Microb. Interact. Hydrocarb. Oils Lipids Prod. Fuels Chem.* (Ed.: S.Y. Lee), Springer International Publishing, Cham, **2017**, 587–622.
- [272] R. M. Maier, G. Soberón-Chávez, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *54*, 625–633.
- [273] V. Klekner, N. Kosaric, in *Biosurfactants Prod. Prop. Appl.* (Ed.: N. Kosaric), New York, **1993**, 373–389.
- [274] P. Bharali, J. P. Saikia, A. Ray, B. K. Konwar, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *103*, 502–509.
- [275] L. H. Kim, Y. Jung, H.-W. Yu, K.-J. Chae, I. S. Kim, *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 3718–3726.
- [276] K. S. M. Rahman, T. J. Rahman, S. McClean, R. Marchant, I. M. Banat, *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 1277–1281.
- [277] F. J. Aranda, M. J. Espuny, A. Marqués, J. A. Teruel, Á. Manresa, A. Ortiz, *Langmuir* **2007**, *23*, 2700–2705.
- [278] M. Sánchez, J. A. Teruel, M. J. Espuny, A. Marqués, F. J. Aranda, A. Manresa, A. Ortiz, *Chem. Phys. Lipids* **2006**, *142*, 118–127.
- [279] E. Haba, A. Pinazo, R. Pons, L. Pérez, A. Manresa, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2014**, *1838*, 776–783.
- [280] O. Pornsunthorntawe, S. Chavadej, R. Rujiravanit, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2009**, *72*, 6–15.
- [281] J. Penfold, R. K. Thomas, H.-H. Shen, *Soft Matter* **2011**, *8*, 578–591.
- [282] J. T. Champion, J. C. Gilkey, H. Lamparski, J. Retterer, R. M. Maier, *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, *170*, 569–574.
- [283] H. Abbasi, F. J. Aranda, K. A. Noghabi, A. Ortiz, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2013**, *1828*, 2083–2090.
- [284] M. Sánchez, F. J. Aranda, J. A. Teruel, A. Ortiz, *Chem. Phys. Lipids* **2011**, *164*, 16–23.
- [285] A. Grau, J. Gómez Fernández, F. Peypoux, A. Ortiz, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1418*, 307–319.
- [286] Å. Wieslander, J. Ulmius, G. Lindblom, K. Fontell, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1978**, *512*, 241–253.
- [287] G. Graham Shipley, J. P. Green, B. W. Nichols, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1973**, *311*, 531–544.
- [288] A. Ortiz, J. A. Teruel, M. J. Espuny, A. Marqués, Á. Manresa, F. J. Aranda, *Int. J. Pharm.* **2006**, *325*, 99–107.
- [289] H. Abbasi, K. A. Noghabi, A. Ortiz, *Chem. Phys. Lipids* **2012**, *165*, 745–752.
- [290] A. G. Lee, in *Membr. Fluidity Biol. Vol 2 Gen. Princ.* (Ed.: R.C. Alioa), Academic Press, New York, NY, **1983**, 43–88.
- [291] K. A. Henzler-Wildman, G. V. Martinez, M. F. Brown, A. Ramamoorthy, *Biochemistry* **2004**, *43*, 8459–8469.
- [292] H. H. Mantsch, R. N. McElhaney, *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *57*, 213–226.

- [293] M. Rappolt, A. Hickel, F. Bringezu, K. Lohner, *Biophys. J.* **2003**, *84*, 3111–3122.
- [294] K. Pressl, K. Jørgensen, P. Laggner, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1325*, 1–7.
- [295] A. Tardieu, V. Luzzati, F. C. Reman, *J. Mol. Biol.* **1973**, *75*, 711–733.
- [296] M. Sánchez, F. J. Aranda, J. A. Teruel, A. Ortiz, *Chem. Phys. Lipids* **2009**, *161*, 51–55.
- [297] V. A. Pashynska, *Biopolym. Cell* **2009**, *25*, 504–508.
- [298] M. Sánchez, F. J. Aranda, J. A. Teruel, M. J. Espuny, A. Marqués, Á. Manresa, A. Ortiz, *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *341*, 240–247.
- [299] A. Ortiz, J. A. Teruel, F. J. Aranda, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1720*, 137–142.
- [300] M. Apel-Paz, G. F. Doncel, T. K. Vanderlick, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **2005**, *21*, 9843–9849.
- [301] N. Monnier, A. Furlan, S. Buchoux, M. Deleu, M. Dauchez, S. Rippa, C. Sarazin, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1009.
- [302] K. Kazan, D. M. Gardiner, *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006297.
- [303] J. Gamir, R. Darwiche, P. Van't Hof, V. Choudhary, M. Stumpe, R. Schneiter, F. Mauch, *Plant J. Cell Mol. Biol.* **2017**, *89*, 502–509.
- [304] G. W. Stockton, I. C.P. Smith, *Chem. Phys. Lipids* **1976**, *17*, 251–263.
- [305] J. Henriksen, A. C. Rowat, E. Brief, Y. W. Hsueh, J. L. Thewalt, M. J. Zuckermann, J. H. Ipsen, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 1639–1649.
- [306] L. Miao, M. Nielsen, J. Thewalt, J. H. Ipsen, M. Bloom, M. J. Zuckermann, O. G. Mouritsen, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 1429–1444.
- [307] T. Róg, M. Pasenkiewicz-Gierula, I. Vattulainen, M. Karttunen, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2009**, *1788*, 97–121.
- [308] J. A. Urbina, S. Pekerar, H. Le, J. Patterson, B. Montez, E. Oldfield, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1995**, *1238*, 163–176.
- [309] Y. Ishigami, Y. Gama, H. Nagahora, M. Yamaguchi, H. Nakahara, T. Kamata, *Chem. Lett.* **1987**, *16*, 763–766.
- [310] P. A. Leventis, S. Grinstein, *Annu. Rev. Biophys.* **2010**, *39*, 407–427.
- [311] P. Williamson, E. M. Bevers, E. F. Smeets, P. Comfurius, R. A. Schlegel, R. F. A. Zwaal, *Biochemistry* **1995**, *34*, 10448–10455.
- [312] D. Huster, P. Müller, K. Arnold, A. Herrmann, *Eur. Biophys. J. EBJ* **2003**, *32*, 47–54.
- [313] A. Oliva, J. A. Teruel, F. J. Aranda, A. Ortiz, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2020**, *185*, 110576.
- [314] G. B. Ansell, J. N. Hawthorne, R. M. C. Dawson, *Form and Function of Phospholipids*, Amsterdam ; New York : Elsevier Scientific Pub. Co, **1973**.
- [315] G. B. Díaz, A. M. Cortizo, M. E. García, J. J. Gagliardino, *Lipids* **1988**, *23*, 1125–1128.
- [316] C. Jeworrek, M. Pühse, R. Winter, *Langmuir* **2008**, *24*, 11851–11859.
- [317] K. El Kirat, S. Morandat, Y. F. Dufrêne, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2010**, *1798*, 750–765.
- [318] A. S. Ulrich, M. Sami, A. Watts, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1994**, *1191*, 225–230.
- [319] E. Y. Shalaev, P. L. Steponkus, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1999**, *1419*, 229–247.
- [320] C. Syldatk, S. Lang, U. Matulovic, F. Wagner, *Z. Naturforsch. [C]* **1985**, *40*, 61–67.

