

LIPID-MODELLMEMBRANEN UNTER DEM EINFLUSS HOCHVA-
LENTER KATIONEN, LIPIDIERTER IMIDAZOLIUMSALZE UND
ZWEI-PHASEN-SYSTEMEN.

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

(DR. RER. NAT.)

eingereicht bei der

Technischen Universität Dortmund

Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

vorgelegt von

STEFFEN BORNEMANN

Geboren am 08.06.1991 in Meschede

März 2020

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2016 bis März 2020 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I (Biophysikalische Chemie) der Technischen Universität Dortmund unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Roland Winter angefertigt.

Eingereicht am: 02.03.2020

Datum der Disputation: 21.04.2020

Prüfungskommission:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Daniel Rauh
Chemische Biologie, CCB, TU Dortmund

Erstgutachter: Prof. Dr. Roland Winter
Physikalische Chemie, CCB, TU Dortmund

Zweitgutachter: Prof. Dr. Stefan Kast
Physikalische Chemie, CCB, TU Dortmund

*"We're privileged to be alive, and we should
make the most of our time on this world"*

Prof. Richard Dawkins

DANKSAGUNGEN

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die durch ihre Unterstützung jedweder Art zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

In erster Instanz gilt mein Dank in besonderer Weise Herrn **Prof. Dr. Roland Winter** für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Möglichkeit, diese Arbeit zu verfassen, die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit sowie die jederzeit hilfreiche Diskussionsbereitschaft. Durch zahlreiche Gespräche und Besprechungen konnte er mich immer wieder aufs Neue dazu motivieren, weitere Aspekte des weitläufigen Themenfeldes zu beleuchten.

Weiteren Dank möchte ich **Herrn Prof. Dr. Kast** für die Übernahme des Koreferates dieser Arbeit aussprechen.

Weiterhin danke ich Herrn **Prof. Dr. Glorius** von der WWU Münster für das spannende und innovative Forschungsthema, an welchem ich im Zuge der Kollaboration mit der WWU mitarbeiten durfte.

Für die gute Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit danke ich **allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls** für Physikalische Chemie I der TU Dortmund, sowie den Kolleginnen und Kollegen aus den weiteren PC Lehrstühlen. Meinem Bürokollegen **Marius Herzog** sowie **Jim Knop, Michel Jaworek, Loana Arns** und **Dr. Irena Kiesel** danke ich für die zahlreichen Denkanstöße und Diskussionen fachlicher, sowie außerfachlicher Natur.

Ein besonderer Dank gilt **Andrea Jeworrek, Simone Möbitz** sowie **Bertina Schuppan** für die zahlreichen unerlässlichen Hilfestellungen, sowohl bei allerlei bürokratischen Fragestellungen als auch bei Laborarbeiten und Problemen jeder Art.

Des Weiteren bedanke ich mich bei **allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der mechanischen sowie elektronischen Werkstätten**. Ohne diese Zusammenarbeit wären viele Aspekte dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Zu guter Letzt gilt mein weitreichendster Dank den Menschen, die mir am meisten bedeuten.

Für die Unterstützung, den Rückhalt sowie die Geduld auf meinem Weg danke ich in ganz besonderer Weise meiner wunderbaren Partnerin **Dalina Reinemann**. Danke, dass du in freudigen, aber besonders auch in fordernden Phasen während meiner Promotionszeit immer an meiner Seite standest, mich jederzeit unterstützt und ermutigt hast und immer für mich da warst, wenn ich Dich brauchte.

Besonderer Dank gilt außerdem meiner **gesamten Familie**, die mich stets unterstützt und ermutigt hat, die Schritte zu gehen, welche ich gegangen bin.

Hierbei möchte ich meinen größten Dank **meinen Eltern** gegenüber zum Ausdruck bringen. Durch eure uneingeschränkte Unterstützung jeglicher Art auf meinem gesamten bisherigen Lebensweg wurde mir dieser erst ermöglicht, weswegen ich euch zum Dank diese Arbeit widmen möchte.

PUBLIKATIONEN

Im Zuge der Promotion wurden Forschungsergebnisse wie folgt publiziert:

S. Bornemann, M. Herzog und R. Winter, Impact of Y^{3+} -Ions on the Structure and Phase behavior of Phospholipid Model Membranes, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2019**, *21*, 5730-5743

S. Bornemann, M. Herzog ^a, L. Roling, T. O. Paulisch, D. Brandis, S. Kriegler, H.-J. Gal-
la, F. Glorius, R. Winter, Interaction of Imidazolium based Lipids with Phospholipid Bi-
layer Membranes of Different Complexity, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2020**, *Accepted
Manuscript*.

M. Manisegaran, S. Bornemann, I. Kiesel, R. Winter, Effects of the Deep-Sea Osmolyte
TMAO on the Temperature and Pressure dependent Structure and Phase behavior of Li-
pid Membranes, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2019**, *21*, 18533-18540 ^b

a geteilte Erstautorenschaft.

b nicht Teil der vorliegenden Arbeit.

KONFERENZBEITRÄGE & AUSZEICHNUNGEN

Im Zuge der Promotion wurden Forschungsergebnisse wie folgt präsentiert:

09.02.2018	Forschungsposter ^a	11. Tag der Chemie	TU Dortmund
08.02.2019	Forschungsposter ^b	12. Tag der Chemie	TU Dortmund
08.02.2019	Vortrag ^a	12. Tag der Chemie	TU Dortmund
30.09.2019	Forschungsposter ^c	Solvation Science meets High Pressure Bioscience	RESOLV / 10 th IMBP / FOR 1979
07.02.2020	Forschungsposter ^a	13. Tag der Chemie	TU Dortmund
07.02.2020	Forschungsposter ^c	13. Tag der Chemie	TU Dortmund

a Alleinverantwortlich für die Präsentation.

b Präsentation des gemeinsamen Forschungsthemas durch M. Herzog.

c Präsentation von Forschungsergebnissen als Co-Autor.

Im Zuge der Promotion wurden folgende Auszeichnungen verliehen:

09.02.2018	Posterpreis 1. Platz	11. Tag der Chemie	TU Dortmund
08.02.2019	Vortragspreis	12. Tag der Chemie	TU Dortmund

KURZFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Forschungsprojekte vorgestellt, in welchen verschiedene biophysikalische Einflüsse auf Lipidmembranen untersucht wurden. Die Studien werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Trivalente Yttrium-Kationen sind dazu in der Lage, in einigen relevanten biochemischen Vorgängen das Verhalten von Ca^{2+} -Ionen zu imitieren, weswegen die Zahl der Anwendungen dieses Ions in der medizinischen Chemie in den vergangenen Jahren stetig stieg. Hier untersuchten wir die Einflüsse von Y^{3+} -Ionen auf die Struktur sowie das Phasenverhalten und spezifische thermodynamische Parameter von Modellmembransystemen verschiedener Komplexität und Ladung für eine breite Verteilung von Salzkonzentrationen, Temperaturen und Drücken. Die Untersuchungen zeigen, dass Y^{3+} -Ionen tief in die Kopfgruppenregion der Lipiddoppelschicht eindringen und dort voraussichtlich an die Phosphatgruppen der Lipide koordinieren. Dies resultiert in einer dichteren Lipidpackung und partieller Dehydratation der Kopfgruppenregion. Steigende Y^{3+} -Ionenkonzentration führt zu einem ausgeprägten Anstieg der Gel-zu-flüssig Phasenübergangstemperatur der Lipidmembranen, was auf einen gesteigerten lateralen Kompressionsdruck in der Membran zurückzuführen ist. Dieser Effekt ist im Falle der anionischen Membranen besonders ausgeprägt. Aufgrund von Lipidsortierungsprozessen wird eine erhöhte Ordnung der Lipidketten als Reaktion auf das Einbringen des trivalenten Ions gefördert. Der flüssig-zu-Gel Phasenübergangsdruck sinkt signifikant mit steigender Ionenkonzentration, am deutlichsten im Falle der anionischen Membranen. Bemerkenswerterweise stellt sich der durch das Y^{3+} -induzierte, Lipidketten ordnende Effekt deutlich ausgeprägter dar als dies durch eine Erhöhung des hydrostatischen Druckes auf die Membran zu beobachten ist.

In einer weiteren Studie stand der Einfluss lipidierter Imidazoliumsalze auf die Struktur und das Phasenverhalten von Lipidmembranen, wie auch die Untersuchung des Fusionsinduktionspotentials dieser Moleküle im Fokus. Wir untersuchten die Membraninteraktionen von $\text{C}_{11}\text{IPr}\cdot\text{HBr}$ (1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)-4,5-diundecyl-1H-imidazol-3-iumbromid) auf die biophysikalischen Eigenschaften verschieden komplexer Membran-

systeme bei unterschiedlichen Konzentrationen. Die Einflüsse dieses Moleküls wurden mit denen des zum Teil bereits bekannten 1,3-dimethyl-4,5-diundecyl-1H-imidazol-3-iumiodids ($C_{11}IMe\cdot HI$) verglichen. Hierbei wurden signifikante Verringerungen der thermotropen Phasenübergangstemperatur der Membranen und starke Störungen der Lipid-Konformationsordnung sowie in der lateralen Membranordnung nachgewiesen. Ergänzend konnten als Reaktion auf den Einbau der Salze durch mikroskopische Methoden die Änderungen der lateralen Organisation der Membran und der Vesikelmorphologie bestätigt werden. Weitergehend wurde der Einfluss eines weiteren, speziell zur Fusionsinduktion konstruierten lipidbasierten Imidazoliumsalzes bei verschiedenen Konzentrationen in Membranen verschiedener Komplexität untersucht. Hier wurden zur ersten Teilstudie vergleichbare Einflüsse auf das thermotrope Phasenverhalten der Membranen, jedoch geringere störende Effekte auf die laterale Membranordnung nachgewiesen. Ergänzende AFM- sowie konfokale Fluoreszenzmikroskopieuntersuchungen bestätigten Veränderungen in der lateralen Organisation, dem Höhenprofil der Lipiddoppelschicht sowie der Membranmorphologie. Darüber hinaus konnte unter Verwendung eines speziellen Lipid-Trägersystems für dieses Salz durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen ein bestehendes Fusionspotential dieser Molekülklasse nachgewiesen werden.

Als weiterer Einflussfaktor auf biophysikalische Eigenschaften von Biomembranen wurde im Rahmen dieser Arbeit die in natürlichen Zellen vorliegende, makromolekulare Verdichtung, wie auch der Druck betrachtet. Hierzu kann eine makromolekular verdichtete Umgebung zu einem gewissen Grad durch das wässrige Zwei-Phasen-System PEG/Dextran nachgeahmt werden. Zunächst wurde eine Charakterisierung des barotropen Phasenverhaltens einer unbeeinflussten, anionischen *raft*-Membran mittels Hochdruck-Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Dieser Charakterisierung folgend wurde das thermotrope Phasenverhalten des Systems nach Präparation der Vesikel in 11,5/8 w% PEG/Dextran untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Separation des Zwei-Phasen-Systems innerhalb des Vesikels zunächst zur intravesikulären Membranbenetzung und im späteren Verlauf in Abhängigkeit der Umgebung des Vesikels zu Ausstülpungen der I_d -Domänen der Membran führt. Hierdurch wird die flüssig-flüssig Grenzflächenenergie des Zwei-Phasen-Systems reduziert und es verbleibt ein energetisch günstigerer, quasiphärischer Vesikelhauptkörper. Für zukünftige Untersuchungen steht der Einfluss des hydrostatischen Druckes als physiko-chemischer Parameter zur Beeinflussung dieses Separationsprozesses der Membran im Fokus.

ABSTRACT

This work presents different research projects, studying the impacts of different biophysical factors on model membranes. These studies shall be shortly presented below.

Trivalent yttrium cations are able to mimic the behavior of Ca^{2+} in many important biochemical processes, and their application in medicinal chemistry has increased in recent years. Here, we studied the effect of Y^{3+} -Ions on the structure, phase behavior and thermodynamic parameters of model biomembrane systems of different complexity and charge, covering a wide range of salt concentrations, temperature and pressure. Y^{3+} ions penetrate deep into the lipid headgroup region and are presumably coordinated to the phosphate groups, resulting in a stronger lipid packing and partial dehydration of the headgroup region. Increasing Y^{3+} concentration leads to a pronounced increase of the gel-to-fluid phase transition temperature of the phospholipid bilayers, owing to an increased lateral compression pressure, particularly for anionic lipid membranes. Increased lipid chain order and phase segregation of anionic membranes is fostered at high salt concentrations owing to lipid sorting. The fluid-to-gel phase transition pressure decreases significantly with the concentration of the trivalent ion, most pronounced for the negatively charged lipid vesicles. Remarkably, the Y^{3+} -induced ordering effect is much stronger than a hydrostatic pressure-induced ordering of the lipid chains.

In a further study, the impact of membrane internal cationic components has been studied in order to affect the structure and phase behavior of the arising vesicles as well as to create potentially cationic liposomes for vesicle fusion and transfection purposes. To this end, cationic dialkylated imidazolium salts were synthesized to be inserted into the membrane. We examined the interactions of a newly synthesized 1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)-4,5-diundecyl-1H-imidazol-3-ium bromide ($\text{C}_{11}\text{IPr}\cdot\text{HBr}$) compound on the structure and physical-chemical properties of various model biomembrane systems of different complexity. We compared the results obtained with those for the smaller headgroup variant 1,3-dimethyl-4,5-diundecyl-1H-imidazol-3-ium iodide ($\text{C}_{11}\text{IMe}\cdot\text{HI}$).

We revealed distinct changes in lipid thermotropic phase behavior, lipid conformational order and lateral membrane organization as well as in the lateral organization, lipid bilayer height profile and membrane morphology. Further, we studied the impact of a novel lipid-based imidazolium salt, synthesized for the induction of vesicle fusion, at different concentrations on biomembrane systems of different complexity. We could reveal changes in lipid thermotropic phase behavior that are comparable to the former imidazolium salts, but less disturbing effects on the lipid conformational order of the membrane. Complementary AFM and confocal fluorescence microscopy measurements allowed us to disclose changes in the lateral organization, lipid bilayer height profile and membrane morphology upon incorporation of the lipidated imidazolium salt. Using of a specifically assembled lipid cargo system, we were able to show that the class of cationic imidazolium based lipids generally leads to pronounced vesicle fusion with an anionic target membrane.

Further impact on the biophysical properties of biomembranes results from intravesicular, macromolecular crowding in combination with high hydrostatic pressures. To a certain degree, this crowded environment can be mimicked by an aqueous-two-phase-system consisting of PEG and dextran. In a first step, we characterized the barotropic phase-separation behavior of an anionic *raft*-membrane via high-pressure fluorescence microscopy. In a follow-up study, we studied the thermotropic phase transition behavior of the five-component-system in a PEG/Dextran aqueous two-phase-system (ATPS), focusing primarily on the structural behavior of the vesicles after separation of the ATPS. We showed that the separation of the PEG/Dextran-system leads to intravesicular membrane wetting and lipid sorting, resulting in further budding of these segregated areas in the right environment. This occurs to reduce the fluid-fluid interfacial energy of the separated aqueous-two-phase-system and the excess area of the membrane. The budded areas mainly consist of liquid disordered membrane compartments, leaving a quasi-spherical, liquid ordered vesicular structure. Future investigations will focus on the effect of high hydrostatic pressures to impact the membrane separation process and thus, possibly, morphological changes of the vesicles.

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNGEN	VII
PUBLIKATIONEN.....	IX
KONFERENZBEITRÄGE & AUSZEICHNUNGEN	XI
KURZFASSUNG	XIII
ABSTRACT	XV
INHALTSVERZEICHNIS	XIX
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	XXIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	XXVII
TABELLENVERZEICHNIS	XXXI
VARIABLEN UND NATURKONSTANTEN	XXXIII
2 EINLEITUNG.....	1
Vorwort	1
2.1 Plasmamembranen	2
2.1.2 Lipide in der Zellmembran	3
2.1.3 Phasenverhalten von Lipidmembranen.....	6
2.1.4 Lipid-rafts	9
2.2 Lipofektion.....	11
2.3 PEG/Dextran Zwei-Phasen-System	13
3 METHODEN.....	15
3.1 FOURIER-Transformations-Infrarot (FT-IR)-Spektroskopie.....	15
3.1.1 Molekülschwingungen.....	15
3.1.2 Messtechnik	20
3.2 Dynamische Differenzkalorimetrie	23

3.3	Fluoreszenzspektroskopie	26
3.3.1	Fluoreszenz	27
3.3.2	Laurdan Spektroskopie	29
3.4	Fluoreszenzmikroskopie.....	32
3.4.1	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	32
3.4.2	Hochdruck-Fluoreszenzmikroskopie	35
3.5	Dynamische Lichtstreuung.....	36
3.5.1	Partikelgröße	38
3.5.2	Zeta-Potential	40
3.6	Rasterkraftmikroskopie	42
3.7	Filmwaagenmessung	47
4	ZIELSETZUNG.....	51
	Vorstellung der Projekte.....	51
5	EINFLUSS VON Y^{3+} AUF MODELLMEMBRANEN.....	55
5.1	Einleitung	55
5.2	Material und Methoden	58
5.2.1	Material	58
5.2.2	Präparation der Lipidvesikel	58
5.2.3	FT-IR-Spektroskopie	59
5.2.4	Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC)	60
5.2.5	Fluoreszenzspektroskopie (FS).....	60
5.2.6	Fluoreszenzmikroskopie (FM).....	62
5.2.7	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	63
5.2.8	Rasterkraftmikroskopie (AFM)	64
5.3	Ergebnisse und Diskussion.....	64
5.3.1	FT-IR-Spektroskopie	64
5.3.2	Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC)	68

5.3.3	Fluoreszenzspektroskopie (FS).....	70
5.3.4	Zeta-Potential und Partikelgröße durch dynamische Lichtstreuung (DLS).....	74
5.3.5	Fluoreszenzmikroskopie (FM).....	77
5.3.6	Rasterkraftmikroskopie (AFM)	79
5.4	Zusammenfassung	82
6	MEMBRAN-INTERAKTIONEN UND TRANSFEKTIONSVERMÖGEN IMIDAZOLIUMBASIERTER LIPIDE.....	87
6.1	Einleitung	87
6.2	Material und Methoden	90
6.2.1	Material	90
6.2.2	Lipidartige Imidazoliumsalzderivate	90
6.2.3	Präparation der Lipidvesikel	92
6.2.4	FT-IR-Spektroskopie	92
6.2.5	Wärmestromdifferenzkalorimetrie.....	93
6.2.6	Fluoreszenzspektroskopie	93
6.2.7	Fluoreszenzmikroskopie	94
6.2.8	Dynamische Lichtstreuung	96
6.2.9	Rasterkraftmikroskopie.....	96
6.2.10	Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration	97
6.3	Ergebnisse und Diskussion.....	97
6.3.1	FT-IR-Spektroskopie	97
6.3.2	Wärmestromdifferenzkalorimetrie.....	101
6.3.3	Fluoreszenzspektroskopie	104
6.3.4	Zeta-Potential Messungen durch DLS	108
6.3.5	Kritische Mizellbildungskonzentration C ₁₁ IPr	110
6.3.6	Fluoreszenzmikroskopie an C ₁₁ IME & C ₁₁ IPr in Membranen.....	111
6.3.7	Fluoreszenzmikroskopie Transfektionsmolekül (TM)	119

6.3.8	Rasterkraftmikroskopie C ₁₁ IMe, C ₁₁ IPr, TM.....	125
6.4	Zusammenfassung.....	128
7	EINFLUSS DES WÄSSRIGEN ZWEI-PHASEN-SYSTEMS PEG/DEXTRAN AUF MODELLMEMBRANEN.....	133
7.1	Einleitung.....	133
7.2	Material und Methoden.....	135
7.2.1	Material.....	135
7.2.2	Präparation der Proben.....	136
7.2.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	137
7.3	Ergebnisse und Diskussion.....	138
7.3.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	138
7.4	Zusammenfassung.....	148
8	FAZIT.....	151
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	A
10	ANHANG.....	I
10.1	Weitere Abbildungen.....	I
	Eidesstattliche Versicherung (Affidavit).....	O

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AFM	Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy)
C ₁₁ IBn (·HBr)	(1,3-dibenzyl-4,5-di-undecylimidazoliumbromide)
C ₁₁ IMe (·HI)	1,3-dimethyl-4,5-diundecyl-1H-imidazol-3-iumiodid
C ₁₁ IPr (·HBr)	3-bis(2,6-diisopropylphenyl)-4,5-diundecyl-1H-imidazol-3-iumbromid
C ₁₅ IMe (·HI)	1,3-dimethyl-4,5-dipentadecylimidazoliumiodid
C ₁₅ IBn (·HBr)	1,3-dibenzyl-4,5-di-undecylimidazoliumbromid
CCD	Ladungsgekoppeltes Bauteil (charged coupled device), Kamerasensor
Chol.	Cholesterin
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration (von engl. critical micelle concentration)
DLS	Dynamische Lichtstreuung (dynamic light scattering)
DOPC	Dioleoylphosphatidylcholin
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin
DOPG	Dioleoylphosphatidylglycerol
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycerol
DPPS	Dipalmitolyphosphatidylserin
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie (von engl. differential scanning calorimetry)

engl.	englisch
FS	Fluoreszenzspektroskopie
FT-IR	FOURIER-Transformations-Infrarot
gew. %	Gewichtsprozent
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (von engl. green fluorescent protein)
GUV	Riesige unilamellare Vesikel (giant unilamellar vesicles)
HBS	HEPES buffered saline
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IR	Infrarot
ITO	Indium-Zinn-Oxid (von engl. indium tinn oxide)
l _d	flüssig ungeordnet (liquid-disordered)
l _o	flüssig geordnet (liquid-ordered)
MLV	Multilamellare Vesikel
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NBD-DHPE	Nitrobenzoxadiazol-Dihexadecanolyphosphatidylethanolamin
NHC	<i>N</i> -heterocyclische Carbene
<i>N</i> -Rh-DHPE	Rhodamin-Dihexadecanolyphosphatidylethanolamin
PEG	Polyethylenglycol
PVA	Polyvinylalkohol
SBA	Soy Bean Agglutinin (glycin max lectin)
SBM	Gestützte Membrandoppelschicht (supported-bilayer-membrane)
s _o	fest geordnet (solid-ordered)

TM	Transfektionsmolekül, 1,3-Dimethyl-4,5-dipentadecyl-2-(5-(trimethylammonio)pentyl)imidazoliumiodid
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2-1: Strukturen der verwendeten Lipide und Steroide	4
Abb. 2-2: Variationen der Lipiddoppelschichten.....	6
Abb. 2-3: Phasenzustände lamellarer Lipidmembranen in wässriger Lösung.....	8
Abb. 2-4: Fluoreszenzmikroskopiebilder Lipiddomänen / <i>rafts</i>	10
Abb. 3-1: Schematische Darstellung Potentialkurven	18
Abb. 3-2: Schwingungsmoden.....	20
Abb. 3-3: Schematischer Aufbau FT-IR-Spektrometer	21
Abb. 3-4: Schematische Darstellung DSC-Kurve	25
Abb. 3-5: Schematische Darstellung DSC-Ofen	26
Abb. 3-6: JABLONSKI-Diagramm Fluoreszenz.....	27
Abb. 3-7: Schematische Darstellung Laurdan-Fluoreszenzspektroskopie	30
Abb. 3-8: Schematische Darstellung Fluoreszenzmikroskopie	34
Abb. 3-9: Schematische Darstellung DLS	37
Abb. 3-10: Schematische Darstellung Zeta-Potential	41
Abb. 3-11: Interpretation planarer AFM-Aufnahmen	43
Abb. 3-12: Schematische Darstellung AFM.....	44
Abb. 3-13: Schematische Darstellung Potentialverlauf verschiedener AFM-Modi	45
Abb. 3-14: Aufbau einer Filmwaage zur Messung des Spreitungsdruckes	48
Abb. 3-15: Schematische Darstellung Lipidisotheime sowie kritische Mizellbildungskonzentration	49
Abb. 5-1: FT-IR-Daten der CH ₂ -Schwingungen in Abhängigkeit der Y ³⁺ -Konzentration	65
Abb. 5-2: FT-IR-Auswertung der Lipidhydratation als Funktion der Y ³⁺ -Konzentration	67
Abb. 5-3: DSC-Thermogramme in Abhängigkeit der Y ³⁺ -Konzentration	69
Abb. 5-4: Temperaturabhängige Fluoreszenzspektroskopie bei steigender Y ³⁺ - Konzentration.....	71
Abb. 5-5: Druckabhängige Fluoreszenzspektroskopie bei steigender Y ³⁺ -Konzentration	73
Abb. 5-6: Zeta-Potentiale und Partikelgrößen in Abhängigkeit der Y ³⁺ -Konzentration ...	75