- [321] J. C. Lawrence, D. E. Saslowsky, J. M. Edwardson, R. M. Henderson, *Biophys. J.* **2003**, *84*, 1827–1832.
- [322] M. Herzog, T. Tiso, L. M. Blank, R. Winter, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2020**, 183431.
- [323] A. Fiechter, *Trends Biotechnol.* **1992**, *10*, 208–217.
- [324] L. Blank, F. Rosenau, S. Wilhelm, A. Wittgens, T. Tiso, *Means and Methods for Rhamnolipid Production*, **2013**, EP2573172A1.
- [325] A. J. Arduengo, R. L. Harlow, M. Kline, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 361–363.
- [326] M. N. Hopkinson, C. Richter, M. Schedler, F. Glorius, *Nature* **2014**, *510*, 485–496.
- [327] C. Richter, K. Schaepe, F. Glorius, B. J. Ravoo, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3204–3207.
- [328] F. E. Hahn, M. C. Jahnke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3122–3172.
- [329] T. Dröge, F. Glorius, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6940–6952.
- [330] D. J. Nelson, S. P. Nolan, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6723–6753.
- [331] G. C. Fortman, S. P. Nolan, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5151–5169.
- [332] A. Benedetto, *Biophys. Rev.* **2017**, *9*, 309–320.
- [333] K. S. Egorova, E. G. Gordeev, V. P. Ananikov, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7132–7189.
- [334] S. N. Riduan, Y. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 9055–9070.
- [335] C. M. Mahalakshmi, M. Karthick, M. Shanmugam, V. Chidambaranathan, *Pharma Chem.* **2015**, *7*, 14–19.
- [336] C. Samori, D. Malferrari, P. Valbonesi, A. Montecavalli, F. Moretti, P. Galletti, G. Sartor, E. Tagliavini, E. Fabbri, A. Pasteris, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2010**, *73*, 1456–1464.
- [337] K. Rawat, H. B. Bohidar, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 11065–11074.
- [338] E. B. Anderson, T. E. Long, *Polymer* **2010**, *51*, 2447–2454.
- [339] L. Carson, P. K. W. Chau, M. J. Earle, M. A. Gilea, B. F. Gilmore, S. P. Gorman, M. T. McCann, K. R. Seddon, *Green Chem.* **2009**, *11*, 492–497.
- [340] D. Wang, H.-J. Galla, P. Drücker, *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 735–746.
- [341] A. Cornellias, L. Perez, F. Comelles, I. Ribosa, A. Manresa, M. T. Garcia, *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *355*, 164–171.
- [342] M. Tischer, G. Pradel, K. Ohlsen, U. Holzgrabe, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 22–31.
- [343] D. Demberelnyamba, K.-S. Kim, S. Choi, S.-Y. Park, H. Lee, C.-J. Kim, I.-D. Yoo, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 853–857.
- [344] A. Rühling, D. Wang, J. B. Ernst, S. Wulff, R. Honeker, C. Richter, A. Ferry, H.-J. Galla, F. Glorius, *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23*, 5920–5924.
- [345] G. Bhattacharya, S. Mitra, P. Mandal, S. Dutta, R. P. Giri, S. K. Ghosh, *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 709–719.
- [346] P. Drücker, A. Rühling, D. Grill, D. Wang, A. Draeger, V. Gerke, F. Glorius, H.-J. Galla, *Langmuir* **2017**, *33*, 1333–1342.
- [347] D. Wang, D. H. de Jong, A. Rühling, V. Lesch, K. Shimizu, S. Wulff, A. Heuer, F. Glorius, H.-J. Galla, *Langmuir* **2016**, *32*, 12579–12592.
- [348] S. Mitra, D. Ray, G. Bhattacharya, R. Gupta, D. Sen, V. K. Aswal, S. K. Ghosh, *Eur. Biophys. J. EBJ* **2019**, *48*, 119–129.
- [349] K. Bacia, P. Schwille, T. Kurzchalia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 3272–3277.
- [350] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, *387*, 569–572.
- [351] H. A. Lucero, P. W. Robbins, *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *426*, 208–224.

- [352] K. Weise, S. Kapoor, C. Denter, J. Nikolaus, N. Opitz, S. Koch, G. Triola, A. Herrmann, H. Waldmann, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 880–887.
- [353] M. Herzog, M. Dwivedi, R. K. Harishchandra, A. Bilstein, H.-J. Galla, R. Winter, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *178*, 404–411.
- [354] S. Bornemann, M. Herzog, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 5730–5743.
- [355] O. Reis, R. Winter, T. W. Zerda, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1996**, *1279*, 5–16.
- [356] G. Cevc, T. M. Allen, S. L. Neidleman, *Phospholipids Handbook*, New York, New York ; Basel : Marcel Dekker, Inc, **1993**.
- [357] F. M. Harris, K. B. Best, J. D. Bell, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2002**, *1565*, 123–128.
- [358] E. Chibowski, A. Szczeń, *Adsorption* **2016**, *22*, 755–765.
- [359] S. Sao, I. Mukherjee, P. De, D. Chaudhuri, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 3994–3997.
- [360] S. Purushothaman, P. Cicuta, O. Ces, N. J. Brooks, *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 9805–9810.
- [361] H. A. Rinia, M. M. E. Snel, J. P. J. M. van der Eerden, B. de Kruijff, *FEBS Lett.* **2001**, *501*, 92–96.
- [362] K. Weise, G. Triola, L. Brunsveld, H. Waldmann, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1557–1564.
- [363] I. Koltover, *Science* **1998**, *281*, 78–81.
- [364] L. V. Chernomordik, M. M. Kozlov, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 675–683.
- [365] N. J. Caplen, E. Kinrade, F. Sorgi, X. Gao, D. Gruenert, D. Geddes, C. Coutelle, L. Huang, E. W. Alton, R. Williamson, *Gene Ther.* **1995**, *2*, 603–613.
- [366] M. Cavazzana, E. Six, C. Lagresle-Peyrou, I. André-Schmutz, S. Hacein-Bey-Abina, *Hum. Gene Ther.* **2016**, *27*, 108–116.
- [367] M. Cavazzana-Calvo, S. Hacein-Bey, G. de Saint Basile, F. Gross, E. Yvon, P. Nusbaum, F. Selz, C. Hue, S. Certain, J. L. Casanova, P. Bousso, F. L. Deist, A. Fischer, *Science* **2000**, *288*, 669–672.
- [368] L. Wasungu, D. Hoekstra, *J. Controlled Release* **2006**, *116*, 255–264.
- [369] N.-B. Woods, V. Bottero, M. Schmidt, C. von Kalle, I. M. Verma, *Nature* **2006**, *440*, 1123.
- [370] S. Hacein-Bey-Abina, C. von Kalle, M. Schmidt, F. Le Deist, N. Wulffraat, E. McIntyre, I. Radford, J.-L. Villeval, C. C. Fraser, M. Cavazzana-Calvo, A. Fischer, *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 255–256.
- [371] R. W. Old, S. B. Primrose, *Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering*, University Of California Press, **1980**.
- [372] F. Lottspeich, J. W. Engels, Eds. , *Bioanalytik*, Springer Spektrum, **2012**.
- [373] J. O. Rädler, I. Koltover, T. Salditt, C. R. Safinya, *Science* **1997**, *275*, 810–814.
- [374] D. Groth, Entwicklung von liposomalen Gentransfervesikeln auf der Grundlage optimierter kationischer Lipide - Dissertation D. Groth, Universität Berlin, **2000**.
- [375] T. Boukhnikachvili, O. Aguerre-Chariol, M. Airiau, S. Lesieur, M. Ollivon, J. Vacus, *FEBS Lett.* **1997**, *409*, 188–194.
- [376] C. Lehmann, Untersuchungen zum Aufnahmemechanismus und intrazellulärem Transport von fusogenen und kationischen Liposomen-DNA-Komplexen für den Gentransfer - Dissertation C. Lehmann, Universität Potsdam, **2003**.
- [377] M. T. Kennedy, E. V. Pozharski, V. A. Rakhmanova, R. C. MacDonald, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1620–1633.

- [378] X. Gao, L. Huang, *Gene Ther.* **1995**, *2*, 710–722.
- [379] A. Fasbender, J. Zabner, B. G. Zeiher, M. J. Welsh, *Gene Ther.* **1997**, *4*, 1173–1180.
- [380] B. Ruozi, F. Forni, R. Battini, M. A. Vandelli, *J. Drug Target.* **2003**, *11*, 407–414.
- [381] X. Zhou, L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1994**, *1189*, 195–203.
- [382] R. Koynova, B. Tenchov, R. C. MacDonald, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2015**, *1*, 130–138.
- [383] Y. Xu, F. C. Szoka, *Biochemistry* **1996**, *35*, 5616–5623.
- [384] A. Coonrod, F.-Q. Li, M. Horwitz, *Gene Ther.* **1997**, *4*, 1313–1321.
- [385] D. C. Litzinger, L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1113*, 201–227.
- [386] S. D. Patil, D. G. Rhodes, D. J. Burgess, *AAPS J.* **2004**, *6*, 13–22.
- [387] G. M. Cooper, *Cell Mol. Approach 2nd Ed.* **2000**.
- [388] B. S. Cooper, L. A. Hammad, K. L. Montooth, *Funct. Ecol.* **2014**, *28*, 886–894.
- [389] H. Roy, K. Dare, M. Ibba, *Mol. Microbiol.* **2009**, *71*, 547–550.