Abb. 5-7: Fluoreszenzmikroskopie der Fünf-KS-Vesikel bei steigender Y^{3+} -Konzentration.....	78
Abb. 5-8: Fluoreszenzmikroskopie: Osmotischer Stress durch Y^{3+} -Ionen.....	79
Abb. 5-9 AFM-Bilder der Fünf-KS-Membran bei verschiedenen Y^{3+} -Konzentrationen..	81
Abb. 5-10 Schematische Darstellung der Y^{3+} -Lipid-Komplexierung	84
Abb. 6-1: Lipidartige Imidazoliumsalzderivate	91
Abb. 6-2: Temperaturabhängige FT-IR-Daten von $C_{11}IMe$ und $C_{11}IPr$ in Modellmembranen	100
Abb. 6-3: DSC-Daten der Abnahme der T_m von DPPC durch $C_{11}IMe$ und $C_{11}IPr$	102
Abb. 6-4: DSC Thermogramme DPPC: $C_{11}IMe$, DPPC: $C_{11}IPr$	103
Abb. 6-5: Fluoreszenzspektroskopie der Imidazoliumsalze und des TM in den Membranen	106
Abb. 6-6: Zeta-Potentiale von $C_{11}IMe$ & $C_{11}IPr$ in DPPC und <i>raft</i> -Membran.....	108
Abb. 6-7: CMC-Bestimmung von $C_{11}IPr$	110
Abb. 6-8: Fluoreszenzmikroskopie: $C_{11}IPr$ in DPPC-Membranen.....	112
Abb. 6-9: Thermotropes Phasenverhalten des neutralen Drei-Komponenten-Systems...	113
Abb. 6-10: Fluoreszenzmikroskopie: $C_{11}IMe$ & $C_{11}IPr$ im neutralen Drei-Komponenten-System.....	114
Abb. 6-11: Temperaturabhängigkeit: Neutrales Drei-Komponenten-System mit $C_{11}IMe$	115
Abb. 6-12: Temperaturabhängigkeit: Neutrales Drei-Komponenten-System mit $C_{11}IPr$	116
Abb. 6-13: Fluoreszenzmikroskopie: $C_{11}IMe$ & $C_{11}IPr$ im anionischen Fünf-Komponenten-System.....	117
Abb. 6-14: Temperaturabhängigkeit des anionischen Fünf-Komponenten-Systems mit $C_{11}IMe$	118
Abb. 6-15: Temperaturabhängigkeit des anionischen Fünf-Komponenten-System mit $C_{11}IPr$	119
Abb. 6-16: Fluoreszenzmikroskopie: TM in Drei-Komponenten-Membran.....	120
Abb. 6-17: Fluoreszenzmikroskopie: TM in der Fünf-Komponenten-Membran (Schematische Darstellung)	122
Abb. 6-18: Fluoreszenzmikroskopie: Fusionsassay TM.....	123
Abb. 6-19: Fluoreszenzmikroskopie: Fusionsassay $C_{15}IMe$	124

Abb. 6-20: AFM Aufnahmen: C ₁₁ IMe, C ₁₁ IPr in der neutralen Drei-Komponenten-Membran	126
Abb. 6-21: AFM Aufnahmen: TM in der anionischen Fünf-Komponenten-Membran...	128
Abb. 6-22: Schematische Darstellung der Resultate der Fusionsexperimente	132
Abb. 7-1: Schematische Darstellung der barotropen Phasenseparation im 5KS	139
Abb. 7-2: Druckabhängiges Phasenverhalten des 5KS bei $T = 40\text{ °C}$	141
Abb. 7-3: Druckabhängiges Phasenverhalten des 5KS bei $T = 45\text{ °C}$	142
Abb. 7-4: Effekte der PEG/Dextran-Phasenseparation in 5KS Vesikeln in dextranreicher Umgebung	143
Abb. 7-5: Effekte der PEG/Dextran-Phasenseparation in 5KS Vesikeln in dextranarmer Umgebung	144
Abb. 7-6: PEG/Dextran-Verteilung innerhalb separierter Vesikel	147
Abb. 7-7: Ausknospung der fluiden Phasen als Resultat der Phasenseparation	148
Abb. 10-1: Struktur des verwendeten Fluorophors <i>Laurdan</i>	I
Abb. 10-2: Struktur des verwendeten Fluorophors <i>Rhodamin</i>	I
Abb. 10-3: Struktur des verwendeten Fluorophors <i>NBD</i>	J
Abb. 10-4: Struktur des verwendeten Fluorophors <i>Atto 647</i>	J
Abb. 10-5: Struktur des C ₁₁ IBn·HBr	K
Abb. 10-6: Barotropes Phasenverhalten des 5KS bei $T = 40\text{ °C}$ Beispiel B)	L
Abb. 10-7: Barotropes Phasenverhalten des 5KS bei $T = 45\text{ °C}$ Beispiel B)	L

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 5-1: Chemikalien YCl ₃ Studie	58
Tab. 6-1: Chemikalien Imidazoliumsalzstudie	90
Tab. 6-2: T_m : C ₁₁ IMe und C ₁₁ IPr in DPPC-Membranen	98
Tab. 6-3: T_m der DPPC Membran mit und ohne C ₁₁ IMe/C ₁₁ IPr durch Fluoreszenzspektroskopie	107
Tab. 6-4: CMC-Werte des C ₁₁ IPr im Vergleich zu den bekannten CMC-Werten strukturell ähnlicher Imidazoliumsalze	111
Tab. 7-1: Chemikalien PEG/Dextran-Studie	135

VARIABLEN UND NATURKONSTANTEN

T^*	Transmission
I	Intensität
I_0	Grundintensität
E^*	Extinktion
$\tilde{\nu}$	mittlere Wellenzahl
λ	Wellenlänge
m	Masse
r	Radius / Abstand
k	Kraftkonstante
F	Kraft
x	Auslenkung
E_{pot}	Potentielle Energie
t	Zeit
A	Amplitude
ν	Frequenz
ϕ	Phasenverschiebung
h, \hbar	PLANCK Konstante, reduzierte PLANCK Konstante
μ	reduzierte Masse
ν	Schwingungsquantenzahl

ν_s	symmetrische Streckschwingung
ν_{as}	asymmetrische Streckschwingung
δ_s	symmetrische Deformationsschwingung
δ_{as}	asymmetrische Deformationsschwingung
β	Heizrate
T	Temperatur
P	Heizleistung
P_p	Heizleistung Probe
P_R	Heizleistung Referenz
C_p	Wärmekapazität der Probe
C_R	Wärmekapazität der Referenz
C_{ex}	Wärmekapazität der untersuchten Biomoleküle
H	Enthalpie
T_{on}	Starttemperatur des Phasenübergangs
T_m	Schmelztemperatur / Hauptphasenübergangstemperatur
K	Kalibrierfaktor
S_0	elektronischer Grundzustand
S_1	elektronisch angeregter Zustand
ν_j	Schwingungszustand
E	Energie
GP	Generalisierte Polarisierung
d	ABBE-Abstand
$FWHM$	Breite auf halber Maximalhöhe der lateralen Funktion

$AFWHM$ Breite auf halber Maximalhöhe der axialen Funktion

n Brechungsindex

α Polarisierbarkeit

I_S Intensität Streulicht

V Volumen

ϵ_0 Influenzkonstante

θ Streuwinkel

$C(\tau)$ Intensitätskorrelationsfunktion

Q Streuvektorbetrag

τ Korrelationszeit

I_S Streuintensität

D Translationsdiffusionskoeffizient

k_B BOLTZMANN-Konstante

R_h Hydrodynamischer Radius

ζ Zetapotential

ψ Oberflächenpotential

η Viskosität

v Wanderungsgeschwindigkeit

ϵ Dielektrizitätskonstante

E Elektrische Feldstärke

U_E Mobilität

κ Dicke der Doppelschicht

r_k Kugelradius

F_0	Schwingungsamplitude
z	Vertikale Auslenkung
k	Federkonstante des Cantilevers
γ	Dämpfungskonstante der Schwingung
Q	Qualitätsfaktor
ω_0	Vakuumschwingungsfrequenz des Cantilevers
ω_r	Schwingungsfrequenz in Flüssigkeiten
I_B	Laurdan Fluoreszenzintensität bei 440 nm
I_R	Laurdan Fluoreszenzintensität bei 490 nm
c	Stoffmengenkonzentration
p	Druck
T_P	Vorphasenübergangstemperatur
Π_S	Spreitungsdruck / Spreitungskraft
σ_0	Oberflächenspannung des reinen Lösungsmittels
σ	Oberflächenspannung der filmbedeckten Oberfläche

2 EINLEITUNG

Vorwort

Die Biophysikalische Chemie bewegt sich als Forschungsdisziplin im Grenzgebiet zwischen Biologie, Biophysik, physikalischer Chemie und Biochemie und ist somit in der Lage, über ein weites Spektrum Erkenntnisse zu biologisch und medizinisch relevanten Fragestellungen zu liefern. Diese Erkenntnisse liefert die Biophysikalische Chemie mit Hilfe von physikalischen und chemischen Messmethoden, deren Ergebnisse im physikalisch-chemischen Kontext interpretiert und auf initiale Fragestellungen angewandt werden.

Die Sinnhaftigkeit dieser Interpretationen hängt in hohem Maße von der Ähnlichkeit der untersuchten Systeme zur Natur ab. Aus diesem Grund bedient sich die Biophysikalische Chemie einfacher Modellsysteme, welche in ihrer Komplexität und Zusammensetzung aus den Grundbausteinen, beispielsweise natürlicher Zellen, zur Nachahmung natürlicher Membranen eine hohe Variabilität aufweisen. Somit können biologisch, medizinisch und biophysikalisch relevante Fragestellungen unter kontrollierten Bedingungen untersucht werden, während die Einflüsse externer Komponenten frei angepasst werden können. Die aus diesen Untersuchungen generierten Gesetzmäßigkeiten können im Weiteren in komplexeren Systemen auf ihre Allgemeingültigkeit untersucht werden, um ein tieferes Verständnis der ablaufenden Prozesse und relevanten Einflüsse zu erhalten.

Diese Arbeit befasst sich hauptsächlich mit dem Rückgrat biologischer Zellen, der Lipidmatrix, in welcher lebensnotwendige Proteine und Peptide verortet sind. Die Lipidmatrix selbst trägt jedoch durch ihre Struktur, Zusammensetzung und durch äußere Einflüsse selbst auch in höherem Maße zur Funktionalität zellulärer Systeme bei, als bis vor einigen Jahren vermutet. In den folgenden Abschnitten sollen die Grundlagen zu den

verwendeten Modellsystemen und deren spezifischen Eigenschaften erläutert werden, um im Weiteren die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen interpretieren zu können.

2.1 *Plasmamembranen*

Die Grundeinheit des bekannten Lebens auf der Erde ist die Zelle, welche in verschiedensten Ausführungen auftreten kann. Eines haben diese verschiedensten Aufbauten jedoch gemeinsam, und zwar die Abgrenzung eines innenliegenden Bereiches der Zelle gegen einen außenliegenden, extrazellulären Bereich außerhalb der Zelle durch eine Zusammenlagerung spezifischer, amphiphiler Moleküle. Die Ausbildung dieser Zellmembranen stellt einen der ersten und wichtigsten Schritte in der Evolution von der Urzelle bis zu den aktuellen Formen von Zellen dar. Biologische Membranen bestehen, wie heute bekannt ist, aus einer Vielzahl von Komponenten von Phospholipiden über Steroide bis hin zu den verschiedensten funktionalen Proteinen. Neben der Schutzfunktion gegen äußere Einflüsse bietet die Membran somit ein hohes Maß an Funktionalität über Stofftransport, durch deren Eigenschaft als semipermeable Barriere sowie mittels Signaltransduktion und vielem mehr. ^[1,2] Mit diesen Aufgaben stellt die schützende Biomembran einen wichtigen Bestandteil zu Stoffwechsel und Erhaltung des Lebens der Zelle dar, von denen viele weitere durch die in der Membranmatrix integrierten Proteine übernommen werden. Lange Zeit wurde dem Grundgerüst dieser Einheit, die Lipidmembran, lediglich die Rolle einer flüssig-kristallinen Trägermatrix von wichtigen Proteinen und funktionalen Molekülen in der Membran zugeordnet; es entstand das Flüssig-Mosaik-Modell nach SINGER und NICOLSON. ^[3] Hierbei stellt sich die Lipidmatrix als zweidimensionale Flüssigkeit dar, in welcher die funktionalen Einheiten frei diffundieren können. ^[3] Eine Vorstellung, welche sich in den letzten Jahrzehnten ebenfalls einer Evolution unterzog. Durch neue Erkenntnisse in der Biophysik sind die Funktionen der Lipide der Zellmembran in einem näheren Fokus betrachtet worden. Die für diese Arbeit interessanten Erkenntnisse hieraus, sowie die für diese Arbeit verwendeten Lipide und Membrantypen sollen in den folgenden Abschnitten kompakt erläutert werden.

2.1.2 Lipide in der Zellmembran

Lipide machen mit einem Anteil von 40-60 % einen großen Anteil in den heute bekannten Zellmembranen aus. ^[4] Im Allgemeinen bestehen Lipide aus einem polaren Molekülteil, welcher üblicherweise als Kopfgruppe bezeichnet wird, und einem unpolaren und somit hydrophoben Molekülteil, welcher üblicherweise als Rest- oder Schwanzgruppe bezeichnet wird. Dieser hydrophobe Molekülteil kann beispielsweise durch eine oder mehrere Kohlenwasserstoffketten ausgebildet sein, deren Anzahl, Länge und Zahl der ungesättigten Bindungen drastische Einflüsse auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Moleküle hat. Häufige Membranlipide mit einem Anteil von ~ 65 % an der Gesamtlipidmenge in eukaryotischen Membranen stellen beispielsweise die Phospholipide dar, welche für die Studien in dieser Arbeit genutzt wurden. ^[5] Durch Variation des Grundgerüsts sowie weiterer Modifikationen ist hieraus eine Vielzahl an Phospholipiden generierbar. In dieser Arbeit wurden zur Erstellung der Modellmembranen Restgruppenmodifikationen zwitterionischer Phosphatidylcholine, anionischer Phosphatidylglycerole sowie zwitterionischer Phosphatidyletanolamine verwendet (siehe Abb. 2-1).

Des Weiteren beinhalten die Modellsysteme in Angleichung an natürliche Plasmamembranen Steroide, in dieser Arbeit Cholesterin, welche einen erheblichen Einfluss auf das im Späteren beschriebene Phasenverhalten dieser Membranen aufweisen. ^[5]

Abhängig von der Kettenlänge und der Anzahl ungesättigter Bereiche der Restgruppen der oben dargestellten Phospholipide weisen diese drastische Unterschiede in ihrem physikalisch-chemischen Verhalten auf. Vorwiegend lassen sich Kettenlängen von 12-24 C-Atomen finden, welche gesättigt und ein- oder mehrfach ungesättigt vorliegen können. Die ungesättigten Bereiche weisen hierbei typischerweise eine *cis*-Konfiguration auf. ^[1] In den für die Studien dieser Arbeit verwendeten Phospholipiden sind die hydrophoben Fettsäuren typisch für Phospholipide eukaryotischer Zellmembranen über eine Esterbindung an die *sn*-1 und die *sn*-2 Position des Glycerinrückgrates gebunden. Der amphiphile Charakter dieser Moleküle ist für die Ausbildung von Membranen und Zellwänden unerlässlich. In polarer Umgebung führt diese Amphiphilie zu einer Aggregation dieser Moleküle, welche auf dem hydrophoben Effekt beruht. ^[4]

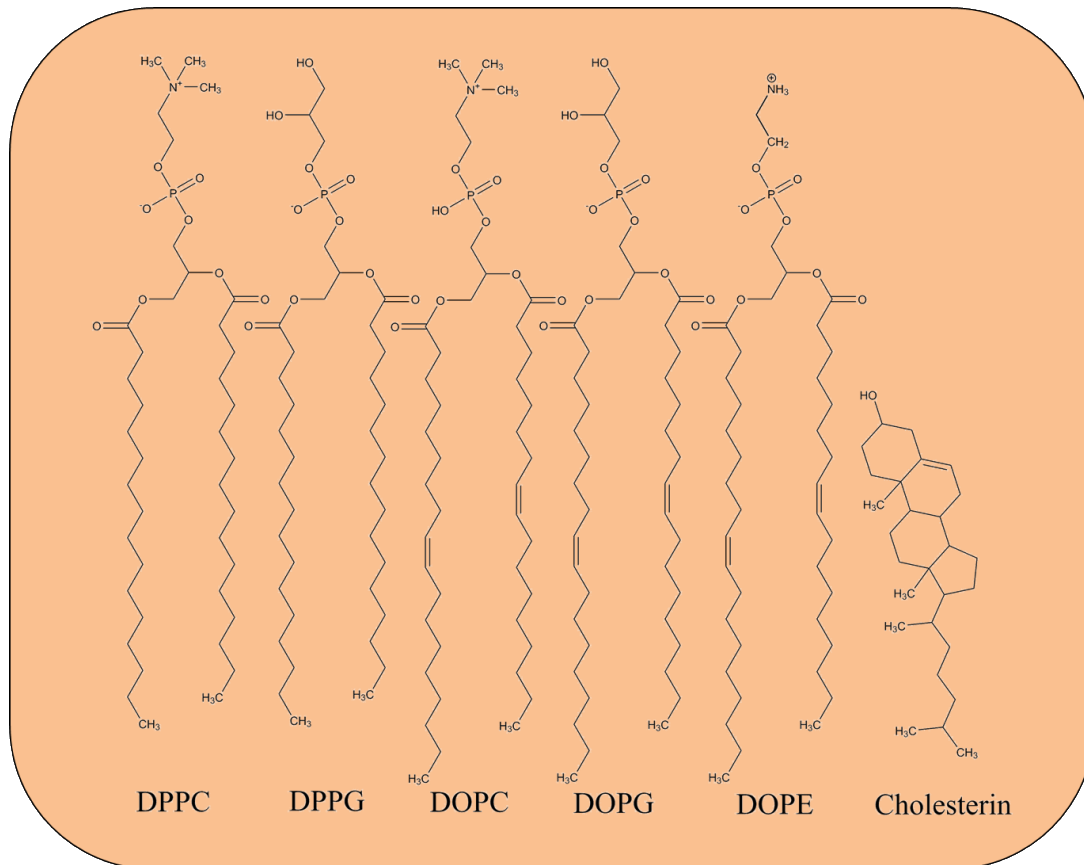


Abb. 2-1: Strukturen der verwendeten Lipide und Steroide

In dieser Arbeit verwendete Lipide und Steroide: Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), Dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG), Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC), Dioleoylphosphatidylglycerol (DOPG), Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) und Cholesterin.

In Abhängigkeit des so genannten kritischen Packungsparameters der einzelnen Lipide, welcher durch das Verhältnis von molekularem Volumenbedarf der hydrophoben Ketten zu dem Produkt aus Flächenbedarf der polaren Kopfgruppe und maximaler Kettenlänge der Alkylketten definiert ist, entstehen verschiedene Aggregatstrukturen. ^[4] Dieser Parameter ist abhängig von Hydratation, Temperatur, Druck, pH-Wert, Ionenstärke und potentieller Anwesenheit von Salzen in der Umgebung, weswegen der Packungsparameter keine fixe Größe darstellt. Die Fähigkeit, in Abhängigkeit der Kopf- sowie Restgruppen verschiedene Aggregatformen zu bilden, wird als Polymorphismus bezeichnet. ^[6] Bei einem kritischen Packungsparameter von $< 0,33$, entsprechend einer Kegelform der Lipide, ist die Ausbildung von Kugelmizellen favorisiert. Bei Werten > 1 , entsprechend einer Kegelstumpfform der Lipide, entsteht in erster Linie die Struktur der inversen Mizelle. Diese Strukturform wird oftmals in nicht-lamellaren Phasen, wie beispielsweise einer hexagona-

len oder einer kubischen Phase, beobachtet, welche in Fusionsprozessen aufgrund des Einflusses dieser Lipide auf die Membrankrümmung eine große Rolle spielen.^[1,2,7] Bei Packungsparametern zwischen 0,5 und 1, entsprechend einer eher zylindrischen Form der Lipide, tendieren die Moleküle jedoch dazu, die für die Ausbildung von Zellen relevanten Doppelschichten zu bilden, welche üblicherweise eine Dicke von 4-5 nm aufweisen.^[4] In diesen Doppelschichten sind die Lipide so angeordnet, dass die hydrophilen Bereiche im Kontakt zum polaren Lösungsmittel stehen, während die hydrophoben Bereiche sich in einer unpolaren Schicht gegenüberstehen und vom polaren Lösungsmittel geschützt vorliegen (siehe unterer Teil in Abb. 2-2). Innerhalb dieser Membran besteht in Abhängigkeit der Temperatur eine hohe laterale Fluidität, sodass die Lipide innerhalb der zweidimensionalen Membran diffundieren können. Ebenso besteht die Möglichkeit von Rotationsbewegungen und sogar transversaler Diffusion in die gegenüberliegende Lipidschicht, welche als *flip-flop* Diffusion bezeichnet wird und nur sehr langsam vonstattengeht.^[4,5] Abhängig vom Wassergehalt der Membran können verschiedene makromolekulare Strukturen entstehen. Unterhalb eines Wassergehaltes von 30 gew.% bildet das Phospholipid DPPC beispielsweise lamellare Phasen aus parallelen, übereinandergestapelten Doppelschichten aus, während sich oberhalb dieses Wassergehaltes multilamellare Vesikel ausbilden.^[4] Unilamellare Vesikel, wie sie in dieser Arbeit zu Teilen verwendet werden, sind nur in sehr verdünnten Lösungen stabil.^[4]

In dieser Arbeit werden methodenabhängig verschiedene Membran- und Vesikelvariationen untersucht. Die in dieser Arbeit verwendeten Variationen der Lipiddoppelschichten sind in Abb. 2-2 dargestellt. Teilabbildung A) zeigt hier eine planare Lipiddoppelschicht (SBM, von engl. supported bilayer membrane), wie sie beispielsweise in der Rasterkraftmikroskopie untersucht wird. B) zeigt ein riesiges unilamellares Vesikel (GUV, engl. giant unilamellar vesicle). Diese Variante der Vesikel wird unter anderem in der Fluoreszenzmikroskopie verwendet und weist in den in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen typischerweise Durchmesser vom 10-40 µm auf. Als GUVs werden unilamellare Vesikel ab einer Größe von etwa 1 µm bezeichnet.^[8] Als letzte genutzte Variation zeigt Teilabbildung C) schematisch ein multilamellares Vesikel (MLV, von engl. multilamellar vesicle). Diese zeichnen sich durch ihre Mehrschaligkeit, bestehend aus übereinandergestapelten, parallelen, lamellaren Schichten, aus, welche durch das Lösungsmittel voneinander getrennt sind.^[4,9] Diese Variante der Membranen wird aufgrund Ihrer Stabilität in höhe-

rer Konzentration für die Fluoreszenzspektroskopie wie auch die FOURIER-Transformations-Infrarot-Spektroskopie verwendet.