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Darstellung der (A) Phosphoglycerin-, (B) Sphingo- und (C) Glykolipid Grundgerüste sowie beispielhaft (D) die Struktur des Phospholipids DPPC.	2
Abbildung 1-2: Schematische Übersicht über verschiedene Lipidvesikelsysteme.	5
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung lamellarer Lipidphasen bei verschiedenen Bedingungen in wässrigem Medium.	6
Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der cholesterinhaltigen l_o - und cholesterinarmen l_d -Phasen.	9
Abbildung 2-1: Schematische Darstellung eines endothermen DSC-Thermogramms.	20
Abbildung 2-2: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Messresultate einer PPC.	22
Abbildung 2-3: Schematische Darstellung eines JABLONSKI-Diagramms.	27
Abbildung 2-4: Rotverschiebung eines chromophoren Fluoreszenzspektrums.	28
Abbildung 2-5: Molekülstruktur des verwendeten Fluorophors LAURDAN.	29
Abbildung 2-6: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Fluoreszenzmikroskops.	39
Abbildung 2-7: Molekülschwingung und -Auslenkung aus der Gleichgewichtslage.	42
Abbildung 2-8: Potenzialkurven eines harmonischen und anharmonischen Oszillators.	43
Abbildung 2-9: Schwingungsmodi aliphatischer Ketten.	45
Abbildung 2-10: Schematische Darstellung eines FT-IR-Spektrometers.	46
Abbildung 2-11: Kraft und LENNARD-JONES-Potenzials zwischen AFM-Spitze und Probe.	50
Abbildung 2-12: Darstellung eines Nichtkontakt-AFM.	51
Abbildung 2-13: Schema einer DLS-Messapparatur.	54
Abbildung 2-14: Schematische Darstellung des ζ -Potentials eines negativ geladenen Teilchens.	56
Abbildung 2-15: Schematischer Aufbau einer Filmwaage.	58
Abbildung 2-16: Schematische Darstellung der Bestimmung der kritischen Mizellkonzentration.	58
Abbildung 3-1: Phasenverhalten von 5 KS GUVs unter Druckapplikation bei 45 °C.	61
Abbildung 3-2: Phasenverhalten von 5 KS GUVs unter Druckapplikation bei 40 °C.	62

Abbildung 3-3: Phasenverhalten von 5 KS GUVs unter Druckapplikation und - Absenkung.	63
Abbildung 3-4: DSC-Thermogramme von DPPC mit und ohne HA.	67
Abbildung 3-5: Ermittelte Vor- und Hauptphasenübergangstemperaturen aus der DSC.	68
Abbildung 3-6: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen des Einflusses der HA auf DPPC-Vesikel.	70
Abbildung 3-7: Schematische Darstellung des <i>excluded volume</i> -Effekts.	72
Abbildung 3-8: Stabile homogene und inhomogene Dextran-Netzwerke.	76
Abbildung 3-9: 5 KS GUV-Adsorption an einer Dextran-Schicht nach 24 Stunden.	76
Abbildung 3-10: Glykan-koordinierte Lipidphasenseparation.	78
Abbildung 3-11: Fluoreszenzintensitätsverteilungen des Dextran-Netzwerkes und der l_0 - sowie l_d -Phasen des 5 KS.	78
Abbildung 3-12: Homogene Lipidphasenverteilung des 5 KS auf homogenem Dextran- Netzwerk.	79
Abbildung 3-13: Temperaturabhängiges Phasenverhalten von Lipidschichten des 5 KS auf Dextran-Netzwerken.	80
Abbildung 3-14: Einfluss des zweiphasigen PEG/Dextran-Systems auf GUVs aus dem 5 KS.	84
Abbildung 3-15: Dextran-Verteilung innerhalb ausgewählter GUVs.	85
Abbildung 3-16: Beobachtete Ausstülpungen der l_d -Phase in Dextran-reicher Umgebung.	87
Abbildung 3-17: Schematische Darstellung der Benetzung der intravesikulären Membranseite durch ein ATPS aus Dextran und PEG bestehend.	88
Abbildung 3-18: Chemische Struktur der untersuchten Osmolyte Ectoin, Hydroxyectoin und β -Hydroxybutyrat.	90
Abbildung 3-19: Druck- und temperaturabhängige Untersuchung des Einflusses der Osmolyte auf DPPC-Vesikel.	92
Abbildung 3-20: Fluoreszenzspektroskopisch ermittelte Hauptübergangstemperaturen sowie –Drücke für DPPC unter Einfluss der verschiedenen Osmolyte.	93
Abbildung 3-21: DSC-Thermogramme von DPPC mit den verschiedenen Osmolyten.	94
Abbildung 3-22: PPC-Thermogramme von DPPC mit den verschiedenen Osmolyten.	94
Abbildung 3-23: Chemische Struktur von Mono- und Dirhamnolipiden.	99

Abbildung 3-24: Vereinfachte, schematische Darstellung der enzymatischen Rhamnolipidsynthese aus den Vorstufen Glucose-6-Phosphat und Acyl-CoA.	101
Abbildung 3-25: Schematische Darstellung der geometrischen Form von Mono- und Dirhamnolipiden sowie Phospholipiden, und der induzierten Membrankrümmung.	106
Abbildung 3-26: Chemische Struktur des untersuchten Monorhamnolipids.	110
Abbildung 3-27: Zeitabhängige fluoreszenzspektroskopische Untersuchung.	111
Abbildung 3-28: Temperaturabhängige fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen.	113
Abbildung 3-29: AFM-Messung einer 5 KS-Doppelschicht bei RhaC ₁₀ C ₁₀ -Zugabe.	116
Abbildung 3-30: 3D-Darstellung der AFM-Aufnahme einer 5 KS-Doppelschicht vor und nach RhaC ₁₀ C ₁₀ -Injektion.	118
Abbildung 3-31: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs der 5 KS- <i>raft</i> Lipidmischung vor und nach Injektion einer RhaC ₁₀ C ₁₀ -Lösung.	119
Abbildung 3-32: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs einer anionischen 5 KS- <i>raft</i> Lipidmischung bei RT vor und nach Injektion einer 0,09 mg mL ⁻¹ RhaC ₁₀ C ₁₀ -Lösung (0-130 s).	120
Abbildung 3-33: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs einer 5 KS- <i>raft</i> Lipidmischung vor und nach Injektion einer RhaC ₁₀ C ₁₀ -Lösung.	122
Abbildung 3-34: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs einer 5 KS- <i>raft</i> Lipidmischung vor und nach Injektion einer RhaC ₁₀ C ₁₀ -Lösung.	123
Abbildung 3-35: Schematische Darstellung des Einflusses des RhaC ₁₀ C ₁₀ auf eine heterogene Lipidmembran.	124
Abbildung 3-36: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von GUVs aus DOPC im Minutenbereich nach Injektion einer RhaC ₁₀ C ₁₀ -Lösung.	125
Abbildung 3-37: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen im Sekundenbereich von GUVs aus DOPC nach Injektion einer RhaC ₁₀ C ₁₀ -Lösung.	126
Abbildung 3-38: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen im Minutenbereich von GUVs aus DOPC vor und nach Injektion einer RhaC ₁₀ C ₁₀ -Lösung.	127
Abbildung 3-39: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von DOPE/DPPG (2:1)- GUVs vor und nach Injektion einer RhaC ₁₀ C ₁₀ -Lösung.	129
Abbildung 3-40: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von DOPE/DPPG (2:1)- GUVs vor und nach Injektion einer RhaC ₁₀ C ₁₀ -Lösung.	130

Abbildung 3-41: Chemische Struktur der drei verglichenen Rhamnolipid-Spezies.	132
Abbildung 3-42: DSC-Messungen der drei Rhamnolipide eingebaut in DPPC-MLVs.	133
Abbildung 3-43: Temperaturabhängige fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von DPPC-MLVs mit eingebauten Rhamnolipiden.	135
Abbildung 3-44: Temperaturabhängige <i>GP</i> -Werte für die drei Rhamnolipide eingebaut in ein eukaryotisches und bakterielles Modellmembransystem.	137
Abbildung 3-45: AFM-Messungen der reinen 5 KS-Lipiddoppelschicht vor und nach Injektion 0,09 mg mL ⁻¹ Rhamnolipid-haltiger Lösungen.	140
Abbildung 3-46: AFM-Messungen der reinen 5 KS-Lipiddoppelschicht sowie der Doppelschichten mit 10 mol% eingebauten Rhamnolipiden.	142
Abbildung 3-47: Injektion des HAA zu heterogenen anionischen 5 KS-GUVs.	144
Abbildung 3-48: Detaillierte Darstellung des „Abknospens“ der I _d -Domänen.	145
Abbildung 3-49: Injektion des RhaC ₁₀ C ₁₀ zu heterogenen, anionischen 5 KS-GUVs.	146
Abbildung 3-50: Injektion des RhaRhaC ₁₀ C ₁₀ zu heterogenen anionischen 5 KS-GUVs.	147
Abbildung 3-51: Detaillierte Darstellung des „Abknospens“ und der Bildung zweier Tochtervesikel nach RhaRhaC ₁₀ C ₁₀ -Injektion.	148
Abbildung 3-52: Injektion des RI-Mix zu heterogenen anionischen 5 KS-GUVs.	150
Abbildung 3-53: Detaillierte Darstellung der Bildung zweier Tochtervesikel nach RI-Mix-Injektion.	151
Abbildung 3-54: Auftragung der normierten relativen Veränderungen des Phasenanteils gegen die Zeit nach Injektion der Rhamnolipid-haltigen Lösungen.	152
Abbildung 3-55: Charakterisierung der Morphologie und des Phasenverhaltens von GUVs des reinen 5 KS.	153
Abbildung 3-56: Charakterisierung der Morphologie und des Phasenverhaltens von GUVs des 5 KS/HAA-Systems.	155
Abbildung 3-57: Charakterisierung der Morphologie und des Phasenverhaltens von GUVs des 5 KS/RhaC ₁₀ C ₁₀ -Systems.	156
Abbildung 3-58: Charakterisierung der Morphologie und des Phasenverhaltens von GUVs des 5 KS/RhaRhaC ₁₀ C ₁₀ -Systems.	157
Abbildung 3-59: Dreidimensionale Darstellung der Membranoberflächen vor und nach Injektion der jeweiligen Rhamnolipid-Spezies.	161
Abbildung 3-60: Chemische Struktur der untersuchten Imidazoliumsalze.	165

Abbildung 3-61: Bestimmung der CMC von C ₁₁ IPr.	166
Abbildung 3-62: Normierte konzentrations- und temperaturabhängige FT-IR-Spektren des C ₁₁ IME's und C ₁₁ IPr's in verschiedenen Modellmembransystemen.	168
Abbildung 3-63: Erhaltene DSC-Thermogramme für verschiedene DPPC/C ₁₁ IME- und DPPC/C ₁₁ IPr-Zusammensetzungen.	171
Abbildung 3-64: Auftragung der Vor- (<i>T_p</i>) und Haupt- (<i>T_m</i>) Phasenübergangstemperaturen der DPPC/Imidazoliumsalz-Mischungen gegen die Imidazoliumsalzkonzentration.	172
Abbildung 3-65: Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen verschiedener Konzentrationen des C ₁₁ IME und C ₁₁ IPr in den drei Lipidsystemen.	174
Abbildung 3-66: Zeta-Potenzial-Messungen einer (A) reinen DPPC-Membran und (B) anionischen 5 KS- <i>raft</i> -Mischung vor und nach Zugabe der Imidazoliumsalze.	176
Abbildung 3-67: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von GUVs aus (A) DPPC, (B) DPPC/C ₁₁ IPr (9:1) und (C) DPPC/C ₁₁ IPr (1:1).	177
Abbildung 3-68: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen des thermotropen Phasenverhaltens des reinen 3 KS.	178
Abbildung 3-69: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von GUVs aus dem 3 KS mit und ohne C ₁₁ IME sowie C ₁₁ IPr.	179
Abbildung 3-70: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von GUVs aus DPPC/DOPC/Cholesterin/C ₁₁ IME im Temperaturbereich von 5 – 75 °C.	180
Abbildung 3-71: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von GUVs aus DPPC/DOPC/Cholesterin/C ₁₁ IPr im Temperaturbereich von 5 – 75 °C.	180
Abbildung 3-72: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahme des thermotropen Phasenverhaltens des reinen 5 KS.	181
Abbildung 3-73: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahme des thermotropen Phasenverhaltens des 5 KS mit verschiedenen Konzentrationen an C ₁₁ IME.	182
Abbildung 3-74: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahme des thermotropen Phasenverhaltens des 5 KS mit verschiedenen Konzentrationen an C ₁₁ IPr.	182
Abbildung 3-75: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahme des (A) reinen 5 KS mit verschiedenen Konzentrationen an (B-D) C ₁₁ IME und (E-F) C ₁₁ IPr.	184
Abbildung 3-76: AFM-Aufnahmen des 3KS mit und ohne C ₁₁ IME und C ₁₁ IPr.	185