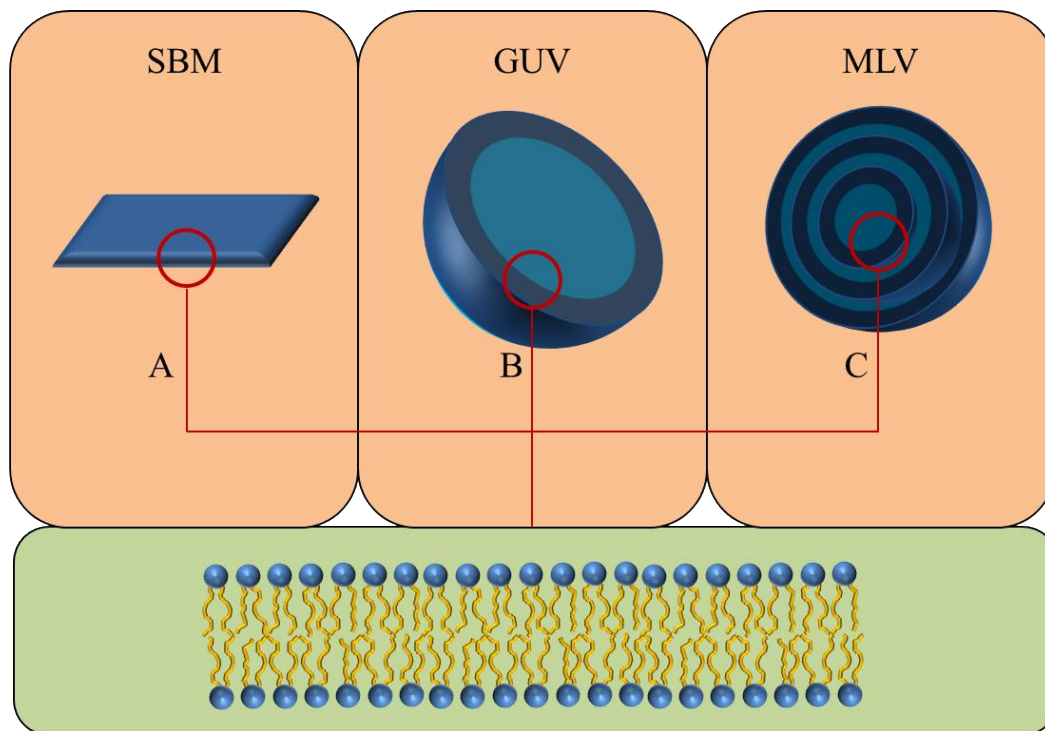


Abb. 2-2: Variationen der Lipiddoppelschichten

Für die Untersuchungen dieser Arbeit präparierte Lipiddoppelschicht-Variationen. A) zeigt eine planare Lipiddoppelschicht wie sie für Untersuchungen der Rasterkraftmikroskopie benötigt wird. B) zeigt ein riesiges unilamellares Vesikel. Verwendung finden diese beispielsweise in der Fluoreszenzmikroskopie. C) zeigt ein multilamellares Vesikel, welches beispielsweise in der Fluoreszenzspektroskopie Anwendung findet.

2.1.3 Phasenverhalten von Lipidmembranen

Auch nach der Ausbildung lamellarer Phasen der Lipide können, beeinflusst durch physikalisch-chemische Faktoren, verschiedenste Phasenzustände innerhalb der gebildeten Lipidmembranen realisiert werden. Bekannte Einflussfaktoren für diese Zustände sind neben der Temperatur Druck sowie pH-Wert und Einflüsse verschiedenster Ionen oder anderer externer sowie interner Additive auf die Membran. Durch diese Faktoren können verschiedene Phasenzustände erreicht werden, welche sich durch charakteristische Eigenschaften auszeichnen. Die in wässriger Lösung und bei den in dieser Arbeit verwendeten Temperaturen und Drücken relevanten Phasenzustände sind in Abb. 2-3 dargestellt, wie sie beispielsweise bei Lipidmembranen aus reinem DPPC zu beobachten sind.

Bei niedrigen, physiologisch relevanten Temperaturen tritt zunächst die L_{β} -Phase auf, welche auch als s_o -(von engl. solid ordered) Phase bezeichnet wird. Diese Phase zeichnet sich durch die Anordnung der Lipide in einem verzerrten, quasi-hexagonalen Gitter aus, in welchem die Alkylketten hauptsächlich gestreckt in *all-trans* Konformation vorliegen. ^[4] Abhängig vom Hydratationsgrad der Membran können die Ketten gewinkelt zur Membrannormalen vorliegen, was durch die Kennzeichnung der Phase als L_{β}' ersichtlich wird. Dieser Zustand weist eine hohe laterale Ordnung und eine geringe Fluidität sowie laterale Diffusionsgeschwindigkeit der Lipide auf. Temperaturerhöhung oder Drucksenkung führt zum Durchlaufen des Vorphasenübergangs und zur Ausbildung der P_{β} - beziehungsweise abhängig vom Hydratationsgrad analog zur L_{β} -Phase zur Ausbildung der P_{β}' -Phase. Diese zeichnet sich besonders durch eine periodisch gewellte Überstruktur der Membran aus. Die Kohlenwasserstoffketten sind auch in dieser Phase gestreckt und in einem hexagonalen Gitter angeordnet. ^[4] Die Rotationsfreiheit der Lipide in den beiden benannten Phasen ist im Gegensatz zur lateralen Diffusionsgeschwindigkeit aufgrund der gestreckten Alkylketten jedoch hoch. Weitere Steigerung der Temperatur oder weitere Absenkung des Druckes führt zum Vollzug des Hauptphasenübergangs und zur Ausbildung der L_{α} oder l_d (von engl. liquid disordered) Phase. Diese ist durch eine sehr hohe Fluidität der Lipide in der Membran und eine relativ hohe Diffusionsgeschwindigkeit ausgezeichnet. Zudem liegen die Alkylketten der Lipide nun hauptsächlich in *gauche* Konformation vor, welche für die hohe Fluidität verantwortlich sind. ^[4] Diese Phase wird daher im Gegensatz zu den vorherigen Gel-Phasen auch als fluide oder flüssig-kristalline Phase bezeichnet. Dieser Zustand weist eine hohe Konformationsfreiheit, eine geringe Packungsdichte und hierdurch eine relativ zu den anderen Phasen hohe Hydratation der Kopfgruppenregion auf.

Die flüssig-kristalline L_{α} -Phase stellt die physiologisch relevanteste, da fluideste, der benannten Phasenzustände dar. Die hohe Fluidität ist von großer Relevanz für die Funktion verschiedenster Membranproteine und weiterer Funktionen der Plasmamembran. Um die Fluidität der Membran zu gewährleisten, kann die Membranzusammensetzung durch Variation der Lipidmischung und die Einlagerung verschiedener membranaktiver Substanzen angepasst werden. Beispielsweise lässt sich die Hauptübergangstemperatur der Membran durch den Einbau von Lipiden mit ungesättigten oder kurzen Kohlenwasser-

stoffresten variieren, da hierdurch die intermolekularen Wechselwirkungskräfte geschwächt werden und somit weniger Energie zum Übergang benötigt wird.

Die thermotropen Phasenübergänge, welche durch Erhöhung der Temperatur erzielt werden können, können durch die Erhöhung des Druckes bei konstanter Temperatur umgekehrt werden. Auch in diesem Fall treten bei konstanter Temperatur charakteristische Phasenübergänge auf, welche von den gleichen Parametern abhängig sind wie die Übergangstemperaturen der thermotropen Phasenumwandlung.

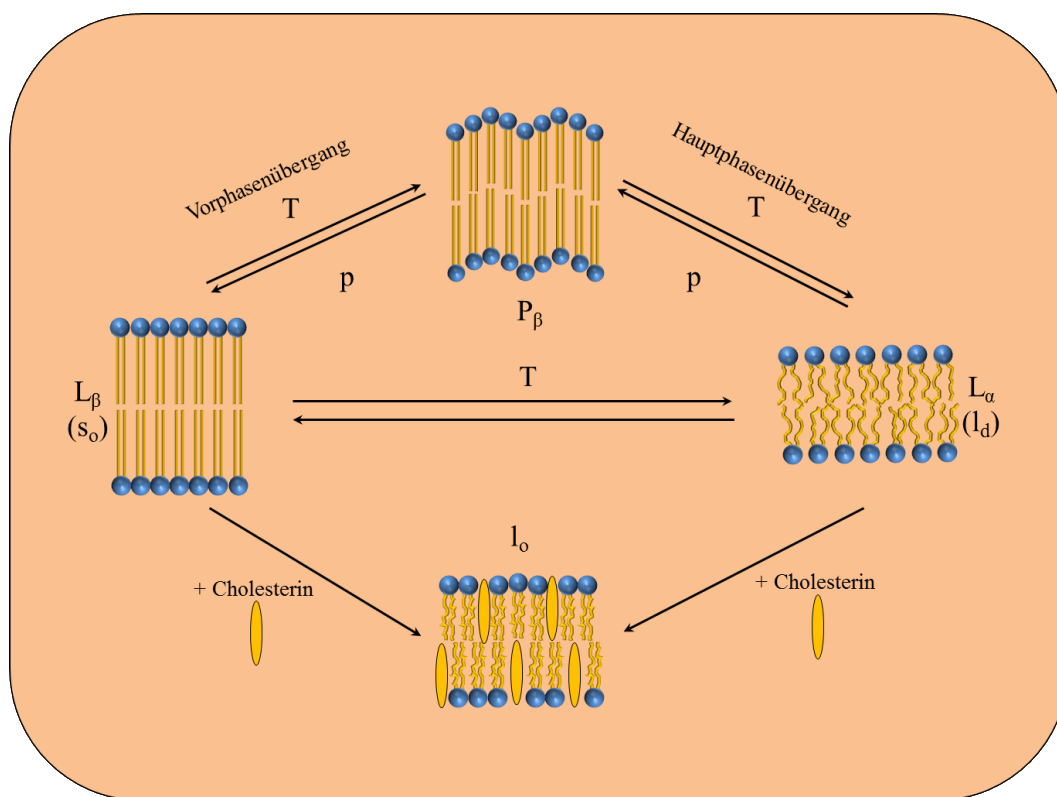


Abb. 2-3: Phasenzustände lamellarer Lipidmembranen in wässriger Lösung.

Bei niedrigen Temperaturen herrscht in wässriger Lösung in lamellaren Phasen die L_{β} oder s_0 (solid ordered) Gelpase vor, welche sich durch eine *all-trans* Konformation der Alkylketten, eine sehr geringe Fluidität, geringe Diffusionsgeschwindigkeiten der Lipide und eine hohe Lipidordnung auszeichnet. Bei steigender Temperatur erfolgt der Vorphasenübergang zur P_{β} -Phase, welche sich durch die Ausbildung einer periodisch gewellten Überstruktur auszeichnet. Weitere Temperaturerhöhung führt zur Ausbildung der flüssig-kristallinen L_{α} oder l_d (von engl. liquid disordered) Phase, welche durch eine überwiegende *gauche* Konformation der Alkylketten, eine geringe laterale Ordnung und hohe laterale Diffusion gekennzeichnet ist. Die Anwesenheit von Cholesterin führt zur Ausbildung einer flüssig-geordneten I_0 (liquid ordered) Phase, welche sich durch einen hohen Ordnungsparameter und eine hohe laterale Diffusion auszeichnet. Abbildung adaptiert nach [10].

Eine weitere Möglichkeit der Adaption der Lipidmembran an äußere Einflüsse besteht in der Einlagerung von Cholesterin, welches ebenfalls in Abb. 2-1 dargestellt ist. Der Cholesteringehalt natürlicher Plasmamembranen liegt wie der Anteil der anionischen Lipide in der Membran zellspezifisch zwischen 10 und 15 %. ^[5] Die Einlagerung von Cholesterin bewirkt eine Erhöhung der intermolekularen Wechselwirkungen durch die Interaktion von Steroidgerüst und benachbarten Alkylketten der Lipide, wodurch die Alkylketten in eine *all-trans* Konformation überführt werden. Darüber hinaus wirkt das Cholesterin in der Membran als Störfaktor, welcher die kristalline Packung der Lipidmoleküle stört, wodurch ein Übergang in die P_{β} -Phase verhindert wird. ^[11] Steigende Cholesterinkonzentration führt zu einer stetigen Verbreiterung des Hauptphasenübergangs durch die Ausbildung einer weiteren Phase, der flüssig-geordneten l_{α} -Phase. Laterale Diffusionsgeschwindigkeiten sowie Rotation der Lipide sind vergleichbar mit der flüssig ungeordneten l_{α} -Phase, während die Alkylketten der Lipide wie in der L_{β} -Phase meist in *all-trans* Konformation vorliegen. ^[12]

2.1.4 Lipid-rafts

Lange Zeit wurden der Lipidmembran in biologischen Zellen hauptsächlich die Funktion als zweidimensionales Lösungsmittel für membrangebundene Proteine und andere funktionelle Strukturen in der Membran zugeordnet. Diese Theorie wurde 1972 von SINGER & NICOLSON in ihrem Flüssig-Mosaik-Modell beschrieben, welches die Lipiddoppelschicht als eine weitestgehend homogene Struktur hoher lateraler Dynamik beschreibt. ^[3] Jedoch finden sich auf der extrazellulären, dem Zytosol abgewandten Seite der Zellmembran in eukaryotischen Zellen hauptsächlich neutrale Lipidspezies, während der intrazelluläre Teil der Lipiddoppelschicht 10 – 15 % anionische sowie viele zwitterionische Lipide antreffen lässt. ^[5,13,14] Zudem weisen Lipidmembranen bestehend aus mehreren Lipidspezies in der axialen wie auch lateralen Membranstruktur weitere Inhomogenitäten auf, welche sich unter anderem durch unterschiedliche Schichtdicken der Membran ausdrücken. Die Bereiche verschiedener Schichtdicken grenzen sich auch durch die Zusammensetzung der Bereiche von der umgebenden Matrix ab. Bereits 1977 wurde durch ISRAELCHVILI gezeigt, dass verschiedene Proteine die Anordnung der Lipide in der Membran beeinflussen können, indem diese zur Erlangung einer thermodynamisch günstigeren Anordnung durch Vermeidung von Packungsdefekten geeignete Lipide an ihren

Kontaktflächen zur Membranmatrix rekrutieren. ^[15] Die voneinander abgegrenzten Bereiche der Lipidmembran weisen ähnliche Effekte auf. Auch diesen Strukturen liegt die Reduzierung von - nach MOURITSEN aus seinem Matratzenmodell fortlaufend als hydrophobe *mismatches* bezeichneten - Packungsdefekten zu Grunde. ^[16]

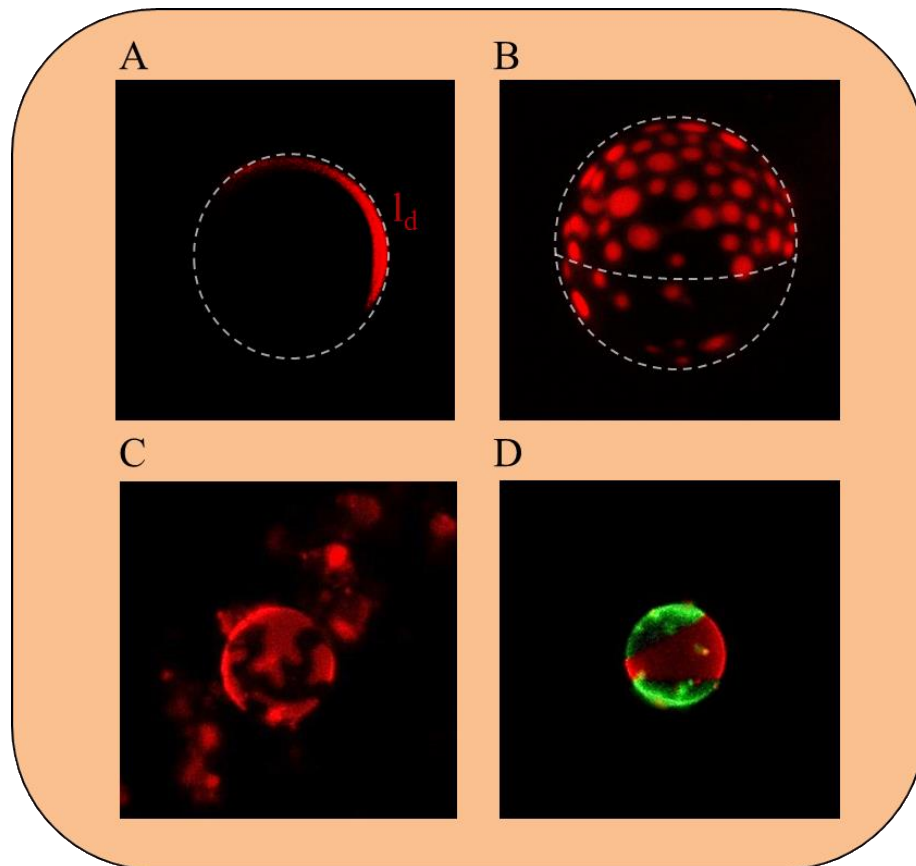


Abb. 2-4: Fluoreszenzmikroskopiebilder Lipiddomänen / rafts

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von phasenseparierten Lipiddomänen in heterogenen Membransystemen in mit roter Fluoreszenz markierter l_d , sowie unmarkierter l_o -Phase. A) zeigt eine Querschnittsaufnahme eines Vesikels mit markierter fluiden Phase. B) zeigt das Resultat mehrerer übereinander gelegter Querschnittsaufnahmen. Hier zeigt sich eine feine Verteilung der rot markierten fluiden Domänen auf der Membranoberfläche. C) zeigt Domänenstrukturen einer *solid-liquid* Phasentrennung in einer heterogenen Fünf-Komponenten-*raft*-Membran, welche sich durch nicht zirkuläre Strukturen auszeichnen. D) zeigt die Domänenverteilung unter zusätzlicher grüner Markierung der l_o -Phase. Hier wird die Koexistenz der beiden getrennten Phasen im heterogenen *raft*-System besonders deutlich.

Durch die laterale Phasenseparation und Akkumulation von Lipiden ähnlicher Kettenlängen wird somit die Anzahl der hydrophoben *mismatches* in der Lipidmembran reduziert. Diese laterale Entmischung der Lipidspezies liegt somit in selektiven Lipid-Lipid-Interaktionen sowie den Wechselwirkungen von Cholesterin mit den Phospholipiden begründet, welche in thermodynamisch begünstigter Reduzierung der Störstellen und somit

aufretender Akkumulation der so genannten geordneten Membrandomänen oder *lipid-rafts* resultiert. ^[17] Diese Lipiddomänen auf der Membranoberfläche sind als Aufnahmen aus der Fluoreszenzmikroskopie in Abb. 2-4 dargestellt. Teilabbildung A zeigt hier die Querschnittsaufnahme eines Vesikels mit durch rote Fluoreszenz markierter l_d -Phase. Teilabbildung B zeigt hingegen das Resultat der Überlagerung mehrerer Querschnittsaufnahmen verschiedener Fokalebene, die zu einem Gesamtbild überlagert wurden. Es zeigt sich eine feine Verteilung der rot markierten fluiden Domänen auf der Membranoberfläche. Dies ist in dem von SIMONS und IKONEN benannten *Lipid-raft-Modell* ^[18] beschrieben, in dem diesen mikroskopischen Domänen eine wichtige Rolle für die Anordnung von Membranproteinen und deren Konformation und somit Funktion zukommen. ^[18,19]

In natürlichen Zellen stellt sich eine Untersuchung und Beobachtung dieser Domänen aufgrund ihrer Größe und Lebensdauer jedoch als schwierig dar, weswegen dieses Modell derzeit kontrovers diskutiert wird. ^[10,20] Die Erweiterung dieses Modellsystems durch SACKMANN schließt die zusätzlichen Interaktionen der Lipide und gebundenen Proteine mit dem intrazellulären Polymernetzwerk aus Aktin und weiteren Proteinen, dem so genannten Zytoskelett, auf der zytosolischen Seite der Membran sowie die Interaktionen mit der bei natürlichen Zellen vorliegenden, umgebenden Glykokalix, einer Schicht aus Zuckergruppen, die an die Kopfgruppen der Lipide oder an die Membranproteine bindet, ein. ^[1] Hierdurch wird die laterale Diffusion der Membrankomponenten reduziert und eine Homogenisierung der Membrankomponenten unterbunden. ^[1,21] Für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden Modellmembransysteme als Rekonstruktion dieser komplexen Systeme *in vitro* genutzt, welche die Komplexität aufweisen, die oben beschriebenen *lipid-rafts* auszubilden und die Möglichkeit bieten, diese unter verschiedenen Aspekten zu untersuchen.

2.2 Lipofektion

In den vergangenen Jahren gewann die Gentechnik zur Bewältigung verschiedener ökologischer sowie medizinischer Probleme massiv an Bedeutung. Im Zuge dessen entwickelten sich verschiedene Methoden, durch die das Einbringen von Genen in die zur Reproduktion genutzte Spezies, die so genannte Transfektion, ermöglicht wurde. Hierzu zählen beispielsweise der Gentransfer mittels viraler Vektoren, welche eine hohe Effizi-

enz, aber auch eine hohe Gefahr von Immunreaktionen und Komplikationen *in vivo* bis hin zur Kanzerogenität aufweisen. [22–24] Einen weiteren Ansatz zum Gentransport stellen sogenannte Lipoplexe dar, welche die zu transferierende Nukleinsäure entweder in Schichten von kationischen Lipidmembranen oder kationischen Polymeren einschließt, um diese durch die Fusion mit den Zielsystemen in diese einzubringen. [25] Obwohl diese Methode *in vivo* eine geringere Effizienz aufweist, werden diese als immunologisch inert vermutet, was verglichen mit der viralen Methode in einer geringeren Komplikationsgefahr resultiert. [22] Angetrieben durch die bessere *in vivo* Verwendbarkeit dieser Transfektionsmethode erfreuten sich die kationischen Lipide und deren Verwendung in Membranen zur Optimierung der so genannten *Lipofektion* großen Fortschrittes. Resultierend hieraus steht derzeit eine Vielzahl an kationischen Lipiden und Polymeren zur Verfügung, die zur Lipofektion in Abhängigkeit von zellulären Spezifikationen herangezogen werden können. [22,25] Der weitere große Vorteil der Lipofektion liegt in der simplen Präparation der DNS transportierenden Lipoplexe. Hierbei werden die kationischen Lipide oder Membransysteme lediglich mit der DNS versetzt, was in einer Umlagerung der Nukleinsäuren mit dem kationischen Membransystem, dem Beladen kationischer Vesikel mit der Nukleinsäure auf der extrazellulären Seite, oder einem schichtweisen Einschluss der Nukleinsäuren in größeren Lipoplexen resultiert [25–27] In allen Fällen entsteht ein kationischer DNS-Lipid Komplex, welcher aufgrund seiner positiven Nettoladung auf der DNS-abgewandten Seite zur Fusionsinduktion an natürliche Zellmembranen führt. Detaillierte Mechanismen der Fusion sowie der Freisetzung der transferierten DNS in das Zielsystem werden derzeit energisch diskutiert, wobei einige effizienzförderliche Faktoren identifiziert wurden. Beispielsweise wird die Transfektionseffizienz durch den Einsatz so genannter *helper-lipids* wie Cholesterin oder DOPE gesteigert, welche die Induktion von nicht-lamellaren Phasen innerhalb der Lipoplexmembran begünstigen. [22,26–29] Die folgenden Schritte der Fusion oder der Endocytose der Lipoplexe sowie die Freisetzung der DNS sind jedoch bislang Gegenstand aktueller Forschung und bieten verschiedene Ansätze der Interaktionen und Mechanismen dieser Prozesse. [22,25–27,29–31] In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiges Molekül auf der Basis lipidierter Imidazoliumsalze auf seine Verwendbarkeit als transfektionsinduzierendes Additiv sowie auf die biophysikalischen Einflüsse auf naturähnliche Modellmembransysteme untersucht.

2.3 PEG/Dextran Zwei-Phasen-System

Seit der versehentlichen Entdeckung von wässrigen Zwei-Phasen-Systemen (ATPS, von engl. aqueous-two-phase-system) durch BEIJERINCK im Jahr 1896 nach Mischung von Stärke und Gelatine, wurden diese Systeme durch ABERTSSON weiter untersucht und zeigten seither eine Vielzahl nützlicher Anwendungen auf. ^[32-34] Die Herstellung dieser Systeme zeichnet sich durch ihre simple Präparation aus, welche lediglich das Lösen der Komponenten in Wasser erfordert. ^[35] Generell werden zwei relevante Arten von Zwei-Phasen-Systemen unterschieden: Zum einen die Mischung zweier Polymere wie beispielsweise Polyethylenglycol (PEG) und Dextran, zum anderen die Polymer-Salz Mischung. Letztere hat in biologischen Anwendungen mit dem Nachteil hoher Ionenstärken zu kämpfen, was die Polymer-Polymer Mischung vermeidet. ^[36] In dieser Arbeit wird die Polymer-Polymer Mischung aus PEG/Dextran herangezogen. Wässrige Zwei-Phasen-Systeme weisen die Eigenschaft auf, in Abhängigkeit einer Vielzahl von Faktoren, in einer Mischphase, wie auch in zwei getrennten Phasen voneinander vorzuliegen. Bekannte Faktoren hierbei sind das Molekulargewicht der Komponenten, deren Hydrophobizität, der pH-Wert des Systems, sowie in hohem Maße die Temperatur. ^[35] Die Separation von Polymer-Polymer-Systemen liegt in der Aggregation und daraus folgender sterischer Exklusion begründet, während die Polymer-Salz-Systeme durch die Adsorption von Wasser an das Salz zur Exklusion der Polymerphase führt. ^[37,38] Die Separation in zwei Phasen wird durch einige Faktoren beeinflusst. Hierzu gehören die Konzentration der einzelnen Komponenten, deren Molekularmasse, sowie die Konzentration des eventuellen Salzes. ^[32,39,40] Trotz vieler Bemühungen steht bisher noch kein umfängliches Modell bereit, welches die Separation in flüssig-flüssig Mischungen vollends beschreibt. Stattdessen basieren viele genutzte Modelle auf der Kombination verschiedener Theorien, welche jedoch bereits eine große Bandbreite an Vorhersagen ermöglichen. ^[41-46]

Um Modellsysteme dem natürlichen Vorbild noch weiter zu nähern gilt es, die Lipidvesikel über die Komplexität der Membranstrukturen und der Ausbildung von *lipid-rafts* hinaus zu optimieren. Für die Überprüfung von Hypothesen und der Übertragung dieser Ergebnisse auf natürliche Zellsysteme stellt der intrazelluläre Bereich der Modellsysteme eine weitere Herausforderung dar. Natürliche Zellmembranen sind in diesem Bereich dem Zytosol ausgesetzt, welches keineswegs wie in einfachen Modellsystemen einer wässrigen Pufferlösung ähnelt, sondern durch viele Makromoleküle wie Proteine, Nukleinsäu-

ren und Polysaccharide gefüllt ist. ^[47] Um diesem mit Makromolekülen gefüllten Bereich zu modellieren, können die oben beschriebenen wässrigen Zwei-Phasen-Systeme herangezogen werden. In dem in dieser Arbeit vorgestellten Projekt wird hierfür die häufig verwendete Mischung aus PEG und dem Polysaccharid Dextran verwendet. ^[47-50] Diese wässrige, makromolekulare Polymerlösung zeigt in Abhängigkeit des Mischungsverhältnisses der Komponenten sowie der Temperatur eine Mikrokompartimentierung innerhalb des wässrigen Systems in Bereiche höherer Dextran- sowie höherer PEG-Konzentrationen. ^[50-52] Oberhalb einer Mischungsspezifischen, kritischen Temperatur geht dieses System wiederum in eine einphasige Lösung der Polymere über. Eine Mikrokompartimentierung innerhalb des Zytosols natürlicher Zellen wird ebenfalls beobachtet und steht im Verdacht, für verschiedene Funktionen der Zellen von großer Bedeutung zu sein. ^[50,53] Diese Mikrokompartimentierung innerhalb von Modellmembransystemen führt zu Modellsystemen natürlicher Zellen, an welchen eine Vielzahl von Hypothesen *in vitro* untersucht werden kann. Beispielsweise wurden von KEATING et al. Untersuchungen zur Temperatur- und Osmolytabhängigkeit dieses Systems in einfachen Lipidvesikeln durchgeführt, was eine Vielzahl interessanter Phänomene, wie vollständige oder teilweise Benetzung der Membranen durch die Komponenten des Zwei-Phasen-Systems, darauf folgende Ausbildung von Ausstülpungen oder die spontane Ausbildung von Membran-Nanoröhrchen zeigte. ^[49,54,55]

Eine druckabhängige Untersuchung dieses Zytosolmodellsystems in Vesikeln komplexer Lipidzusammensetzung fand bisher jedoch noch nicht statt.

3 METHODEN

Das folgende Kapitel dient der Einführung in die Theorie der in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Methoden der Biophysikalischen Chemie. Diese stellen sich im Wesentlichen als spektroskopische, kalorimetrische sowie mikroskopische Methoden verschiedener Ausführungen und Auflösungen dar.

3.1 *FOURIER-Transformations-Infrarot (FT-IR)-Spektroskopie*

Eine grundlegende, in den Studien dieser Arbeit angewandte Methode der Biophysikalischen Chemie stellt die FOURIER-Transformations-Infrarot-Spektroskopie dar. Hierbei handelt es sich um eine spezielle Form der Infrarot (IR)-Spektroskopie, in der Molekülgruppen durch Licht in einem Wellenlängenbereich von $800 - 10^6$ nm angeregt werden. Die Vorteile dieser Methode liegen in der kurzen Messzeit, dem geringen notwendigen Probenvolumen sowie der zerstörungsfreien Natur dieser Messmethodik. Zudem kann diese Art der Spektroskopie unter verschiedensten physiko-chemischen Gegebenheiten, beispielsweise unter hohem Druck oder bei hohen Temperaturen durchgeführt werden.

Im Folgenden sollen die grundlegenden physikalisch-chemischen Phänomene erläutert werden, welche die FOURIER-Transformations-Infrarot-Spektroskopie nutzt.

3.1.1 *Molekülschwingungen*

In der Schwingungsspektroskopie, zu der die hier beschriebene FT-IR-Spektroskopie zählt, werden IR-aktive Molekülgruppen durch Licht in einem Wellenlängenbereich von $800 - 10^6$ nm zu Schwingungen und Rotationen angeregt. Hierbei entstehen drei hauptsächlich zu unterscheidende Schwingungstypen. Zunächst die Oberschwingungen, die durch kurzwellige Nah-IR-Strahlung im Bereich von 800 nm bis $2,5 \mu\text{m}$ angeregt werden. Darüber hinaus die Grundschiebungen der Molekülgruppen, welche im mittleren IR-Bereich von $2,5 - 50 \mu\text{m}$ Wellenlänge angeregt werden und die vom Fern-IR im Bereich von $50 - 10^3 \mu\text{m}$ Wellenlänge angeregten Gerüstschwingungen. ^[4]

Die Methodik der Schwingungsspektroskopie beruht auf der Anregung der Molekülgruppen durch Lichtabsorption. Hierbei wird nach Durchlaufen der Probe durch den Lichtstrahl entweder die Transmission T^* nach $T^* = \left(\frac{I}{I_0}\right) \cdot 100\%$ oder die Extinktion E^* als negativ dekadischer Logarithmus der Transmission T^* als Funktion der Wellenzahl $\tilde{\nu} = 1/\lambda$ betrachtet. ^[4] Die Differenz zwischen den Lichtintensitäten vor (I_0) und nach Durchlaufen der Probe (I) resultiert aus spezifischer Absorption von IR-Strahlung durch entsprechende Molekülgruppen, welche ebendiese von einem Grundschwingungszustand in einen höheren Schwingungszustand anhebt. Eine Grundschwingung der Moleküle und Molekülgruppen existiert für jede Temperatur oberhalb des absoluten Nullpunktes. Absorption von IR-Strahlung tritt nur dann auf, wenn die Frequenz der IR-Strahlung exakt der Grundschwingungsfrequenz einer im Strahl befindlichen Molekülgruppe entspricht. ^[4]

Die Schwingung einer solchen Molekülgruppe kann in erster Näherung durch einen harmonischen Oszillator beschrieben werden. Zur näheren Beschreibung soll modellhaft ein zweiatomiges Molekül, bestehend aus zwei Atomen der Massen m_1 und m_2 im Abstand r_0 betrachtet werden. Die Bindung der beiden Atome kann in diesem Modell als Feder betrachtet werden, welche nach dem HOOKEschen Gesetz bei Auslenkung um die Ruhelage der Feder eine rücktreibende Kraft F erfährt: ^[56]

$$F = -k x \quad 3-1$$

Hierbei stellt k die Kraftkonstante der Feder dar und steht modellhaft für die Stärke der Bindung zwischen den beiden Atomen, während x die Auslenkung der Feder um die Ruhelage bei $x = 0$ beschreibt. Ebendiese Auslenkung bewirkt nach der Auslenkung eine harmonische Schwingung, in welcher die in der Feder gespeicherte, potentielle Energie E_{pot} nach

$$E_{\text{pot}} = \frac{1}{2} k x^2 \quad 3-2$$

beschrieben werden kann. ^[4]

Anwendung des zweiten NEWTONschen Axioms liefert über

$$F = m \ddot{x} = -k x \quad 3-3$$

mit m als die Masse des Objektes und \ddot{x} als zweifache Ableitung der Auslenkung x nach der Zeit t die Differentialgleichung zweiter Ordnung für die Bewegung des harmonischen Oszillators: ^[56]

$$m \frac{\partial^2 x}{\partial t^2} + kx = 0 \quad 3-4$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung liefert ^[56]

$$x(t) = A \cos(2\pi\nu t + \Phi) \quad 3-5$$

wobei A die Amplitude, ν die Frequenz der Oszillation und Φ den Phasenverschiebungswinkel der resultierenden, periodischen Schwingung beschreibt. Die Frequenz ν lässt sich zudem in Abhängigkeit von Federkonstante k und Masse m als

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} \quad 3-6$$

darstellen. ^[56]

Eine quantenmechanische Betrachtung dieses Oszillators erfordert die zeitunabhängige SCHRÖDINGER-Gleichung für den harmonischen Oszillator ^[56]

$$-\frac{\hbar}{2\mu} \frac{d^2}{dx^2} \psi + \frac{1}{2} kx^2 \psi = E\psi \quad 3-7$$

in welcher \hbar das reduzierte PLANCK'sche Wirkungsquantum und μ die reduzierte Masse nach $\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$ beschreibt. Die Lösung dieser Gleichung liefert die Eigenwerte

$$E_v = h\nu_0 \left(v + \frac{1}{2} \right) \quad 3-8$$

mit der PLANCK-Konstanten h , den möglichen Schwingungsquantenzahlen $v = 0, 1, 2, 3 \dots$ und der Eigenfrequenz $\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$. [4,56]

Durch die Limitierung der möglichen Schwingungsquantenzahlen v liegen die Energieniveaus der Schwingungen somit äquidistant zueinander vor, wie in Abb. 3-1 a) verdeutlicht ist. [4]

Absorption tritt somit nur auf, wenn die Energiedifferenz $\Delta E = E_{v+1} - E_v = h\nu_0$ der Energie des eingestrahnten Lichtquants entspricht. [4]

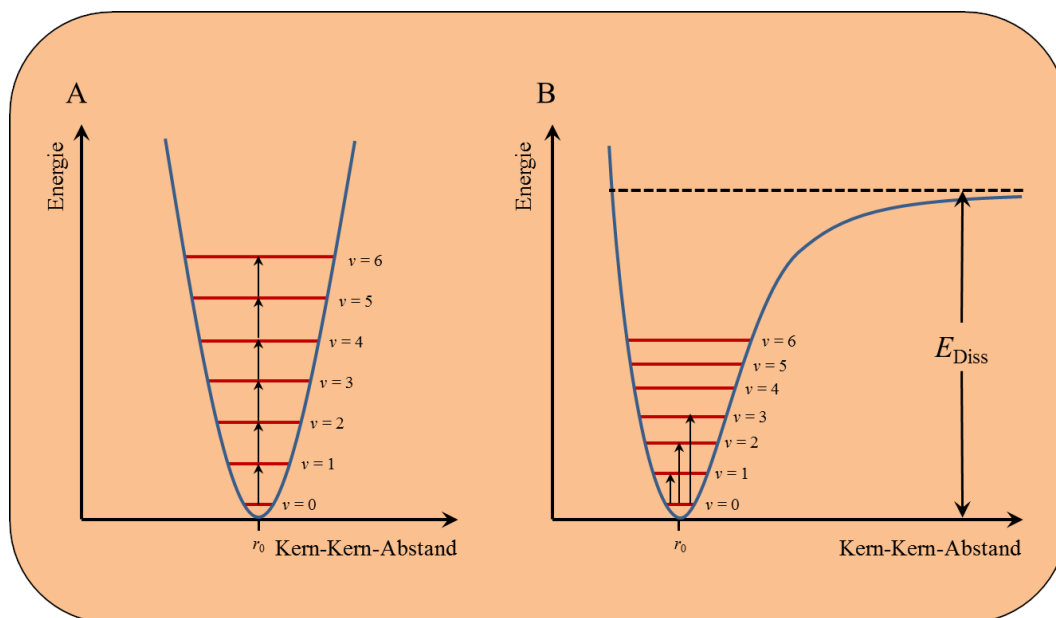


Abb. 3-1: Schematische Darstellung Potentialkurven

Vergleich der Potentialkurven des in A harmonischen, und in B anharmonischen Oszillators. Abbildung adaptiert nach [4].

Bei großen Schwingungsamplituden versagt jedoch das Modell des harmonischen Oszillators. Eine Dissoziation des Moleküls bei hohen Schwingungsenergien sowie ein steilerer Verlauf der Potentialkurve aufgrund des PAULI-Prinzips sind mit diesem Modell nicht vereinbar. Eine treffendere Alternative bietet der anharmonische Oszillator, verdeutlicht durch das in Abb. 3-1 b) dargestellte MORSE-Potential. ^[4] Hier sind die Abstände zwischen den Energieniveaus nun nicht mehr äquidistant wie beim harmonischen Oszillator, sondern konvergieren bei Annäherung an die Dissoziationsenergie E_{Diss} gegen null. ^[4] Eine Berechnung der Auswahlregeln zeigt zudem, dass Übergänge nicht mehr nur zum nächst höheren Energieniveau stattfinden können, so genannte Grundschwingungen, sondern auch zum übernächsten oder höheren Niveaus ($\Delta\nu = \pm 2, \pm 3, \dots$), sogenannte Oberschwingungen. Bei Raumtemperatur gehen praktisch alle Übergänge von $\nu = 0$ aus. ^[4,57]

Die Ausprägungsformen dieser Eigenschwingungen hängen vom geometrischen Aufbau und der Anzahl der beteiligten Atome ab. Die hier betrachteten Schwingungen sollen Normalschwingungen sein, bei denen die Atome nur so weit ausgelenkt werden, dass keine Verschiebung des Schwerpunktes und keine Rotation des Moleküls erfolgt. Somit lassen sich die Schwingungen in zwei grundlegende Bereiche, die Valenzschwingungen und die Deformationsschwingungen, unterteilen (vgl. Abb. 3-2). ^[4]

Im Falle der Valenzschwingungen erfolgt die Auslenkung der Atome in Richtung der Bindungsachse, wodurch sich Änderungen im Bindungsabstand ergeben. ^[4] Diese Schwingungen können als symmetrische (ν_s) oder als asymmetrische (ν_{as}) Streckschwingungen auftreten. Diese Schwingungen absorbieren IR-Strahlung in Bereichen von 2900–2940 cm^{-1} im Falle der asymmetrischen, und im Bereich von 2835–2865 cm^{-1} im Falle der symmetrischen Streckschwingung, wodurch eine Zuordnung der Absorptionsbanden im IR-Spektrum eindeutig möglich ist. Bei den Deformationsschwingungen ändert sich der Bindungsabstand nahezu nicht. Anstelle dessen ändert sich periodisch der Bindungswinkel der gebundenen Gruppen. Auch hier ist eine Unterteilung in symmetrische (δ_s) und asymmetrische (δ_{as}) Deformationsschwingung möglich, da die Bindungswinkel beider Gruppen jeweils in zwei Richtungen beeinflusst werden können. ^[4]

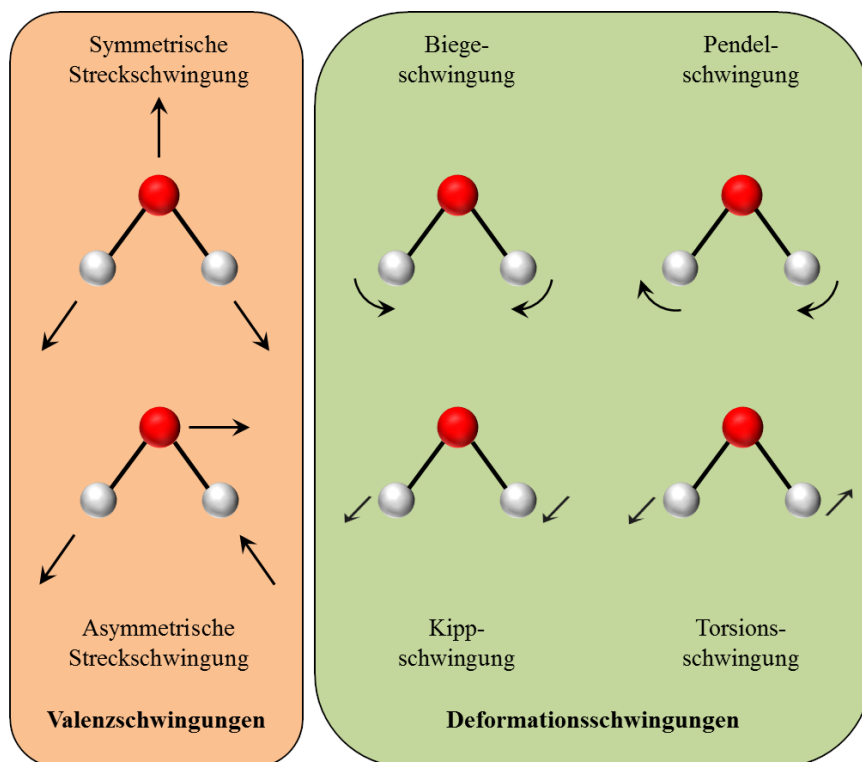


Abb. 3-2: Schwingungsmoden

Überblick über die möglichen Normalschwingungen einer typischen CH_2 -Gruppe, unterteilt in Valenzschwingungen und Deformationsschwingungen.

3.1.2 Messtechnik

Die Messung der IR-Absorption der oben aufgeführten Schwingungsformen erfolgt durch Infrarot-Spektrometer. Diese nutzen im Allgemeinen eine Lichtquelle, welche Licht bekannter Wellenlänge emittiert und, vermessen nach Passieren der Probe, die transmittierte Intensität. Dies wird für verschiedene definierte Wellenlängen wiederholt. Auf diese Weise werden die von der Probe absorbierten Wellenlängen deutlich und erlauben Rückschlüsse auf die Zusammensetzung dieser. Diese Variante der Infrarot-Spektroskopie stellt eine sehr zeitaufwändige und somit für Störungen und Rauschen anfällige Messmethode dar. Diese Probleme lassen sich durch die Verwendung eines FOURIER-Transformations-Infrarot (FT-IR)-Spektrometers beheben. Diese im Folgenden erläuterte Methode weist Vorteile gegenüber der klassischen IR-Spektroskopie, wie die gleichzeitige Aufnahme weiter Spektralbereiche, höhere Lichtintensitäten sowie ein hohes Signal zu Rausch-Verhältnis durch die Akkumulation aller IR-Signale gleichzeitig am Detektor auf. ^[4] Ein schematischer Aufbau eines FT-IR-Spektrometers ist in Abb. 3-3 dargestellt.

Das Kernelement des FT-IR-Spektrometers bildet ein MICHELSON-Interferometer, bestehend aus einem halbdurchlässigen Strahlteiler, welcher das eintretende Licht in zwei orthogonal zueinander verlaufende Strahlen teilt, einem fest installierten Spiegel, welcher einen der geteilten Strahlen unverändert zurück reflektiert und einem rechtwinklig zum festen Spiegel angeordneten, beweglichen Spiegel, welcher den zweiten der geteilten Strahlen zurück reflektiert, sodass sich die Strahlen am Strahlteiler wieder überlagern.

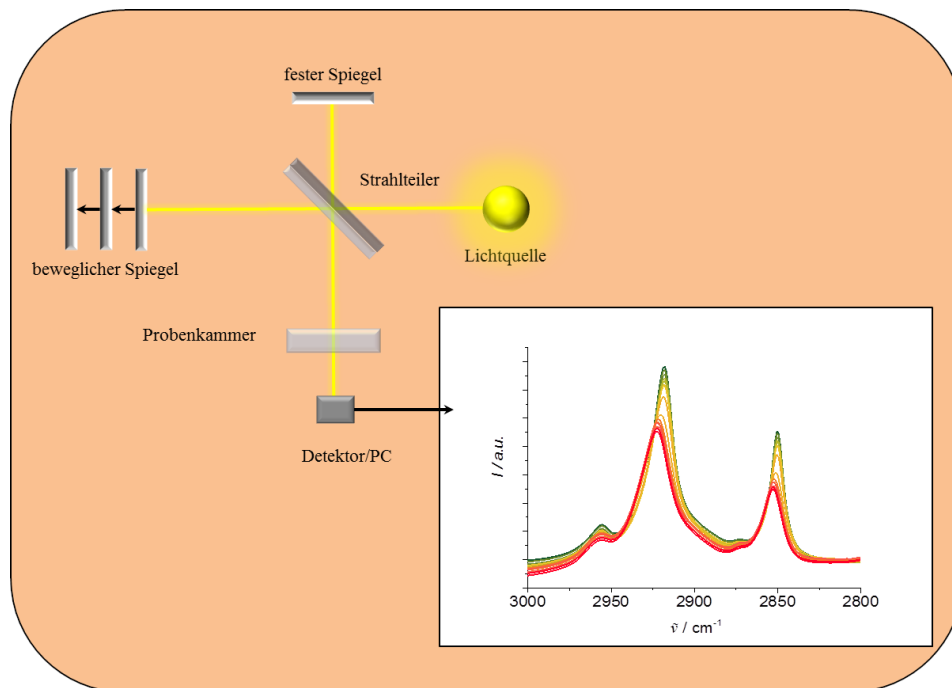


Abb. 3-3: Schematischer Aufbau FT-IR-Spektrometer

Schematischer Aufbau eines FT-IR-Spektrometers mit CH_2 -Streckschwingung als Beispielspektrum.

Die Variation der Position des beweglichen Spiegels führt zu Unterschieden in der optischen Weglänge x der beiden Spiegel. Entspricht dieser Unterschied in der optischen Weglänge der Wellenlänge oder einem ganzzahligen Vielfachen dieser ($x = n\lambda$ | $n = 0, 1, 2, 3 \dots$), interferieren die beiden Strahlen bei der Rekombination konstruktiv, bei Differenzen ungleich null oder nicht halbzahligen Vielfachen der Wellenlänge destruktiv ($x = (n + 1/2)\lambda$).^[4] Nach dem Strahlteiler werden 50 % des so rekombinierten Strahls durch die Probenkammer zum Detektor geführt, während die restlichen 50 % zurück zur Lichtquelle geführt werden. Der Detektor misst nach Durchstrahlen der Probe die Lichtin-

tensität als Funktion der Position des beweglichen Spiegels, des sogenannten Spiegelvorschubs, und liefert somit als Messergebnis ein Interferogramm. Im Falle monochromatischen Lichtes und konstanten Spiegelvorschub entsteht somit ein cosinusförmiger Intensitätsverlauf entsprechend

$$I(x) = A(1 + \cos(2\pi\tilde{\nu}x)) \quad 3-9$$

mit $\tilde{\nu} = 1/\lambda$ als Wellenzahl des betrachteten IR-Strahls und A als Kombination aus Intensität des einfallenden Lichtes, Transmission sowie Reflektivität des Strahlteilers. ^[4] Polychromatisches Licht fordert für A selbst eine Abhängigkeit von der Wellenzahl, was oben stehende Gleichung 3-9 zu

$$I(x) = \int_0^{\infty} A(\tilde{\nu})(1 + \cos(2\pi\tilde{\nu}x))d\tilde{\nu} \quad 3-10$$

erweitert. ^[4] Einführung von $I(\infty)$ als Intensität bei großer optischer Wegdifferenz liefert für die Interferogrammfunktion $F(x)$: ^[4]

$$F(x) = I(x) - I(\infty) = \int_0^{\infty} A(\tilde{\nu})(\cos(2\pi\tilde{\nu}x))d\tilde{\nu} \quad 3-11$$

Mit Hilfe der FOURIER-Transformation ergeben sich aus dieser Gleichung die spektralen Intensitäten $A(\tilde{\nu})$: ^[4]

$$A(\tilde{\nu}) = 4 \int_0^{\infty} F(x) \cos(2\pi\tilde{\nu}x) dx \quad 3-12$$

Um ein Transmissions- oder Absorptionsspektrum zu erhalten, wird das so generierte Spektrum durch ein zuvor bestimmtes Referenzspektrum $A_0(\tilde{\nu})$ geteilt: ^[4]

$$A(\tilde{\nu}) = -\log T(\tilde{\nu}) = -\log\left(\frac{A(\tilde{\nu})}{A_0\tilde{\nu}}\right) \quad 3-13$$

Als Endresultat wird ein Intensitätsspektrum ausgegeben, welches die den Detektor erreichende Lichtintensität gegen die Wellenzahl aufgetragen zeigt.