Abbildung 3-77: 3D-Darstellung des Einflusses von C ₁₁ IMe und C ₁₁ IPr auf eine neutrale 3 KS-Membran.	186
Abbildung 3-78: Schematische Darstellung des Einflusses beider untersuchter Imidazoliumsalze auf Lipidvesikel.	189
Abbildung 3-79: Chemische Struktur des transfektionsfördernden (imidazoliumbasierten) Moleküls (TM) und des Vergleichsmoleküls C ₁₅ IMe·HI.	192
Abbildung 3-80: Auftragung der <i>GP</i> -Werte gegen die Temperatur zur Untersuchung des Einflusses des TMs auf Lipidmodellmembranen.	193
Abbildung 3-81: AFM-Aufnahmen des 5 KS mit und ohne TM.	195
Abbildung 3-82: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von GUVs bestehend aus dem 3 KS mit TM bei 25, 50 und 75 °C.	196
Abbildung 3-83: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen von GUVs bestehend aus dem 5 KS mit TM bei 20 und 65 °C.	197
Abbildung 3-84: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen zum Fusionsverhalten des TM.	199
Abbildung 3-85: Repräsentative Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen zum Fusionsverhalten des C ₁₅ IMe.	201
Abbildung 3-86: Schematische Darstellung des vermuteten Fusionsprozesses induziert durch TM.	203

5.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Verwendete Chemikalien mit Bezugsquellen	15
Tabelle 2-2: Verwendete Messgeräte sowie zugehörige Programme	16
Tabelle 2-3: Mit DSC untersuchte Proben bei denen externe Zusätze zugegeben wurden.	18
Tabelle 2-4: Mit DSC untersuchte Proben bei denen Zusätze in die Membran eingebaut wurden.	18
Tabelle 2-5: Mit PPC durchgeführte Messungen.	21
Tabelle 2-6: Fluoreszenzspektroskopisch temperaturabhängig gemessene Proben mit Zusatz in Pufferlösung bei Atmosphärendruck.	24
Tabelle 2-7: Fluoreszenzspektroskopisch temperaturabhängig gemessene Proben in Pufferlösung bei Atmosphärendruck.	24
Tabelle 2-8: Fluoreszenzspektroskopisch druckabhängig gemessene Proben.	26
Tabelle 2-9: Fluoreszenzspektroskopisch zeitabhängig gemessene Proben bei Umgebungstemperatur und Atmosphärendruck.	26
Tabelle 2-10: Verwendetes Elektroformationsprogramm in Abhängigkeit des Lipidsystems.	33
Tabelle 2-11: Fluoreszenzmikroskopisch gemessene Proben bei verschiedenen Drücken und Temperaturen.	35
Tabelle 2-12: Fluoreszenzmikroskopisch gemessene Proben bei Atmosphärendruck.	36
Tabelle 2-13: Fluoreszenzmikroskopisch gemessene Proben mit injiziertem Substrat in Pufferlösung bei Atmosphärendruck und Umgebungstemperatur (ca. 20 °C).	37
Tabelle 2-14: FT-IR-spektroskopisch vermessene Proben.	40
Tabelle 2-15: Mit AFM gemessene Proben bei Umgebungstemperatur (ca. 20 °C).	48
Tabelle 2-16: Durchgeführte Zeta-Potenzial Messungen.	52
Tabelle 2-17: Durchgeführte CMC-Messungen.	57
Tabelle 3-1: Gemessene Vor- und Hauptübergangstemperatur von DPPC unter verschiedenen Bedingungen und Vergleich mit einem Literaturwert. Die Konzentration der HA betrug in jeder Messung 5 mg mL ⁻¹ .	69
Tabelle 3-2: Aus den PPC-Kurven bestimmte, thermische Expansionskoeffizienten α für DPPC in Ab- und Anwesenheit von 1 M Ectoin, 1 M Hydroxyectoin und 1 M β -	