Zur Analyse von Phospholipiden mit der FT-IR-Spektroskopie können diverse Wellenzahlbereiche betrachtet werden. Sowohl die hydrophoben Alkylketten als auch die hydrophilen Kopfgruppen der Moleküle weisen IR-aktive Gruppen auf. Von besonderer Relevanz für diese Arbeit stellen sich die CH₂-Gruppen der aliphatischen Kohlenwasserstoffketten dar, welche im Bereich von 3000 – 2800 cm⁻¹ charakteristische symmetrische (bei etwa 2850 cm⁻¹) und asymmetrische (bei etwa 2920 cm⁻¹) Streckschwingungen aufweisen. Zudem lassen sich symmetrische und asymmetrische CH₃-Valenzschwingungen bei etwa 2956 und 2837 cm⁻¹, sowie eine aus zwei Banden bei 1743 und 1728 cm⁻¹ zusammengesetzte Carbonylbande auflösen. Letztere lässt aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber der Polarität der Umgebung Rückschlüsse auf die Hydratation der Kopfgruppenregion der Lipide zu. Hierbei entspricht die Bande bei 1743 cm⁻¹ einer nicht hydratisierten Kopfgruppe, wohingegen die Bande bei 1728 cm⁻¹ der hydratisierten Variante entspricht. ^[58] Das thermotrope Phasenverhalten von Phospholipiden lässt sich anhand der CH₂-Streckschwingungen untersuchen, da die Position dieser Banden sehr konformationssensitiv ist. In der Gelphase liegen in den Kohlenwasserstoffketten nahezu ausschließlich *trans*-Konfigurationen vor. Nach Übergang in die fluide Phase liegen hier hauptsächlich *gauche*-Konformere vor, was sich durch eine Verschiebung der Maxima der entsprechenden Schwingungsbande zu höheren Wellenzahlen äußert.

3.2 Dynamische Differenzkalorimetrie

Die dynamische Differenzkalorimetrie (DSC, von engl. differential scanning calorimetry) stellt die am häufigsten genutzte Methode für quantitative kalorimetrische Untersuchungen an Biomolekülen dar. ^[4] An Phospholipiden wird diese Methode genutzt, um die Phasenübergangstemperaturen der thermotropen Phasenübergänge der Lipide und deren Übergangsenthalpien zu bestimmen. Es existieren zwei Modi, in welchen DSC-Messungen erfolgen können, die dynamische Leistungsdifferenzkalorimetrie und die dynamische Wärmestromdifferenzkalorimetrie.

Bei Anwendung der dynamischen Leistungsdifferenzkalorimetrie befinden sich zwei hermetisch verschlossene Proben- und Referenzbehälter in einem thermisch isolierten

Gefäß (isoperibole Bauart).^[59] Proben- und Referenzbehälter befinden sich auf voneinander getrennten Heizplatten, sodass beide Behälter unabhängig voneinander beheizt werden können. Zur Temperaturerfassung dienen an beiden Heizplatten separate Temperaturfühler. Das Aufheizen der Gefäße erfolgt mittels einer zuvor festgelegten Heizrate $\beta = \Delta T / \Delta t$.^[4] Bei dieser Messvariante ist gefordert, dass Probe und Referenz die gleiche Temperatur aufweisen. Finden Phasenübergänge im Probengefäß statt, so muss, verglichen mit dem Referenzgefäß, eine höhere oder niedrigere Heizleistung angelegt werden, um eine Temperaturdifferenz zu unterbinden. Gemessen wird in dieser Variante somit die Heizleistung

$$\Delta P = P_P - P_R \quad 3-14$$

mit P_P als Heizleistung für das Probengefäß und P_R als Heizleistung für das Referenzgefäß.^[4] Diese Differenz ist proportional zum Unterschied $\Delta C(T)$ der Wärmekapazitäten der Probe $C_P(T)$ und der Referenz $C_R(T)$ nach:^[4]

$$\Delta C(T) = C_P(T) - C_R(T) = \frac{\Delta P(T)}{\beta} \quad 3-15$$

Das Resultat der Methode stellt eine Auftragung der Leistungsdifferenz ΔP gegen die Temperatur T dar (siehe Abb. 3-4). Im Falle wässriger Lösungen von Biomolekülen und unter Verwendung von reinem Wasser als Referenz kann diese Wärmekapazitätsdifferenz als Wärmekapazität der untersuchten Biomoleküle interpretiert werden, welche hier als $C_{ex}(T)$ bezeichnet wird.^[60] Integration dieser Kurve im Temperaturbereich des endothermen Phasenüberganges liefert die Phasenübergangsenthalpie:^[4,60]

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_{ex}(T) dT \quad 3-16$$

Der Beginn des Phasenübergangs wird als *onset temperature* T_{on} bezeichnet und bestimmt sich als Schnittpunkt der Basislinie mit der Tangente am ersten Wendepunkt des

Übergangspeaks (vgl. Abb. 3-4). Das Maximum des DSC-Peaks stellt die Hauptphasenübergangstemperatur T_m der untersuchten Probe dar. [60]

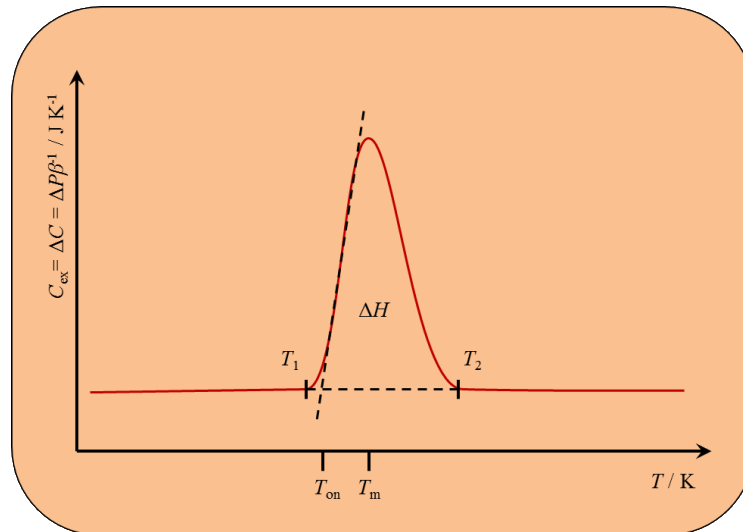


Abb. 3-4: Schematische Darstellung DSC-Kurve

Schematische Darstellung eines DSC-Thermogramms eines Hauptphasenübergangs. Abbildung adaptiert nach [4].

Die dynamische Wärmestromdifferenzkalorimetrie weist einen vereinfachteren Aufbau auf, welcher in Abb. 3-5 schematisch dargestellt ist. In dieser Betriebsart werden beide Gefäße innerhalb einer ebenfalls thermisch isolierten Messkammer auf einer zentrosymmetrischen Scheibe hoher Wärmeleitfähigkeit positioniert, unter der an den entsprechenden Positionen der Gefäße Temperatursensoren verbaut sind. [9,59] Beide Gefäße werden über die Scheibe mit einer zuvor festgelegten, konstanten Heizrate erhitzt. Bei gleicher Wärmekapazität von Probe und Referenz besteht keine Wärmestromdifferenz zwischen den Strömen zu beiden Gefäßen, was in einer gleichen Temperatur beider Gefäße resultiert. [60] Tritt in der Probe eine endotherme Phasenumwandlung auf, so äußert sich dies als Temperaturdifferenz zwischen den beiden Temperaturmessstellen. Diese Temperaturdifferenz ist proportional zur Differenz der Wärmeströme zum Proben- und Referenzgefäß. Mit Hilfe des geräte- und messspezifischen Kalibrierfaktors $K = \Delta C / \Delta T$ ergibt sich aus dieser Temperaturdifferenz eine Wärmekapazitätsdifferenz ΔC zur Auftragung und Auswertung gemäß Abb. 3-4. [59,60] Diese Messmethode eignet sich sehr gut zur Bestim-

mung der Phasenübergangstemperaturen, liefert jedoch im Vergleich zur dynamischen Leistungsdifferenzkalorimetrie zur Bestimmung der Übergangsenthalpien geringere Genauigkeiten.

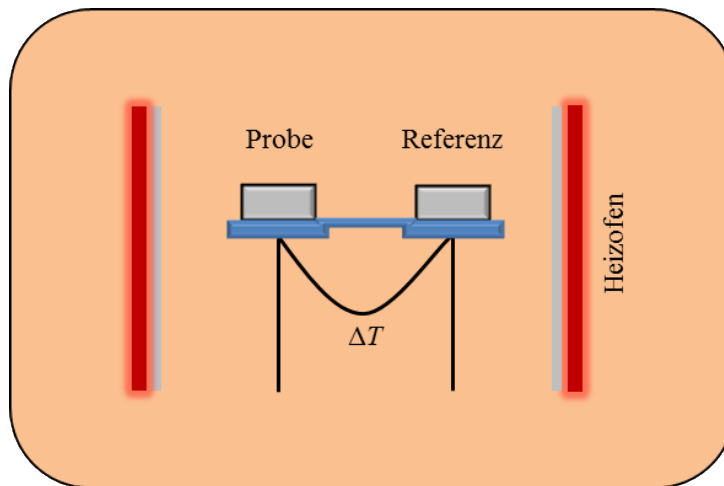


Abb. 3-5: Schematische Darstellung DSC-Ofen

Schematische Darstellung des Aufbaus einer Wärmestromdifferenzkalorimetrie-Apparatur. Abbildung adaptiert nach [9].

3.3 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzbasierte Methoden stellen in der molekularen Biophysik eine häufig genutzte Methode dar, welche durch Variation der Fluorophore ein breites Erkenntnisspektrum abdeckt. Beispielsweise können durch die Fluoreszenzspektroskopie Informationen über thermotrope und barotrope Phasenübergänge von Lipidmembranen, sowie über laterale Diffusion, laterale Membranordnung sowie Hydratation der Kopfgruppenregion der Modellmembranen gewonnen werden. Die fluoreszenzbasierten Methoden bedürfen aufgrund der hohen Sensitivität der Fluoreszenzdetektion nur geringer Probemengen, sodass Methoden bestehen, die mit subnanomolaren Konzentrationen oder gar Einzelmoleküldetektion auskommen. [4]

3.3.1 Fluoreszenz

Grundlage der Fluoreszenzspektroskopie stellt die Nutzung von Fluorophoren dar. Die Absorption von Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung einer bestimmten Wellenlänge resultiert bei dieser Art von Molekülen in der Anhebung des Energieniveaus eines Elektrons vom Grundzustand in einen elektronisch angeregten Zustand. Diese Absorption eines Lichtquants erfolgt innerhalb von 10^{-15} Sekunden. [4] Fluorophore sind, anders als andere Moleküle, dazu in der Lage, diese aufgenommene Energie für eine relativ lange Zeit von 10^{-8} Sekunden zu speichern, bevor diese wieder als Resultat der Rückkehr in den elektronischen Grundzustand als Lichtquant emittiert wird. [4] Da neben der Emission als Lichtquant weitere mögliche Prozesse der Energieabgabe bei Relaxation in den elektronischen Grundzustand existieren, ist es notwendig, diese näher zu betrachten. Zur Veranschaulichung dieser Prozesse dient eine Darstellung der möglichen Relaxationswege in einem JABLONSKI-Diagramm (siehe Abb. 3-6).

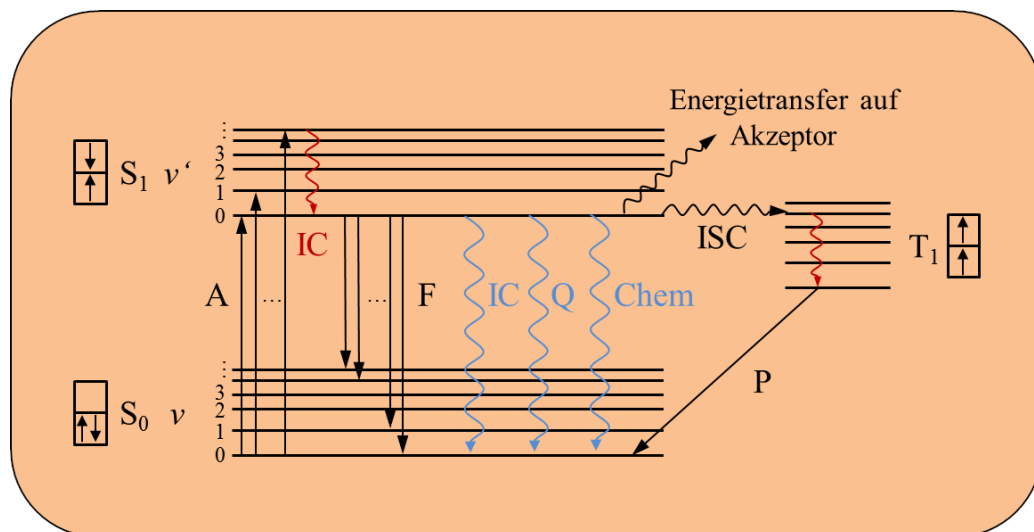


Abb. 3-6: JABLONSKI-Diagramm Fluoreszenz

Absorptions- und mögliche Relaxationsprozesse eines Fluorophors, dargestellt im schematischen JABLONSKI-Diagramm. Abbildung adaptiert nach [4].

Der elektronische Grundzustand S_0 sowie die elektronisch angeregten Zustände S_i der Moleküle besitzen über diese Klassifizierung hinaus weitere Feinstrukturen, die Schwingungszustände v_j . Vor Anregung durch ein Photon entsprechender Wellenlänge des fol-

genden Übergangs befinden sich die Moleküle im Schwingungsgrundzustand $\nu = 0$ des elektronischen Grundzustandes S_0 .^[4] Durch Absorption der Energie eines eintreffenden Photons (A) innerhalb von 10^{-15} Sekunden werden die Moleküle entsprechend der zugehörigen FRANCK-CONDON-Faktoren in verschiedene Schwingungszustände ν' höherer elektronischer Zustände S_1 oder höher angehoben.^[4]

Aus diesen verschiedenen angeregten Zuständen erfolgen nun die Relaxationsprozesse, wie sie in Abb. 3-6 dargestellt sind. Der als *internal conversion* (IC) bezeichnete Prozess betitelt die Energieabgabe durch Stöße mit den umgebenden Lösungsmittelmolekülen innerhalb von etwa 10^{-10} Sekunden, welcher zur Desaktivierung des Energieniveaus auf den unteren Schwingungszustand des elektronisch angeregten Zustandes S_1 ($\nu' = 0$) führt. Aus diesem Zustand können diverse Arten von Relaxation in den elektronischen Grundzustand S_0 erfolgen. Zum einen kann auch hier erneut eine Absenkung des Energieniveaus durch *internal conversion* erfolgen, was aufgrund der großen Energiedifferenzen mit 10^{-8} Sekunden eine vergleichbare Zeit in Anspruch nimmt wie eine weitere Möglichkeit der Relaxation, die Fluoreszenz.^[4] Bei der Fluoreszenz (F) kann, wie bei der Absorption, entsprechend der FRANCK-CONDON-Faktoren der Übergang aus dem untersten Schwingungszustand des elektronisch angeregten Zustandes auch in höhere Schwingungsniveaus als das Niveau $\nu = 0$ des elektronischen Grundzustandes erfolgen. Dieser Effekt ist, verglichen mit dem absorbierten Licht, für eine Rotverschiebung des emittierten Lichtes verantwortlich, welche durch die geringere emittierte Energie und somit nach $E = h c / \lambda$ mit einer größeren Wellenlänge begründet ist. Weitere mögliche Relaxationsprozesse stellen beispielsweise das Quenching (Q), welches oft als Fluoreszenzlöschung bezeichnet wird, dar. Hierbei wird die Energie des angeregten Moleküls durch Stöße mit anderen Molekülen ohne Emission von Photonen übertragen. Bei räumlicher Nähe kann die absorbierte Energie des Weiteren ebenfalls strahlungslos auf ein passendes Akzeptormolekül übertragen werden, wobei bei diesem so genannten FÖRSTER-Resonanz-Energietransfer (FRET) die Emissions- und Absorptionsspektren der beiden beteiligten Moleküle überlappen müssen. Darüber hinaus kann die Energie des Anregungslichtes auch für Reaktionen genutzt werden (Chem), wodurch ebenfalls eine Relaxation in den Grundzustand erfolgt. Die letzte hier beschriebene Möglichkeit der Desaktivierung des angeregten Moleküls ist der Interkombinationsübergang (ISC von engl. intersystem crossing). Hier gelangt das angeregte Molekül durch quantenmechanisch - in einfacher Rech-

nung - theoretisch verbotene, dennoch bei geringen Energiedifferenzen in merklichem Ausmaß stattfindende Spin-umkehr, in höhere Schwingungszustände des elektronischen Triplettzustandes T_1 .^[4] Durch *internal conversion* wird auch in diesem elektronischen Zustand der Schwingungsgrundzustand erreicht, von dem aus der ebenfalls quantenmechanisch verbotene und daher sehr langsam ablaufende Übergang in den Singulett-Grundzustand S_0 erfolgt. Dieser Übergang (P) wird als Phosphoreszenz bezeichnet und weist Geschwindigkeitskonstanten von 10^{-2} bis 10^2 Sekunden auf.^[4]

3.3.2 Laurdan Spektroskopie

Für die in dieser Arbeit vorgestellten fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen findet der bei einer Wellenlänge von $\lambda = 390$ nm anregbare Fluorophor Laurdan (1-(6-(Dimethylamino)-2-naphthyl)-1-dodecanon) Anwendung, dessen Struktur im Anhang in Abb. 10-1 dargestellt ist. Dieser Fluorophor bietet aufgrund seiner Struktur eine empfindliche Sonde für das thermo- sowie barotrope Phasenverhalten von Phospholipidmembranen. Dies resultiert aus der hohen Empfindlichkeit des Moleküls für die Polarität des umgebenden Mediums und den in der flüssig-kristallinen Phase vorliegenden *gauche*-Konformeren, welche eine Diffusion von polaren Wassermolekülen in die Membran ermöglichen. Somit können ebenfalls Rückschlüsse auf die Hydratation der Kopfgruppenregion von Lipidmembranen gezogen werden, da sich das Laurdan im Grenzbereich zwischen unpolare Alkylkette und polare Kopfgruppe nahe der Ester-carbonylgruppe der Phospholipide einbaut.^[61]

Änderungen der Polarität des umgebenden Mediums zeichnen sich als sogenannter STOKES-Shift des Emissionsspektrums des Fluorophors aus, welcher durch das Prinzip der generalisierten Polarisation quantifiziert werden kann. Die Ausbildung dieses Shifts wird im späteren Verlauf dieses Kapitels detailliert beschrieben. Eine unpolare Umgebung zeichnet sich bei Laurdan durch eine Emissionswellenlänge von $\lambda = 440$ nm, eine polare Umgebung durch eine Emission bei $\lambda = 490$ nm ab.^[61] Die Intensitäten beider Wellenlängen werden für die Quantifizierung als generalisierte Polarisation nach

$$GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad 3-17$$

normiert, um eine Abhängigkeit von gerätespezifischen Parametern zu eliminieren. [4,61]

Die Messanordnung, die zu dem messbaren STOKES-Shift führenden Prozesse, sowie die generalisierten Polarisationen einer thermo- sowie barotropen Phasenumwandlung einer Lipidmembran sind in Abb. 3-7 dargestellt und sollen im Folgenden erläutert werden.

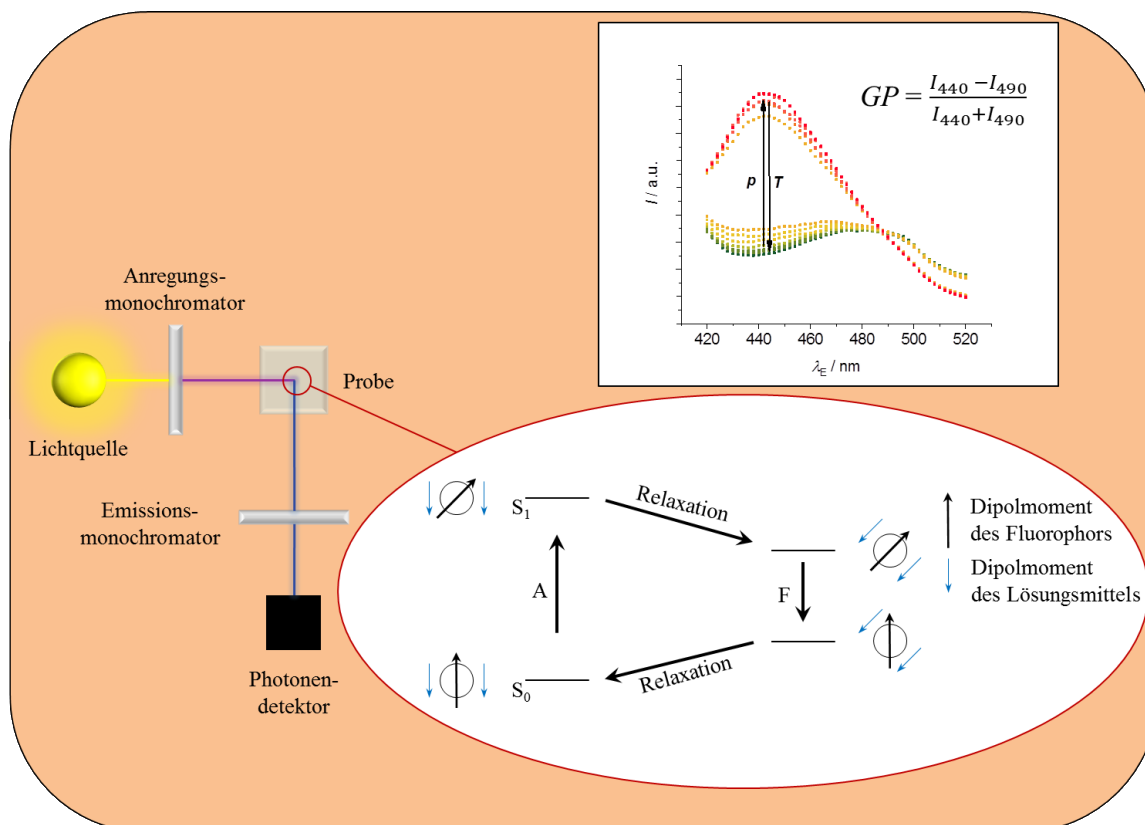


Abb. 3-7: Schematische Darstellung Laurdan-Fluoreszenzspektroskopie

Vereinfachte, schematische Darstellung der Fluoreszenzspektroskopie-Messanordnung, der zum STOKES-Shift führenden Prozesse sowie die beispielhafte GP -Kurve einer Phasenumwandlung einer Lipidmembran. Abbildung adaptiert nach [4].

Bei der statischen Messung der Fluoreszenzintensitäten wird kontinuierlich das Licht einer vorgeschalteten Lichtquelle durch den Anregungsmonochromator, welcher bei Bedarf durch einen Polarisator ergänzt werden kann, in die Probe eingestrahlt. Orthogonal zu diesem eingestrahlt Licht wird nach Passieren des Emissionsmonochromators, ebenfalls bei Bedarf durch einen Polarisator zu ergänzen, die Intensität des Fluoreszenzlichtes am Photonendetektor aufgezeichnet. Da gleichzeitig die Möglichkeit besteht, die Absorp-

tion und somit die Extinktion des Anregungslichtes zu vermessen, kann mit dieser Anordnung auch die Quantenausbeute als Quotient der Intensität des Fluoreszenzlichtes und der Intensität des absorbierten Lichtes bestimmt werden. ^[4] Die Anwendung von dynamischen Anregungs- und Emissionsmonochromatoren bietet die Möglichkeit, durch Variation je einer der Wellenlängen Emissionsspektren, sowie ein Anregungsspektren eines Fluorophors aufzunehmen.

Die Emissionswellenlänge des Fluorophors ist, wie bereits oben angeführt, stark abhängig von der Polarität der Umgebung. ^[4] Der Effekt des Lösungsmittels ist in der Detailansicht im unteren, rechten Bereich der Abb. 3-7 dargestellt. Liegt der Fluorophor in einer polaren Umgebung vor, so richten sich die Dipolmomente des Fluorophors und die des umgebenden Lösungsmittels antiparallel zueinander aus. Eine Anregung des Fluorophors aus dem elektronischen Grundzustand S_0 in den elektronisch angeregten Zustand S_1 durch Absorption von Photonen innerhalb von 10^{-15} s führt jedoch zu einer Veränderung des Fluorophor-Dipolmomentes in Stärke und Richtung. Resultierend richten sich die Lösungsmittelmoleküle erneut aus, sodass die Dipolmomente antiparallel zueinander stehen. Dieser Prozess ist etwa 10^{-10} s nach Anregung des Fluorophors abgeschlossen. ^[4] Dies führt zu einer Stabilisierung des S_1 -Zustandes und somit zu einer energetischen Absenkung dessen. Nach Emission des Photons nimmt der Fluorophor wieder das Dipolmoment an, welches er vor der Anregung besaß. Da die Lösungsmittelmoleküle für diese Ausrichtung energetisch ungünstig orientiert sind, liegt dieser S_0 -Grundzustand bis zur Relaxation der Orientierung der Lösungsmittelmoleküle, in eine erneut antiparallel zum Fluorophor Dipolmoment orientierte Ausrichtung, energetisch höher als der Gleichgewichtszustand. Dies resultiert in einer zur unter 3.3.1 beschriebenen, durch *internal conversion* hervorgerufene, additionalen Rotverschiebung des Anregungslichtes in der Größenordnung von 20 bis 50 nm, abhängig von der Polarität des Lösungsmittels, welcher als STOKES-Shift bezeichnet wird. ^[4] Der Verlauf der Emissionsspektren des verwendeten Fluorophors Laurdan für einen Phasenübergang einer Lipidmembran ist beispielhaft ebenfalls in Abb. 3-7 dargestellt und zeigt für steigende Temperatur beziehungsweise für abfallenden Druck die Abnahme des Emissionsmaximums bei $\lambda = 440$ nm und eine Ausbildung eines neuem Emissionsmaximums bei $\lambda = 490$ nm.

3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Eine unverzichtbare Methodik in Biologie, Biophysik und Biochemie ist die Lichtmikroskopie. Die Lichtmikroskopie wird genutzt, um auf nichtinvasive Weise Untersuchungen an Geweben und Zellen in hoher Ortsauflösung und starker Vergrößerung durchzuführen. Diese Methode ist maßgeblich für grundlegende Entdeckungen, wie die Existenz von Zellen, Zellorganellen oder dem Zellkern, verantwortlich. ^[4] Im Folgenden soll die in dieser Arbeit genutzte Technik der Mikroskopie und ihre Modifikation für Hochdruckuntersuchungen an Biomembranen präsentiert werden.

3.4.1 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Die klassische Lichtmikroskopie unterliegt einigen Einschränkungen bezüglich Auflösung und Vergrößerungsvermögen, welche in der Wellenlänge und der Beugung des verwendeten Lichtes begründet sind. ^[4] Die wellenlängenabhängige Begrenzung des Auflösungsvermögens eines Lichtmikroskopes ist nach ABBE bestimmbar als kritischer Abstand d , in dem zwei Objekte gerade noch gut getrennt abgebildet werden können und ist berechenbar nach:

$$d = \frac{0,61 \lambda}{n \sin(\alpha)} \quad 3-18$$

Wobei λ die Wellenlänge des Lichtes, α den halben Öffnungswinkel des verwendeten Objektivs und n den Brechungsindex des Mediums zwischen Objektiv und Probe beschreibt. ^[4] Der Term $n \sin(\alpha)$ wird in der Optik als numerische Apertur (NA) bezeichnet und stellt eine grundlegende Eigenschaft der verwendeten Objektive dar, welche einen maximalen Wert von etwa 1,7 erreichen kann. ^[4] Aus Gleichung 3-18 wird deutlich, dass das Auflösungsvermögen eines Lichtmikroskopes mit sinkender Wellenlänge des verwendeten Lichtes steigt. Darüber hinaus kann das Auflösungsvermögen eines Lichtmikroskopes gesteigert werden, indem der Brechungsindex n zwischen Probe und Objektiv gesteigert wird. Dies kann durch die Verwendung eines Immersionsöls zur Mikroskopie erreicht werden, welches Brechungsindizes von $n \approx 1,5$ realisieren kann. ^[4] Im Allgemeinen ist der Brechungsindex $n < 2$ und liefert als numerische Apertur: ^[4]

$$d \approx \frac{\lambda}{2} \quad 3-19$$

Dies bedeutet, dass Objekte die weniger als eine halbe Wellenlänge des verwendeten Lichtes voneinander entfernt vorliegen, mittels Lichtmikroskopie nicht getrennt wahrgenommen werden können. Bei der Verwendung von blauem Licht von $\lambda = 400 \text{ nm}$ liegt die Auflösungsgrenze somit bei etwa 200 nm .^[4] In Kombination mit dem Auflösungsvermögen des menschlichen Auges, welches Objekte bis $0,2 \text{ mm}$ Distanz getrennt voneinander wahrnehmen kann, würde bei Verwendung dieser Wellenlänge eine 1000-fache Vergrößerung benötigt, um die Leistungsfähigkeit des Mikroskopes auszuschöpfen.^[4]

Aufgrund von Streuung und Beugung tritt bei der Fokussierung von Licht durch eine Linse stets Streulicht auf, was zu einer Unschärfe des erzeugten Bildes führt. Die Auflösung eines Mikroskopes kann mit Hilfe der Punktspreizfunktion (PSF, von engl. point-spread-function) beschrieben werden, die den Bereich angibt, in welchem ein idealisiertes, punktförmiges Objekt nach Abbildung durch ein System auftauchen kann. Die erreichbare laterale Auflösung eines konventionellen Mikroskopes kann anhand der Breite auf halber Maximalhöhe dieser Funktion (*LFWHM*, von engl. lateral full-width half-maximum) angegeben werden:^[62]

$$LFWHM_{\text{konv}} = 0,51 \frac{\lambda}{NA} \quad 3-20$$

Äquivalent hierzu lässt sich die axiale Auflösung des konventionellen Mikroskopes (*AFWHM*, von engl. axial full-width half-maximum) mittels der PSF bestimmen.^[62]

$$AFWHM_{\text{konv}} = 0,89 \frac{\lambda}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \quad 3-21$$

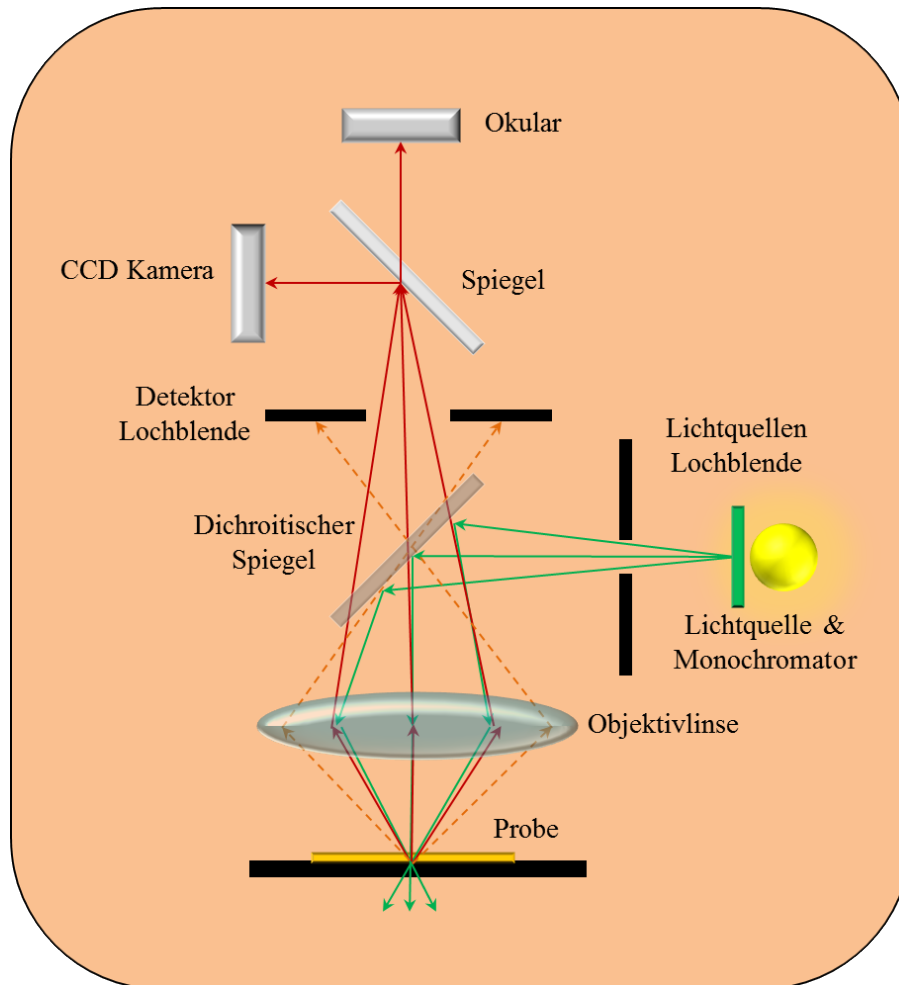


Abb. 3-8: Schematische Darstellung Fluoreszenzmikroskopie

Schematischer Aufbau eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops mit Anregungslicht (grün), Fluoreszenzlicht (rot) und außerfokalem Streulicht (gelb).

Um Streulichtbestandteile sowie Licht aus nicht fokussierten Ebenen zu eliminieren, werden in der konfokalen Laserscanningmikroskopie Lochblenden verwendet, wie sie in der schematischen Abbildung eines solchen Mikroskops in Abb. 3-8 dargestellt sind. Mit Hilfe dieser Lochblenden ist es bei einer rasterartigen Punkt-für-Punkt-Belichtung der Probe möglich, die außerfokalen Streulichtanteile aus dem Bild zu eliminieren. Hierzu wird die Probe mittels einer punktförmigen Lichtquelle bestrahlt, welche auf die erste Lichtquellen-Lochblende fokussiert wird. Dieses Licht wird auf einen dichroitischen Spiegel geleitet, welcher das Licht auf die Mikroskopoptik lenkt. ^[4] Durch die Objektivlinse wird das Licht in der Probe fokussiert, in der die dort verorteten Fluorophorsonden zur Fluoreszenz angeregt werden. Das aus der Probe emittierte, rotverschobene Fluores-

zenzlicht wird durch die Objektivlinse fokussiert und durch den dichroitischen Spiegel durch die Detektor-Lochblende zum Detektorsystem geführt. Wie in Abb. 3-8 gut zu erkennen ist, werden durch diese Lochblenden außerfokale Beiträge aus anderen Ebenen als der fokussierten Ebene aus dem Bild eliminiert.

Diese Methode bedarf im Vergleich zu konventioneller Lichtmikroskopie Lichtquellen hoher Energie, beispielsweise Laser, sowie einer Punkt-für-Punkt-Rasteraufnahme der Probe. Das Resultat der durch die Lochblenden hervorgerufenen Filterung der außerfokalen Beiträge zeigt sich deutlich in der Betrachtung des Auflösungsvermögens des Mikroskopes. Die lateralen und axialen Punktspreizfunktionen ergeben sich für diese Anordnung zu: ^[62]

$$LFWHM_{\text{konf}} = 0,37 \frac{\lambda}{NA} \quad 3-22$$

Und

$$AFWHM_{\text{konf}} = 0,64 \frac{\lambda}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \quad 3-23$$

3.4.2 Hochdruck-Fluoreszenzmikroskopie

Um die Eigenschaften von Lipid-Modellmembranen, insbesondere Struktur und Dynamik, unter extremen Einflüssen zu studieren, ist es nötig, neben der mit relativ einfachen Mitteln zu regulierenden Temperatur der Membranen auch den Druck als wichtigen thermodynamischen Parameter zu untersuchen. ^[63] Hohe Drücke beeinflussen den Hydrationsgrad, die Querschnittsfläche der Lipidmoleküle, sowie die Konformationsordnung der Bestandteile der Biomembranen, welche sich als hochsensitiv gegenüber dieses Parameters darstellen. ^[64-66] Insbesondere die lyotropen Phasenübergänge, die allgemeine Struktur der Modellmembransysteme, sowie die Interaktion mit additiven Proteinen oder anderen Agenzien stehen in dieser Arbeit im Fokus der Untersuchungen. Zur Untersuchung dieser Parameter ist somit eine Messzelle vonnöten, welche es erlaubt, diese hohen

Drücke für die Fluoreszenzmikroskopie zugänglich zu machen. Hierbei ist es von hoher Relevanz, die optische Auflösung der aufgenommenen Bilder, trotz baulich für die Druckstabilität notwendigen Materialstärken, aufrecht zu erhalten. Die in dieser Arbeit verwendete Zelle wurde nach dem Vorbild von BROOKS *et al.* durch N. ERWIN im Zuge ihrer Dissertation konstruiert und validiert. ^[10,67] Nähere Details zum Aufbau der Druckzelle sind den genannten Arbeiten zu entnehmen.

3.5 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS, von engl. dynamic light scattering) bietet als Methode die Möglichkeit, zeitaufgelöst Änderungen in der Lichtstreuung zu vermessen, die durch Suspensionspartikel ausgelöst werden. Hierdurch sind Untersuchungen der Translations-, Rotations- und intramolekularen Bewegungen von Biomolekülen möglich. ^[4] Im Allgemeinen bieten Lichtstreuexperimente abhängig von der Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes zudem das Potential, quantitativ Informationen über Form, Größe und Struktur von Biomolekülen in Lösung zu liefern. ^[4] Die Art der Lichtstreuung kann, abhängig davon, ob ein Energieübertrag stattfindet, grundsätzlich zwischen elastischer Streuung, wie der RAYLEIGH-Streuung, quasielastischer sowie unelastischer Streuung wie der RAMAN-Streuung unterschieden werden. Erstere soll aufgrund Ihrer Nutzung in den Streuexperimenten dieser Arbeit im Folgenden genauer beleuchtet werden:

Die RAYLEIGH-Streuung beschreibt die Interaktion von elektromagnetischer Strahlung mit kugelförmigen Partikeln, deren Größe unterhalb der Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes liegt und deren Absorption erst im ultravioletten Bereich stattfindet. ^[68] Bei Zusammentreffen von Lichtwelle und Partikel wird das Licht entsprechend der Polarisierbarkeit α des betreffenden Partikels gestreut, wobei das Verhältnis der Intensität des gestreuten Lichtes I_s zu der des eingestrahnten Lichtes I_0 nach ^[4,68]

$$\frac{I_s}{I_0} = \frac{\pi^2 \alpha^2}{\epsilon^2 r^2 \lambda^4} \frac{1 + \cos^2(2\theta)}{2} \quad 3-24$$

gegeben ist. Hierbei beschreibt λ die Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes, r den Abstand zum Partikel, ε die Influenzkonstante des Partikels und 2θ den Streuwinkel, in welchem die Intensität gemessen wird. Mit Hilfe der CLAUSIUS-MOSOTTI-Gleichung kann die Polarisierbarkeit des Partikels durch die Brechungsindizes n der Lösung ersetzt werden: [4,68]

$$\frac{N}{V}(\alpha - \alpha_{\text{Lösungsmittel}}) = \varepsilon_0(n^2 - n_{\text{Lösungsmittel}}^2) \quad 3-25$$

Die Extinktion bei der RAYLEIGH-Streuung zeigt somit eine $1/\lambda^4$ Abhängigkeit von der eingestrahnten Wellenlänge. [68] Praktisch bedeutet dies, dass Wellenlängen hoher Energie entsprechend ihrer kurzen Wellenlänge stärker an Partikeln gestreut werden, als die Wellen energiereicherer Strahlung.

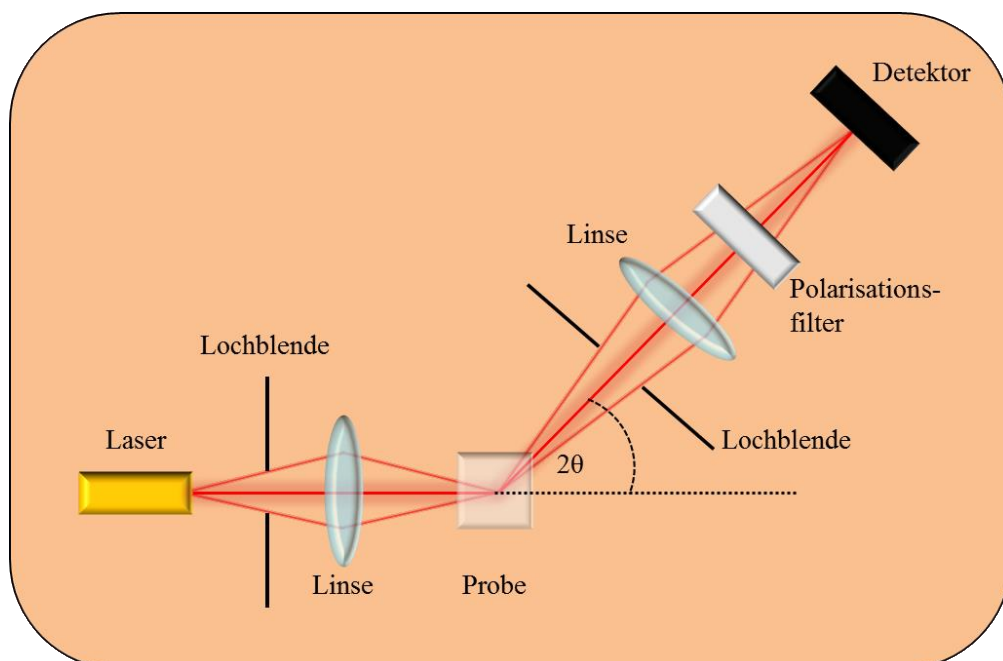


Abb. 3-9: Schematische Darstellung DLS

Schematische Darstellung der Messapparatur für dynamische Lichtstreuung. Abbildung adaptiert nach [4].

In Abb. 3-9 ist die Messanaordnung für die dynamische Lichtstreuung schematisch dargestellt. Hierbei wird der Lichtstrahl eines kontinuierlich arbeitenden Lasers auf eine Küvette mit der Probelösung gerichtet. ^[4] Um störende Lichteffekte durch Lichtbrechung an der Oberfläche der Küvette zu minimieren, muss hierfür der Brechungsindex des Küvettenmaterials bekannt sein um diesen softwareseitig mit einzubeziehen. Das von der Probe hervorgerufene Streulicht wird in einem Streuwinkel von 2θ von einem Detektorsystem bestehend aus Photonenvervielfacher und Photonenzähler detektiert. Eine zeitabhängige Analyse stellt im Gegensatz zur Aufsummierung der Zählimpulse den Unterschied zwischen der statischen und der dynamischen Lichtstreuung dar. ^[4] Trifft das Licht in der Probe auf Partikel, welche den oben genannten Anforderungen der RAYLEIGH-Streuung genügen, so wird ein kleiner Teil des eingeschickten Lichtes in alle Richtungen gestreut.

Die Streuung resultiert aus der Interaktion der eingesandten elektromagnetischen Welle mit den Elektronenwolken des Partikels, wodurch ein entsprechender oszillierender Dipol induziert wird. ^[4] Die hieraus resultierenden, emittierten elektromagnetischen Wellen können mit den emittierten Wellen benachbarter Partikel im Illuminationsvolumen interferieren, wodurch am Detektor ein vom relativen Abstand der Streuzentren abhängiges Interferenzmuster aufgenommen wird. Durch die BROWNSche Molekularbewegung und den daraus resultierenden veränderlichen, relativen Abständen der Streuzentren resultieren stetig variierende Interferenzen im Illuminationsvolumen, was sich in einer Fluktuation der Zahl der unter dem Winkel 2θ detektierten Photonen mit der Zeit äußert. ^[4]

3.5.1 Partikelgröße

Die dynamische Lichtstreuung wird in der Biophysik oft zur Bestimmung der Partikelgröße kolloidaler Systeme genutzt. Hierfür wird die Intensitätskorrelationsfunktion $C(\tau)$ auf die aufgenommenen Photonenzahlen angewendet, in deren Berechnungsverlauf die relativen Abstände der Streuzentren von zentraler Bedeutung sind. Die relativen Abstände der Streuzentren lassen sich mit Hilfe des Streuvektorbetrags Q_S als $2\pi/Q_S$ darstellen, wobei für Q_S

$$Q_S = n \left(\frac{4\pi}{\lambda} \right) \sin \frac{\theta}{2} \quad 3-26$$

mit dem Brechungsindex n , der Wellenlänge λ und dem Streuwinkel θ gilt. ^[4,9] Kleine Werte für Q_S entsprechen großen Abständen der Streuzentren, wodurch aus dem DLS-Signal Informationen über die Translationsbewegung des Moleküls erhalten werden können. Hohe Werte für Q_S und somit große Werte für 2θ entsprechen Fluktuationen in der Größe der Partikel. Zusätzlich können in diesem Fall Informationen über Molekülrotation und intramolekulare Bewegungen ermittelt werden. ^[4] Bei der anzuwendenden Autokorrelationsfunktion wird die Photonenintensität des Streulichtes zu einer bestimmten Zeit t_i mit der Intensität einer späteren Zeit $t_i + \tau$ multipliziert, bei der τ die Korrelationszeit beschreibt. ^[4] Es folgt eine Aufsummierung und Normierung über n Signale gleicher Korrelationszeit nach: ^[4]

$$C(\tau) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I_s(t_i) \cdot I_s(t_i + \tau) \quad 3-27$$

Für $\tau = 0$ resultiert die Korrelationsfunktion der mittleren quadratischen Streuintensität $\langle I_s^2 \rangle$ als Maximum von $C(\tau)$. Bei hohen Korrelationszeiten treten im Messsignal unkorrelierte Photonenintensitäten auf, wodurch die Korrelationsfunktion in diesem Fall das Quadrat der mittleren Intensität $\langle I_s \rangle^2$ angibt. ^[4] Bei nicht periodischer Intensitätsfluktuation $I_s(t_i)$ fällt die Korrelationsfunktion monoton von $\langle I_s^2 \rangle$ auf $\langle I_s \rangle^2$ ab, was durch die SIEGERT-Gleichung beschrieben ist: ^[4,69]

$$\frac{C(\tau)}{\langle I_s \rangle^2} = 1 + A|g_1(\tau)|^2 \quad 3-28$$

wobei A eine Konstante darstellt. Die Funktion $g_1(\tau)$ kann in verdünnten, monodispersen Lösungen als

$$g_1(\tau) = e^{-DQ^2\tau} \quad 3-29$$

dargestellt werden, wobei D den Translationsdiffusionskoeffizienten des betrachteten Partikels beschreibt. ^[4] Mit Hilfe der STOKES-EINSTEIN-Gleichung

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad 3-30$$

kann nun anhand der BOLTZMANN-Konstanten k_B , der Temperatur T sowie der Viskosität der Lösung η der hydrodynamische Radius eines als sphärisch angenommenen Partikels R_h bestimmt werden. ^[4,9,69]

3.5.2 Zeta-Potential

Die Methode der dynamischen Lichtstreuung bietet weitergehend die Möglichkeit der Bestimmung des so genannten Zeta (ζ)-Potentials, welches bei der Betrachtung von Biomembranen aufgrund der natürlich vorkommenden, anionischen Phospholipide von großem Interesse ist. Eine schematische Darstellung dieses Potentials und dessen Ursprung ist in Abb. 3-10 einzusehen. An der Oberfläche eines geladenen Partikels mit dem Oberflächenpotential Ψ_0 lagern sich durch Adsorptionsvorgänge Ionen der entgegengesetzten Ladung an und bilden somit eine elektrische Doppelschicht um das Partikel herum. Diese wird als STERN-Schicht bezeichnet und ist relativ fest mit der Partikeloberfläche verbunden. ^[4] Umgeben ist diese Doppelschicht von der GOUY-CHAPMAN-Schicht, welche sich von der STERN-Schicht bis an den umgebenden, elektrisch neutralen Lösungsmittelraum erstreckt und sich als diffuse, bewegliche Schicht darstellt. ^[4] Diffundiert ein solches Partikel frei in Lösung, so wird diese diffuse Doppelschicht in Teilen abgeschert, was zur Ausbildung einer Scherschicht führt. ^[4] Das elektrische Potential an eben dieser Scherschicht wird als ζ -Potential bezeichnet und gibt Auskunft über Adsorption von Ionen an die geladene Partikeloberfläche. Die Bestimmung dieses Potentials erfolgt über die Wanderungsgeschwindigkeit der geladenen Partikel in einem elektrischen Feld nach HELMHOLTZ-SMOLUCHOWSKI nach: ^[4]

$$\zeta = \frac{\eta v}{\varepsilon E_{el}} \quad 3-31$$

wobei η die Viskosität, v die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen, ε die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels und E_{el} die elektrische Feldstärke beschreibt. ^[4]

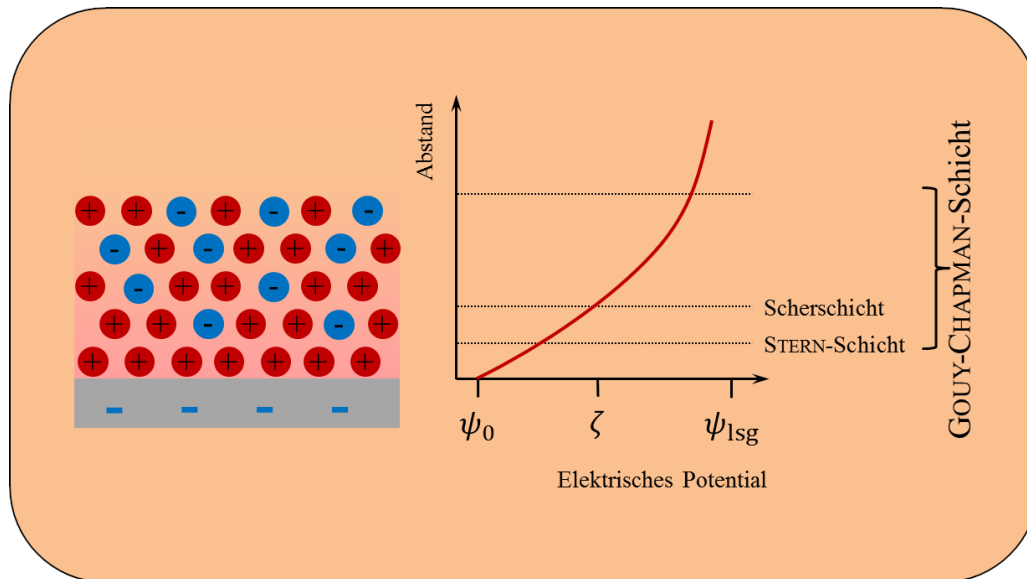


Abb. 3-10: Schematische Darstellung Zeta-Potential

Schematische Darstellung des ζ -Potentials, der STERN- sowie der Scherschicht und deren Lokalisation über einer elektrisch geladenen Grenzfläche.

Die Teilchengeschwindigkeit kann mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung unter der Durchführung einer Laser-Doppler-Elektrophorese bestimmt werden. ^[9] Hierzu passieren die geladenen Partikel entsprechend des angelegten elektrischen Feldes den Laserstrahl und streuen, wie oben beschrieben, das eingesendete Licht. Aufgrund des Dopplereffektes kommt es durch die Teilchengeschwindigkeit zu einer Frequenzverschiebung dieses Lichtes. ^[4] Diese Frequenzverschiebung ist aufgrund ihrer sehr geringen Ausprägung mit den üblichen spektroskopischen Verfahren nahezu nicht detektierbar. Aus diesem Grunde wird das Interferenzprinzip verwendet, bei der das frequenzverschobene Licht mit dem Licht der Laserquelle interferiert, was sich als Änderung der Intensität des Lichtes äußert. ^[9] Die Frequenz der Schwächung der Lichtintensität entspricht exakt der Differenzfrequenz des Dopplereffektes. ^[9] Die hieraus bestimmbare Teilchengeschwindigkeit v ist laut Gleichung 3-31 abhängig von der Oberflächenladung an der Scherschicht des Partikels, sodass hieraus das ζ -Potential bestimmt werden kann. ^[4] Detailliert erfolgt die Messsignalauswertung über die Anzahl der Interferenzstreifen pro Zeiteinheit und eine Korrelationsfunktion entsprechend einer periodischen Fluktuation. Die Überlagerungsanteile durch statistische BROWNSche Molekularbewegung, welche zu einer Verbreiterung der gemessenen Frequenz führen, kann als vorherige Analyse der Probe ohne anliegendes

elektrisches Feld subtrahiert werden. ^[9] Das hiermit ermittelte Mobilitätsspektrum kann nach HENRY als Zeta-Potentialverteilung der Form ^[9]

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} f(\kappa r_k) \quad 3-32$$

mit der Mobilität U_E , dem Zeta-Potential ζ , der Dielektrizitätskonstante ε , dem Viskositätskoeffizienten η , der Dicke der elektrischen Doppelschicht κ sowie dem Kugelradius der kolloiden Teilchen r_k dargestellt werden. Anwendung der Gleichung nach SMOLUCHOWSKI bei Partikeln eines Radius über 20 nm liefert ^[9]

$$\zeta = \frac{U_E \eta}{\varepsilon} \quad 3-33$$

was unter Anwendung von $U_E = v/E_{el}$ in Gleichung 3-31 übergeht.

3.6 Rasterkraftmikroskopie

Die Analyse von Biomembranen auf der Nanometerskala ist von großem Interesse im Hinblick auf die Ausbildung und Funktionalität von *lipid-rafts*. Hier stößt die Standard-Lichtmikroskopie jedoch an ihre Grenzen, weswegen für Ortsauflösungen dieser Größenordnung die Methode der Rasterkraftmikroskopie (AFM, von engl. atomic-force-microscopy) Anwendung findet. Diese Art der Mikroskopie stellt die Weiterentwicklung der Rastertunnelmikroskopie dar, welche nur zur Untersuchung elektrisch leitender Oberflächen geeignet ist. Hierfür wird im Allgemeinen eine mikroskopisch kleine Spitze mittels Federkraft auf die Oberfläche einer Probe gebracht, welche das Oberflächenprofil der Probe abrastert. ^[4]

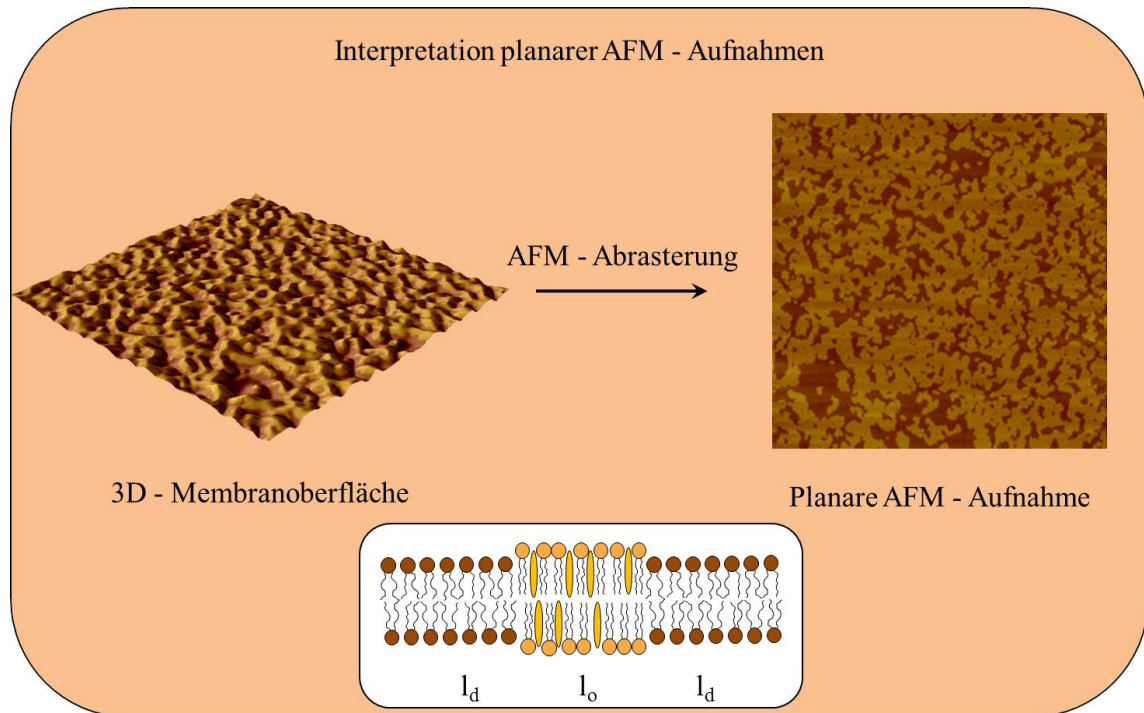


Abb. 3-11: Interpretation planarer AFM-Aufnahmen

Zeigt die Überführung einer dreidimensionalen Membranoberfläche in ein planares AFM-Bild. Die hellen Bereiche repräsentieren höherliegende Bereiche gemischter Lipidzusammensetzung und somit die l_o -Phasen höherer Ordnung. Die dunklen Bereiche repräsentieren dementsprechend die ungeordneteren, flacheren l_d -Phasen gemischter Lipidzusammensetzung.

Die Spitze wird in den heute gängigen Methoden als nanoskopisch kleine Spitze an einer Blattfeder aus Si_3N_4 realisiert, welche den Lichtstrahl eines Lasers reflektiert. ^[4] Diese Anordnung wird aufgrund seiner freischwingenden Bauart als Cantilever bezeichnet. Die Bewegung der Spitze aufgrund des Oberflächenprofils der Probe resultiert in einer Veränderung des Reflexionswinkels dieser Blattfeder, und führt somit zu einer Bewegung des Lichtstrahls auf einer vierteiligen Detektordiode. ^[4,70] Die Abb. 3-11 zeigt die Überführung einer dreidimensionalen Membranoberfläche eines heterogenen *raft*-Gemisches in eine planare AFM-Rasterabbildung. Die hellen Bereiche repräsentieren höherliegende Bereiche, und somit die l_o -Phasen höherer Ordnung. Die dunklen Bereiche repräsentieren dementsprechend die ungeordneteren, flacheren l_d -Phasen.

In Abb. 3-12 ist schematisch der Aufbau der Rasterkraftmikroskopie an einer Biomembran dargestellt. Entsprechend der Position des Lasers auf der Diode liefern die Diodenquadranten unterschiedliche Stromwerte, deren Differenzen, bei konstanter z-Position des zur Feedbackgeneration genutzten Piezoscanners, das Messsignal darstellen und zur Be-

rechnung eines Höhenprofils genutzt werden können. Wird eine konstante Auflagekraft des Cantilevers an der Probe angelegt, so wird die Oberflächentopographie der Probe direkt durch das Steuersignal des Piezoscanners erreicht. [4]

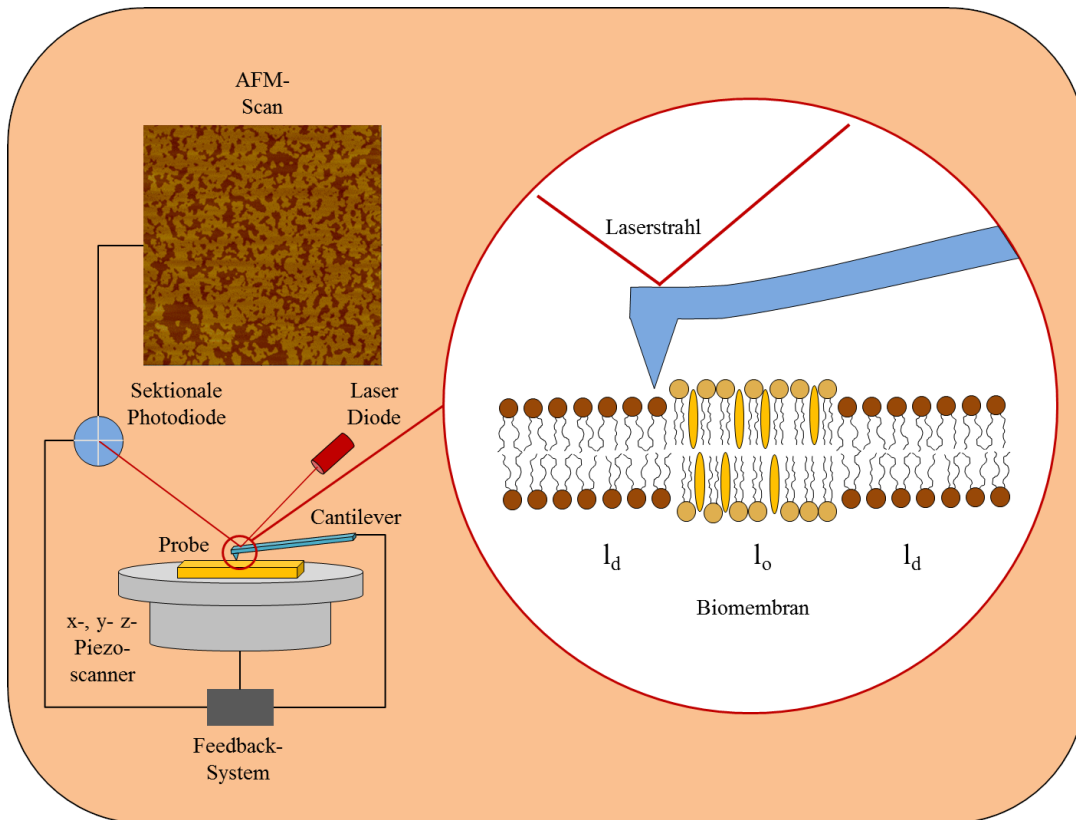


Abb. 3-12: Schematische Darstellung AFM

Schematische Darstellung des Aufbaus der Rasterkraftmikroskopie an einer Biomembran mit AFM-Scan eines heterogenen Lipidsystems.

Die Messung der Oberflächentopographie ist somit stark von den Wechselwirkungskräften zwischen Cantileverspitze und Probe abhängig. Diese lassen sich näherungsweise mit dem LENNARD-JONES-Potential, wie es in Abb. 3-13 dargestellt ist, beschreiben. Dieses setzt sich bei Annäherung zweier Teilchen aus den bis zur Gleichgewichtsposition r_0 zunächst attraktiven VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen, und bei weiterer Annäherung an die Probe durch elektrostatische- und durch das PAULI-Verbot hervorgerufene, abstoßende Kräfte zusammen. [4]

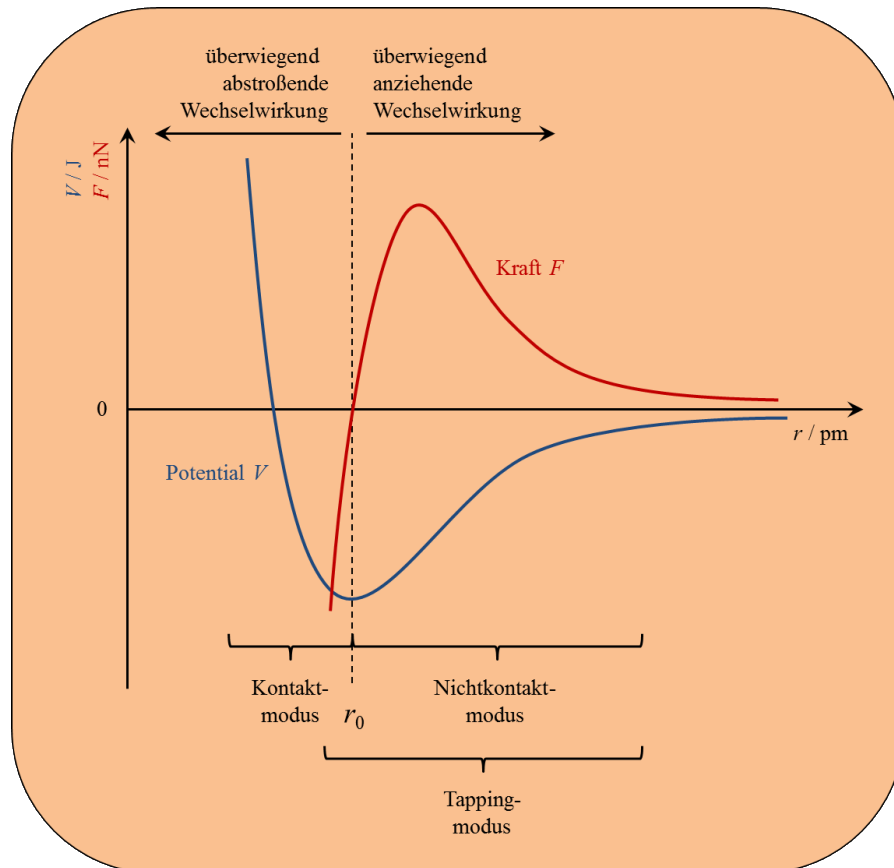


Abb. 3-13: Schematische Darstellung Potentialverlauf verschiedener AFM-Modi

Schematische Darstellung des LENNARD-JONES-Potentials, der zugehörigen Kraft zwischen AFM-Spitze und Probenoberfläche und der Arbeitsbereiche verschiedener Messmodi. Abbildung adaptiert nach [4].

Der oben beschriebene Kontaktmodus der Rasterkraftmikroskopie arbeitet in dem Bereich der maximalen Annäherung und somit eines hohen Potentials. Bei der Anwendung der Rasterkraftmikroskopie auf Biomembranen in Flüssigkeiten birgt diese Methode jedoch Nachteile. Zum einen werden durch die weitreichenden VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen neben den anziehenden auch stets abstoßende Wechselwirkungskräfte greifend, was zu einer Verringerung der Ortsauflösung der Methode führt. [4] Zum anderen resultiert im Kontaktmodus durch Oberflächenkontakt der Messspitze mit der weichen Biomembran eine Zerstörung der zu untersuchenden Probe in diesen Bereichen. Somit wird für die Untersuchung solcher Systeme der Nichtkontaktmodus, beziehungsweise der so genannte *tapping*-Modus verwendet. Im ersten Fall wird die Spitze des Cantilevers außerhalb des Einflussbereiches des Potentials nahe der eigenen Resonanzfrequenz zum Schwingen angeregt, woraufhin die Schwingungsamplitude vermessen

wird.^[4] Wird diese Spitze nahe der Eigenfrequenz ν_0 in die Nähe der Oberfläche gebracht, so überlagert sich dem Spitzenpotential der Eigenfrequenz das VAN-DER-WAALS-Potential der Oberfläche, was zu einer Erniedrigung der Resonanzfrequenz, $\Delta\nu = \nu - \nu_0$, sowie der Amplitude der Schwingung der Spitze führt.^[4]

Die Federkonstante des Cantilevers k ist nur abhängig von Material und Geometrie der eingesetzten Messspitze und somit unabhängig vom umgebenden Medium. Jedoch beeinflusst die Viskosität der Umgebung die resultierende Schwingung in hohem Maße, was für den Einsatz in Flüssigkeiten nicht zu vernachlässigen ist.^[70] Die Schwingung des Cantilevers durch periodische, externe Anregung lässt sich als gedämpfter, durch eine oszillierende externe Kraft $F(t)$ angeregter, harmonischer Oszillator beschreiben:^[70]

$$F(t) = m\ddot{z} + k_c\dot{z} + \gamma z = F_0 \cos(\omega t) \quad 3-34$$

Hierbei bezeichnet z die vertikale Auslenkung der Cantileverspitze, ω die Schwingungsfrequenz, m die Masse, k_c die Federkonstante des Cantilevers, F_0 die Amplitude der Schwingung bei einer gegebenen Zeit t und γ die Dämpfungskonstante der Schwingung. Die Dämpfungskonstante γ lässt sich in Abhängigkeit des Qualitätsfaktors Q sowie der Schwingungsfrequenz des Cantilevers im Vakuum ω_0 darstellen als:^[70]

$$\gamma = \frac{m\omega_0}{Q} \quad 3-35$$

Die Resonanzfrequenz in einer Flüssigkeit ω_r lässt sich durch

$$\omega_r = \omega_0 \sqrt{1 - \frac{1}{2Q^2}} \quad 3-36$$

in Abhängigkeit der freien Resonanzfrequenz und des Qualitätsfaktors beschreiben. [70]
Die Lösung der Differentialgleichung 3-34 liefert die Gleichungen zur Berechnung der Amplitude und des Phasenunterschiedes φ der Schwingung: [70]

$$A(\omega) = \frac{F_0}{m \sqrt{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \left(\frac{\omega\omega_0}{Q}\right)^2}} \quad 3-37$$

und

$$\tan(\varphi) = \frac{\frac{\omega\omega_0}{Q}}{\omega_0^2 - \omega^2} \quad 3-38$$

Die Anwendung des *tapping*-Modus erweitert diese Methode um eine kurzfristige, einmal pro Schwingung auftretende Berührung der Oberfläche, welche zusätzlich zur Topographie Informationen über Eigenschaften und Zusammensetzung der Oberfläche sowie über die charakteristischen Dämpfungseigenschaften verschiedener Materialien liefern kann. [4]
Dieser Modus liefert aufgrund des geringen Abstandes zur Probenoberfläche eine nahezu molekulare Auflösung der Probe, birgt jedoch aufgrund des kurzzeitigen Kontaktes erneut die Gefahr einer Zerstörung der Probenoberfläche oder der Cantileverspitze. Aufgrund der guten Nutzbarkeit in Flüssigkeitszellen und der hohen Auflösung wird diese Methode standardmäßig für die Untersuchung an Biomembranen in Flüssigkeiten eingesetzt. [4]

3.7 Filmwaagenmessung

Neben den oben aufgeführten Methoden zur Untersuchung verschiedener Morphologien von Lipiddoppelschichten ist die Charakterisierung monomolekularer Lipidfilme von Interesse. Insbesondere das Kompressionsverhalten amphiphiler, oberflächenaktiver Moleküle steht bei den Untersuchungen mit der Filmwaage im Fokus. Diese Untersuchungsmethode geht zurück auf PÖCKELS und LANGMUIR, welche diese Methode entwickelt und weiterentwickelt haben. [4] Diese LANGMUIR-PÖCKELS-Filmwaage betrachtet den Spreitungsdruck der oberflächenaktiven Substanz auf der Lösungsmittel-Luft-

Grenzschicht, welcher sich als Differenz der Oberflächenspannung des reinen Lösungsmittels (im Falle von Wasser 72 mN), sowie der Oberflächenspannung der filmbedeckten Grenzfläche darstellt: [4]

$$\Pi_S = \sigma_0 - \sigma \quad 3-39$$

Hierbei stellt Π_S den Spreitungsdruck beziehungsweise die Spreitungskraft des oberflächenaktiven Moleküls, σ_0 die Oberflächenspannung des reinen Lösungsmittels und σ die Oberflächenspannung der filmbedeckten Oberfläche dar. [4]

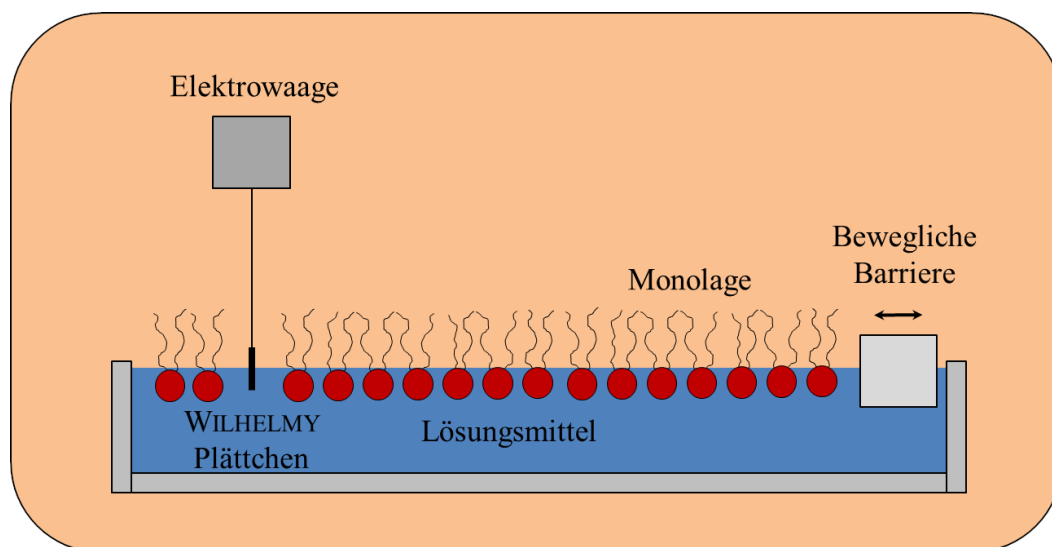


Abb. 3-14: Aufbau einer Filmwaage zur Messung des Spreitungsdruckes

Zeigt den schematischen Aufbau einer Filmwaage zur Ermittlung des Spreitungsdruckes einer oberflächenaktiven Substanz durch Kompression mit Hilfe beweglicher Barriere und Detektion des Oberflächendrucks durch eine WILHELMY-Waage. Abbildung adaptiert nach [4].

Um die Kompressionseigenschaften einer oberflächenaktiven Monolage zu charakterisieren, wird ein Messaufbau wie in Abb. 3-14 dargestellt verwendet. Hierbei wird die oberflächenaktive Substanz auf einem Lösungsmittel gespreitet. Die Oberflächenspannung, und nach obenstehender Gleichung auch der Spreitungsdruck, wird hierbei mittels eines WILHELMY-Plättchens bestehend aus Filterpapier und einer Elektrowaage ermittelt. Durch die bewegliche Barriere wird die Monolage der filmbildenden Substanz auf der Lösungsmittelgrenzfläche komprimiert und der resultierende Oberflächendruck detektiert. [4]

Alternativ kann die Konzentration des Lipides in definierter Menge gesteigert werden, wodurch die kritische Mizellbildungskonzentration der Substanz bestimmt werden kann. Mögliche Resultate dieser Methoden sind schematisch in Abb. 3-15 für ein fiktives Lipid dargestellt.

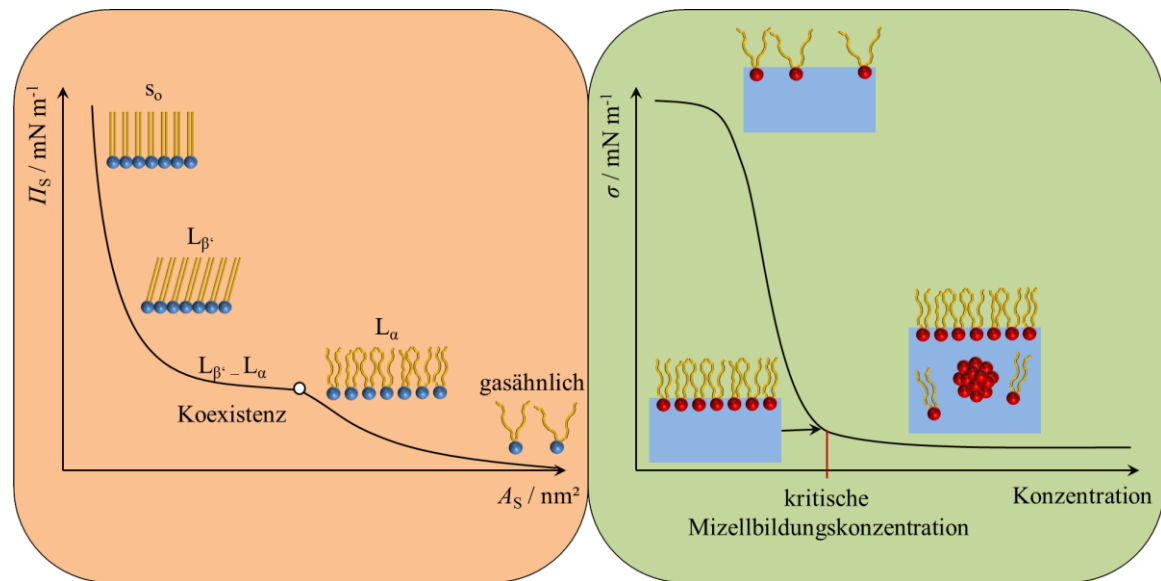


Abb. 3-15: Schematische Darstellung Lipidisotheime sowie kritische Mizellbildungskonzentration

Zeigt schematisch in der linken Hälfte eine Isotherme bei Kompression eines Lipidfilmes auf der Lösungsmitteloberfläche. Hierbei durchläuft der Film bei Kompression die dargestellten Phasenübergänge. Die rechte Hälfte zeigt die Oberflächenspannung als Funktion steigender Lipidkonzentration. Wird nach der Sättigung der Oberfläche weiteres Lipid zugegeben, so bilden sich im Lösungsmittel mizellare Strukturen.

Die Druck-Flächen Isotherme in der linken Hälfte der Abb. 3-15 zeigt das Durchlaufen der verschiedenen Phasenübergänge des Lipidfilms als Reaktion auf die Veränderung der verfügbaren Fläche. Die rechte Hälfte der Abb. 3-15 zeigt die Messung der Oberflächenspannung bei steigender Lipidkonzentration. Hierbei sinkt diese zunächst signifikant bei Zugabe geringer Mengen Lipid. Nach Erreichen der Sättigung der verfügbaren Oberfläche wird die kritische Mizellbildungskonzentration überschritten, was in der Ausbildung mizellarer Strukturen im Lösungsmittel resultiert. Ab diesem Punkt ist bei weiterer Zugabe an Lipid keine weitere Verringerung der Oberflächenspannung zu beobachten. Für DPPC liegt diese Konzentration bei $10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$, wobei dieses anstelle mizellarer Strukturen aufgrund des Packungsparameters des Moleküls zur Ausbildung von Doppelschichten in Vesikeln neigt. ^[4]

4 ZIELSETZUNG

Vorstellung der Projekte

Die Erkenntnis über die Relevanz der Lipidmembran für biologische Prozesse und die Funktionalität der Zelle ist in den vergangenen Jahrzehnten durch biophysikalische Forschung und darauf basierend neu entwickelten Theorien und Modellen stetig gestiegen. Das Verständnis der Membran und der membranassoziierten Prozesse geht mittlerweile weit über die Bereitstellung einer zweidimensionalen Matrix zur Aufnahme von Membranproteinen, anderen Komponenten oder der Abgrenzung des intrazellulären Bereiches gegen externe Medien hinaus. Aus diesem Grunde ist es von hohem Interesse, Interaktionen dieses essentiellen Grundbausteins zellulären Lebens mit potentiell vorliegenden Agenzien, sowie die Modifikationen dieser Membranen durch verschiedene Additive zur Optimierung gewünschter Prozesse zu untersuchen und zu verstehen. Darüber hinaus ist die Optimierung der Modellsysteme hin zu naturmimetischeren Aufbauten durch Anpassung der Lipidzusammensetzung oder durch die Nachahmung intrazellulärer, makromolekularer Verdichtung für realistischere Untersuchungen *in vitro* Ziel aktueller biophysikalischer Entwicklung.

Folgend sollen die Ziele der in dieser Arbeit präsentierten Forschungsprojekte aufgezeigt werden:

I) EINFLUSS VON Y^{3+} AUF MODELLMEMBRANEN

Ziel dieses Projektes ist die Untersuchung des Einflusses des - auf die Ionenradien bezogen - calciumähnlichen, trivalenten Yttriumions auf das thermo-, sowie barotrope Phasenübergangsverhalten neutraler sowie anionischer Lipidmembranen unterschiedlicher Komplexität. Weitergehend sollen die zu Grunde liegenden Mechanismen zwischen der stattfindenden Interaktion diffe-

renziert und der Einfluss dieser auf die laterale Ordnung der l_0 - und der l_d -Phase komplexer, heterogener Membranen auf der Makro- und Mikroebene, sowie der Einfluss auf die Kopfgruppenhydratation der Membranen untersucht werden.

II) MEMBRAN-INTERAKTIONEN UND TRANSFEKTIONSVERMÖGEN IMIDAZOLIUMBASIERTER LIPIDE

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank Glorius vom Organisch Chemischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster soll im Rahmen dieses Projektes der Einfluss neuartiger, imidazoliumbasierter Lipide auf die biophysikalischen Eigenschaften von Modellmembranen unterschiedlicher Komplexität und Ladung untersucht werden. Hier sollen insbesondere der Einfluss dieser Moleküle auf thermotropes Phasenverhalten, Änderung der lateralen Ordnung des Lipidsystems, Einbaueffizienz sowie Einflüsse auf Morphologie und Phasenseparationsverhalten komplexer Membrantypen erforscht und eingeordnet werden.

In einem weiteren Schritt soll ein weiteres, artifizielles, lipidartiges Molekül auf Imidazoliumbasis, welches speziell zur potentiellen Induktion von Membranfusions- und Transfektionsprozessen entwickelt wurde, auf Einbauverhalten, Einflüsse auf die laterale Ordnung verschiedener Membransysteme, sowie die Morphologie und das Phasenseparationsverhalten dieser untersucht werden. Darüber hinaus sollen Studien zum Membranfusionspotential dieses Moleküls und der Nachweis auftretender Membranfusion unter Verwendung des Moleküls durchgeführt werden.

III) EINFLUSS DES WÄSSRIGEN ZWEI-PHASEN-SYSTEMS PEG/DEXTRAN AUF MODELLEMEMBRANEN

Ziel dieses Projektes ist die Untersuchung des Einflusses des wässrigen Zwei-Phasen-Systems PEG/Dextran als Modellsystem für zytosolische, makromolekulare Verdichtung, sowie membran-lose Phasenseparation auf Morphologie und Phasenseparationsverhalten naturmimetischer, anionischer Modellmemb-

ranen, unter anderem unter dem Einfluss hoher hydrostatischer Drücke. Hierzu soll zunächst das barotrope Phasenseparationsverhalten einer heterogenen, anionischen Modellmembran charakterisiert werden, um in nächster Instanz mit dem Phasenverhalten der gleichen Membran unter Einfluss des wässrigen Zwei-Phasen-Systems verglichen zu werden. Zudem soll in Abhängigkeit des Separationsverhaltens des PEG/Dextran-Systems die Morphologie sowie das Phasenverhalten der heterogenen *raft*-Membran untersucht werden. In einem nächsten Schritt soll die Untersuchung des barotropen Phasenverhaltens der anionischen Membran unter vorheriger Separation des PEG/Dextran-Systems zur Nachahmung makromolekularer Verdichtung unter Beobachtung des Phasenseparationsverhaltens des Membransystems durchgeführt werden.

5 EINFLUSS VON Y^{3+} AUF MODELLMEMBRANEN

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse sind publiziert in:

S. Bornemann, M. Herzog und R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2019**, *21*, 5730-5743

5.1 Einleitung

Die Art und Weise, in welcher multivalente, insbesondere trivalente Kationen wie Y^{3+} , an biologische Membranen binden, ist aufgrund ihrer teils ausgeprägten Einflüsse auf Stabilität, Dynamik und Struktur der Lipiddoppelschichten von großem Interesse. [71–80] In den vergangenen Jahren wurden in erster Linie die Einflüsse häufig auftretender, biologisch relevanter Kationen wie Mg^{2+} , Ca^{2+} oder Al^{3+} untersucht. [80,81] Da der Anteil an Yttrium sowie an trivalenten Y^{3+} - Ionen in Natur und Biologie äußerst gering ist, bestehen über die Einflüsse dieses Ions nur wenige Informationen. Allerdings führten die Entwicklungen sensiblerer analytischer Methoden in den vergangenen Jahren zu einem Informationsgewinn über das Vorkommen dieses Metalls, sodass ein Anstieg der Konzentration an Yttrium in verschiedenen Bereichen der Natur durch vulkanische Aktivität, Abgasreste, radioaktiven Zerfall und generelle Verschmutzung von Luft und Wasser detektiert werden konnte. [82,83] Aus diesem Grund steigt parallel zu diesen Erkenntnissen die Relevanz und das Interesse der Untersuchung der Einflüsse dieses Ions auf biomolekulare Systeme. Zudem zeigt sich ein ansteigender Trend der Nutzung von Übergangsmetallen in Technologie und Medizin. [84,85] Radioaktive Isotope des Yttriums werden so bereits in einer Vielzahl von medizinischen Anwendungen eingesetzt, zu denen beispielsweise die Nutzung des ^{86}Y -Citrates als Strahlungsapplikator im Falle von Prostatakrebs sowie unter anderem die Nutzung von ^{90}Y -Isotopen in der Behandlung von Leberkarzinomen zählen. [86,87] Da Y^{3+} - Ionen aufgrund der Vergleichbarkeit in Ionenradius, Ligandenaustauschrate und Koordinationszahlen die biochemischen Interaktionen von Ca^{2+} mit Biomembranen imitieren könnten, liegt der Fokus dieser Untersuchung auf diesem Ion, um detaillierte Informationen über die Interaktion von Y^{3+} mit Modellmembranen und deren temperatur- und druckabhängiges Phasenverhalten zu erlangen. [88,89] Da bekannt ist, dass Y^{3+} - Ionen stabile Komplexe mit phosphorhaltigen Anionen sowie mit phosphathaltigen

Liganden über Koordination an die Sauerstoffatome bilden, können intensive Wechselwirkungen mit Phospholipiden vergleichbar mit denen durch Ca^{2+} oder La^{3+} erwartet werden, welche ähnliches komplexometrisches Verhalten zeigen. ^[90-92] BINDER et al. konnten zeigen, dass die ionische Bindungsaffinität an die Kopfgruppenregion der Lipidschicht offenbar der HOFMEISTER-Serie folgt, sodass hoch geladene Kationen mit starken chaotropen Eigenschaften dazu neigen, aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen, direkt an die Membran zu binden, um somit möglicherweise die Fusion von Vesikeln zu unterstützen oder einzuleiten. ^[71] Somit stellt sich die Frage, ob die hoch geladenen Y^{3+} -Ionen ähnlich wie Ca^{2+} in die Kopfgruppenregion der Lipiddoppelschicht eindringen und direkt an die dort verorteten, anionischen Gruppen binden, oder ob sich die Ionen wie beispielsweise das divalente Kation Mg^{2+} verhalten, welchem dieses Attribut zu fehlen scheint. ^[71,90]

Gemeinhin sind Ionen dafür bekannt, das natürliche Wasserstoffbrückennetzwerk des Wassers inklusive des Hydratationswassers an Membran-Grenzflächen zu schwächen, was häufig vergleichbar zu durch Druck oder Temperatur induzierten Effekten der Lipidmembran führt. ^[93] Solche lyotropen Phasenübergänge in Lipidschichten sowie die Bildung von Lipid-Domänen sind von hoher Relevanz für den Materialfluss sowie den Signaltransport in die biologische Zelle hinein und aus der biologischen Zelle heraus, und können in hohem Maße durch Ionenbindung an die Kopfgruppenregion der Lipiddoppelschicht modifiziert werden. ^[1,71,94] Abhängig von der Zusammensetzung der Lipiddoppelschicht und ihrer Oberflächenladungsdichte besteht durch die Ionenanbindung auch die Möglichkeit der Phasentrennung in der Doppelschicht. ^[95,96] Bei Betrachtung kationischer Einflussfaktoren ist davon auszugehen, dass Effekte auf Modellmembranen mit negativer Oberflächenladung aufgrund starker elektrostatischer Wechselwirkungen mit den anionischen Kopfgruppen deutlicher ausgeprägt sind als im Falle neutraler Modellmembranen. ^[90,97]

Aufgrund der wichtigen Rolle der Metallionen bei Formänderungen von Vesikeln, final resultierend in potentieller Membranfusion sowie der Unterstützung von Transportprozessen, erfuhren auch diese in den letzten Jahren steigendes Interesse. ^[92] Es wurde beispielsweise gezeigt, dass trivalente Lanthanid-Ionen die Konformation von Lipiddoppelschichten beeinflussen, deren Hauptphasenübergangstemperatur erhöhen, Formveränderung der Vesikel hervorrufen sowie zur Porenbildung in diesen Vesikeln führen. ^[98] In

vergleichbarer Weise scheint Eu^{3+} eine wichtige Rolle in der Elektrofusion von Lipidvesikeln zu spielen, was neue Möglichkeiten in Wirkstofftransport sowie Gentransfer oder für die Nutzbarmachung von Lipidvesikeln als Mikroreaktoren erschließt. [90,97,99] Im Gegensatz dazu wurde bei bestimmten divalenten Kationen, wie Zn^{2+} , eine Aggregation der Vesikel anstelle der Fusion beschrieben, wohingegen für weitere divalente Kationen keinerlei vergleichbare Effekte auf Biomembranen beobachtet werden konnten. Somit stellen offensichtlich neben der Ladung des Ions weitere Eigenschaften wie Ionenradius, Polarisierbarkeit, Hydratationsstärke sowie die Neigung zur Komplexbildung gewichtige Einflussfaktoren dar. [71,90]

In den in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen sollte der Einfluss von trivalenten Y^{3+} -Kationen auf Struktur, Phasenverhalten, Fusionsinduktion sowie Aggregationsneigung von Phospholipidvesikeln untersucht werden. Hierfür wurde eine Vielzahl an biophysikalischen Untersuchungsmethoden an verschiedenen Modellmembransystemen in Form von uni- sowie multilamellaren Vesikeln und an gestützten Lipiddoppelschichten bemüht. Um Informationen über die Interaktionen von Y^{3+} mit Lipidmembranen außerhalb des rein elektrostatischen Einflussbereiches zu erhalten, wurden Vesikel aus reinem, zwitterionischen DPPC untersucht. Diese DPPC-Doppelschichten weisen in ihrer unbeeinflussten Form einen Gel-zu-Gel Vorphasenübergang ($L_{\beta'}/P_{\beta'}$) bei etwa 34 °C, sowie einen Hauptphasenübergang ($P_{\beta'}/L_{\alpha}$) bei etwa 41,5 °C auf. Um im Weiteren die Effekte negativer Oberflächenladung und lateraler Heterogenität der Modellmembranen untersuchen zu können und um eine bessere Annäherung an natürliche Membransysteme zu erlangen, wurde der Einfluss von Y^{3+} auf anionische und heterogene, *raft*-artige Membransysteme, wie das 20 % anionische 80:20 mol% DPPC:DPPG Lipidgemisch oder das naturmimetischere, 10 % anionische 20:5:45:5:25 mol% DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Cholesterin Gemisch untersucht. Die anionischen, *raft*-ähnlichen Membransysteme weisen eine Koexistenz von flüssig-geordneten (l_o) sowie flüssig-ungeordneten (l_d) Domänen auf, welche für eine Vielzahl von biologischen Prozessen wie Virusaufnahme, membranunterstützte Protein-Organisation sowie Signal-Transduktion als hoch relevant vermutet werden. [12,18,94,96,100–107]

5.2 *Material und Methoden*5.2.1 *Material***Tab. 5-1: Chemikalien YCl_3 Studie**

Für die in diesem Kapitel untersuchten Proben verwendete Chemikalien sowie zur Präparation der Proben genutzte Lipide und deren Bezugsquellen.

Chemikalien und Lipide	Bezugsquelle
DPPE	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DOPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DOPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Cholesterin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
$YCl_3 \cdot 6H_2O$	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<i>N</i> -Rh-DHPE	Invitrogen (Carlsbad, California, USA)
Laurdan	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Chloroform	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
MOPS	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
TRIS	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

5.2.2 *Präparation der Lipidvesikel*

Es wurden Vesikel in drei unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen aus den in Chloroform oder Chloroform/Methanol gelösten Lipiden als Stammlösung präpariert. Die Lipidmischungen ergaben sich aus a) reinem DPPE, b) 80:20 mol% DPPE:DPPG und c) 20:5:45:5:25 mol% DOPC:DOPG:DPPE:DPPG:Cholesterin. Für die in der Fluoreszenzspektroskopie sowie die Fluoreszenzmikroskopie untersuchten Proben wurden im ersten Fall 10 μ L/mg Gesamtlipidmenge einer 1 mM Laurdan Lösung in Chloroform, sowie im letzteren Falle 0,1 mol% *N*-Rh-DHPE, ebenfalls gelöst in Chloroform, als Fluorophore zugegeben. Mit Ausnahme der Proben für die Fluoreszenzmikroskopie wurden alle Proben unter einem Stickstoffstrom unter Rotation des Probengefäßes getrocknet, sodass ein dünner Lipidfilm zurückblieb. Die detaillierte Präparation der Proben der Fluoreszenzmikroskopie ist untenstehend in Abschnitt 5.2.6 erläutert. Vollständige Evaporation des Lösungsmittels aus dem Lipidfilm wurde durch Lyophilisation der Probe für 12 h unter

Vakuum gewährleistet. Anschließend daran wurde der getrocknete Lipidfilm mit einem 10 mM 3-(*N*-morpholino)propansulfonsäure (MOPS) Puffer bei einem pH Wert von 6,7 in H_2O (für FT-IR-Untersuchungen in D_2O) der gewünschten Konzentration an YCl_3 rehydriert. Die Lösung wurde im Anschluss initial für 10 Sekunden mittels eines Vortexmischers vermischt und für 20 Minuten in einem Wasserbad einer Temperatur über $75\text{ }^\circ\text{C}$ einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Um eine homogene Verteilung an Lipidvesikeln zu gewährleisten, wurde die so behandelte Lösung einem fünfmaligen Gefrier-Auftau-Zyklus unterzogen, in welchem die Lipidvesikel in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend für 5 Minuten bei einer Temperatur über $75\text{ }^\circ\text{C}$ aufgetaut wurden.

5.2.3 FT-IR-Spektroskopie

Die Präparation der multilamellaren Vesikel wurde wie unter 5.2.2 beschrieben für eine Gesamtlipidkonzentration von 10 gew.% in einem 10 mM MOPS Puffer in D_2O bei einem pH-Wert von 6,7 durchgeführt. Der pH-Wert von 6,7 ist vonnöten, da bei basischen Werten schwer lösliches Yttriumhydroxid aus der Probelösung auskristallisiert. Für die FT-IR-Untersuchungen wurden je neun Proben verschiedener Y^{3+} -Konzentrationen von 0 bis 21.4 mM im Falle des reinen DPPC sowie der 80:20 mol% DPPC:DPPG Mischung präpariert, wohingegen das komplexe, heterogene Fünf-Komponenten-System mit Y^{3+} Konzentrationen von 0 bis 17.3 mM angesetzt wurde. Die temperaturabhängigen Spektren wurden mit Hilfe einer Messzelle, bestehend aus zwei IR-transparenten CaF_2 -Fenstern der Firma Korth Kristalle GmbH aus Deutschland, getrennt durch eine zentral gelochte, zur Aufnahme von 20 μL Probe eingestellte Folie (Film-Gasket) einer Stärke von 50 μm durchgeführt. Die Spektren wurden mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} aus 128 separaten Scans gemittelt, welche durch ein Vertex-70 FT-IR-Spektrometer der Firma Bruker (Massachusetts, USA) aufgenommen wurden. Um Störungen durch CO_2 oder H_2O aus der die Messzelle umgebenden Gasphase auszuschließen, wurde die Messkammer für mindestens zehn Minuten vor Aufnahme der Spektren mit getrockneter, CO_2 freier Luft gespült. Die Temperierung der Messzelle wurde durch die Verwendung eines externen Kälte-Umwälzthermostates der Firma Julabo (Seelbach, Deutschland) realisiert, welches durch die zugehörige Software Julabo Easy Temp mit einer programmierten Temperaturrampe gesteuert wurde. Zur Äquilibration der Temperatur wurden die Messungen der einzelnen Spektren jeweils 15 Minuten nach Erreichen der eingestellten Temperatur ge-

messen. Die Aufzeichnung der Temperatur der Messzelle erfolgte alle drei Sekunden durch ein externes Pt-100 Thermometer, welches in die Messzelle eingesetzt wurde. Für alle Systeme, Temperaturen und Konzentrationen stellt jedes Ergebnisspektrum den Mittelwert über 128 einzelne Spektren dar, welche zur Auswertung für mindestens zwei separat präparierte Probensätze aufgenommen wurden.

5.2.4 Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC)

Die Präparation der multilamellaren Vesikel wie auch die verwendeten Y^{3+} -Konzentrationen erfolgten analog zu den FT-IR-Experimenten aus 5.2.3. Die DSC-Messungen wurden an einem Q20 Differential Scanning Calorimeter der Firma TA Instruments, New Castle, USA, im Modus der dynamischen Wärmestromdifferenzkalorimetrie durchgeführt. Die Probengefäße, bestehend aus *Tzero*[®] pans sowie den zugehörigen *Tzero*[®] hermetic lids, ebenfalls von TA Instruments, wurden mit 20 μ L der zu untersuchenden Probe befüllt, wohingegen die Referenzzelle mit der Pufferlösung der probenäquivalenten Y^{3+} -Konzentration befüllt wurde. Die Untersuchungen der reinen DPPC sowie der 80:20 mol% DPPC:DPPG-Proben wurden bei einer Heizrate von 2 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ durchgeführt, während die Heizrate für die Proben der komplexen 20:5:45:5:25 mol% DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Chol. Mischung auf 1,5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ festgelegt wurde. Vor jeder Messung wurde die Probe für fünf Minuten bei der jeweiligen Starttemperatur äquilibriert. Alle Systeme und Konzentrationen wurden zur Auswertung an mindestens zwei separat präparierten Proben untersucht.

5.2.5 Fluoreszenzspektroskopie (FS)

Zur Untersuchung der temperatur- und druckinduzierten Änderungen in der Membranfluidität sowie der lateralen Ordnung der untersuchten Systeme wurde die Laurdan Fluoreszenzspektroskopie angewandt. Die Probenpräparation erfolgt bis auf die erhöhte Gesamtlipidkonzentration von 10 mg mL^{-1} und die zusätzliche Zugabe einer 6-dodecanoyl-N,N-dimethyl-2-naphthylamine (Laurdan) Lösung zu den in Chloroform gelösten Lipiden in einem Verhältnis von 1 mol Lipid / 0,000735 mol Laurdan analog zu der unter 5.2.2 beschriebenen Präparation. Die druckabhängigen Untersuchungen wurden bei je konstanter Temperatur in einem Druckbereich zwischen 1 bar und 2 kbar unter Betrachtung des in

hohem Maße von der Umgebungspolarität abhängigen Emissionsspektrums des Laurdans durchgeführt. Die temperaturabhängigen Messungen wurden bei konstantem Umgebungsdruck in einem Temperaturbereich zwischen 15 °C und 80 °C, beziehungsweise zwischen 15 °C und 75 °C im Falle der reinen DPPC Vesikel durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden drei in den vorhergegangenen FT-IR-Messungen als markant angesehene Y^{3+} -Konzentrationen von 0 mM, 10,7 mM und 21,4 mM im Falle der reinen DPPC- sowie der 80:20 mol% DPPC:DPPG-Vesikel, im Falle des komplexen Fünf-Komponenten-Systems von 0 mM, 8,7 mM sowie 17,3 mM