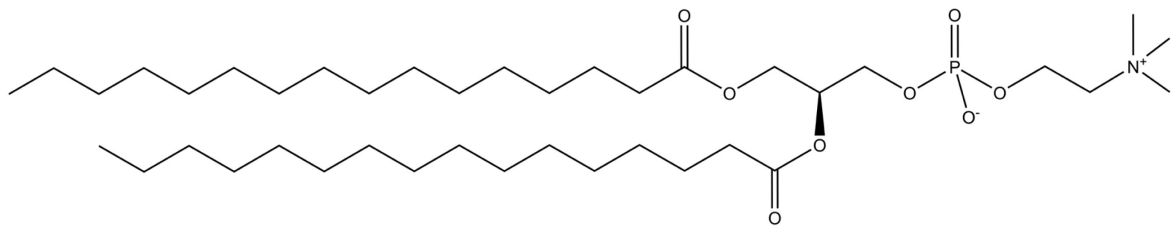
Hydroxybutyrat bei 29 und 45 °C sowie die ermittelten Vor- und Hauptübergangstemperaturen.	95
Tabelle 3-3: DSC- und PPC- basierte thermodynamische Parameter der Vor- und Hauptübergänge von DPPC in Ab- und Anwesenheit von 1 M Ectoin, 1 M Hydroxyectoin und 1 M β -Hydroxybutyrat sowie ein Vergleich der Hauptübergangstemperatur mit den fluoreszenzspektroskopischen Daten.	96
Tabelle 3-4: Auswertung der AFM-Messungen nach Zugabe einer 0,09 mg mL ⁻¹ RhaC ₁₀ C ₁₀ -haltigen Lösung zu anionischen 5 KS-Lipidmembranen.	117
Tabelle 3-5: Mittels AFM erhaltene, gemittelte Höhenunterschiede zwischen der l _o - und l _d -Phase vor und nach Injektion der 0,09 mg ml ⁻¹ konzentrierten Rhamnolipid-haltigen Lösungen zu einer 5 KS-Doppelschicht.	141
Tabelle 3-6: Mittels AFM erhaltene, gemittelte Höhenunterschiede zwischen der l _o - und l _d -Phase der 5 KS-Membran ohne und mit 10 mol% eingebautem HAA, RhaC ₁₀ C ₁₀ , RhaRhaC ₁₀ C ₁₀ bei RT. Aufgrund der induzierten Krümmung sind zwei Werte für das Monorhamnolipid angegeben.	142
Tabelle 3-7: Vergleich der literaturbekannten CMC-Werte von C ₁₁ IMe und C ₁₁ IBn mit dem ermittelten Wert des C ₁₁ IPr.	166
Tabelle 3-8: Aus den FT-IR-Spektren ermittelte Hauptphasenübergangstemperaturen, T_m , von C ₁₁ IMe und C ₁₁ IPr in einer DPPC-Membran.	169
Tabelle 3-9: Fluoreszenzspektroskopisch bestimmte Hauptphasenübergangstemperaturen von DPPC mit und ohne C ₁₁ IMe und C ₁₁ IME.	175

5.4 Weitere Abbildungen**5.4.1 Strukturformeln verwendeter Substanzen**

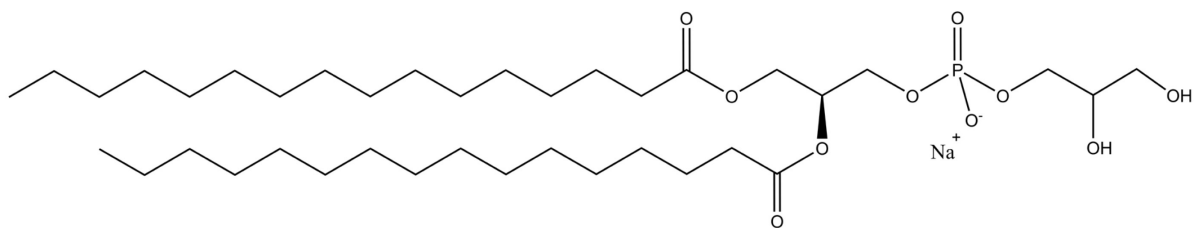
In diesem Kapitel werden die chemischen Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen gezeigt, welche bisher noch nicht im Text dargestellt worden sind.

Lipide

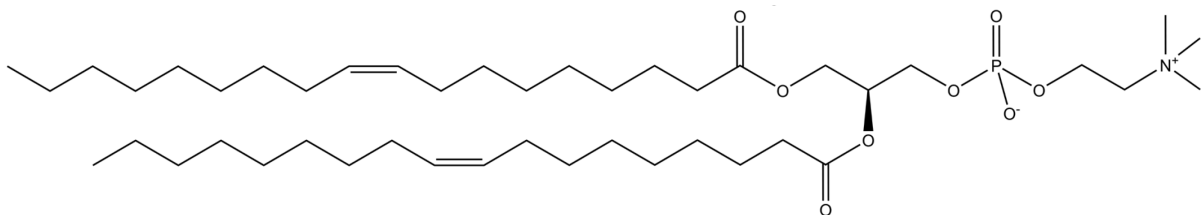
DPPC:



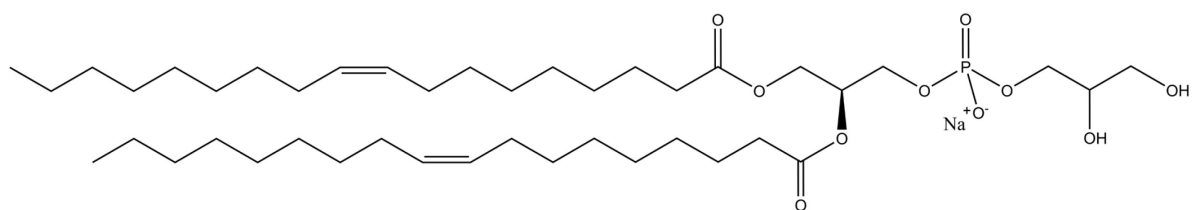
DPPG:



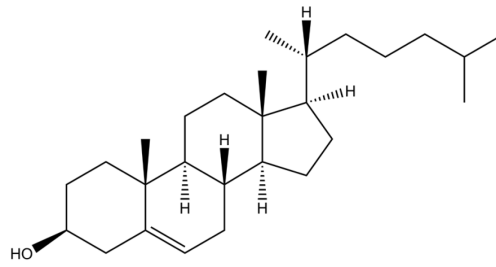
DOPC:



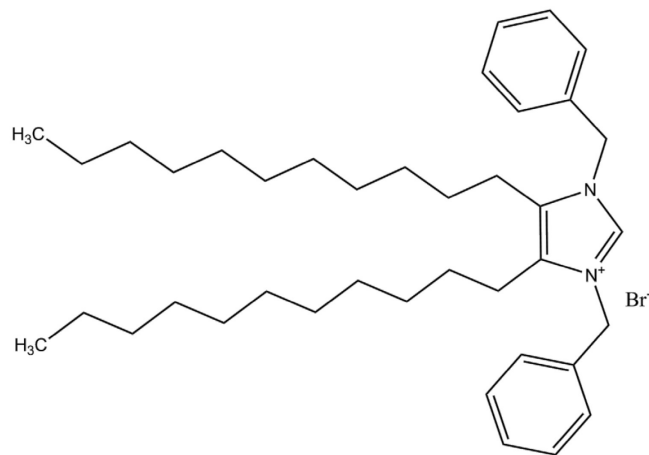
DOPG:



Cholesterin:

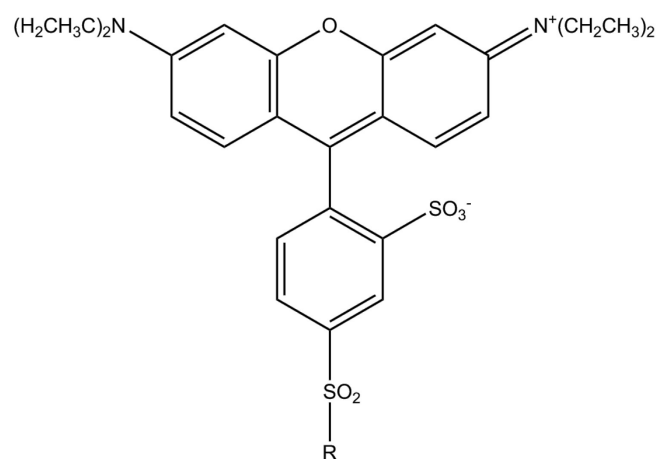


$C_{11}IBn \cdot HBr$ (1,3-dibenzyl-4,5-diundecylimidazoliumbromid):



Fluorophore

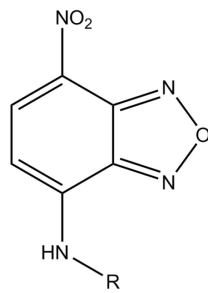
N-Rhodamin (*N*-(Lissamin rhodamin B sulfonyl)-R):



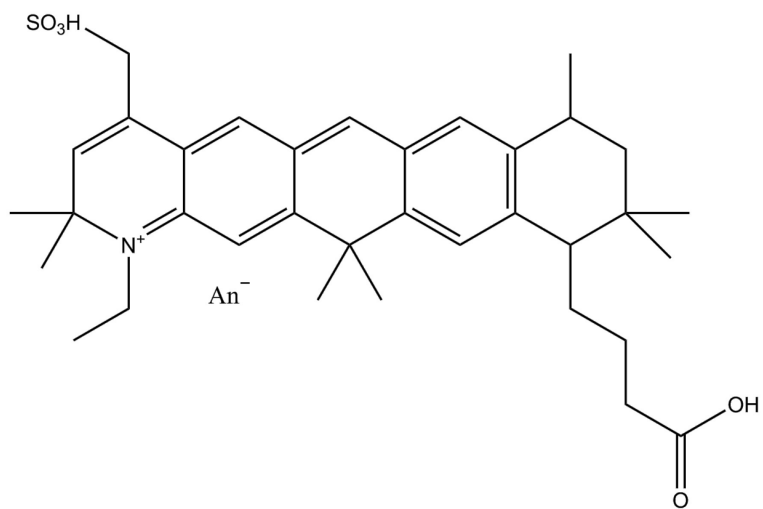
5 Anhang

5.4 Weitere Abbildungen

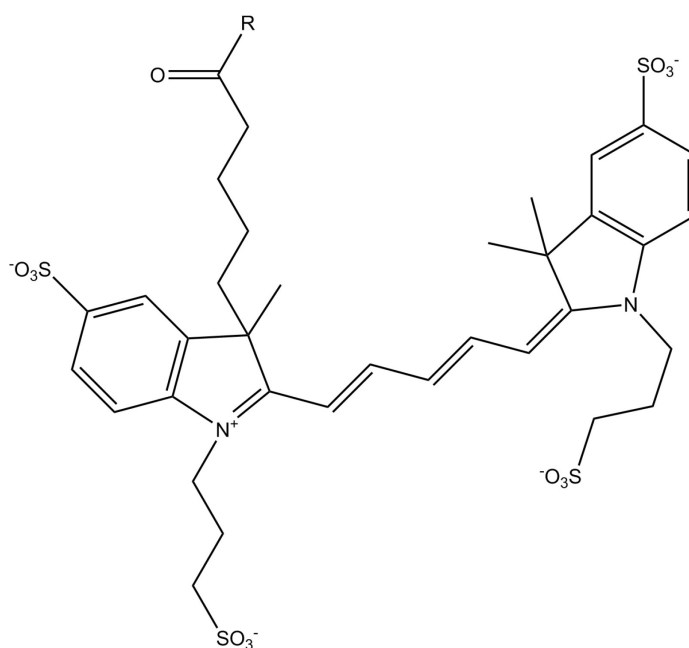
NBD-R (*N*-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)-R):



ATTO 647:

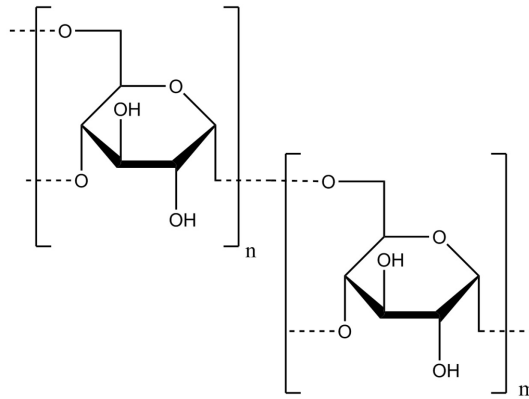


ALEXA™ 647 -R:



Polymere

Dextran:



Polyethylenglykol:

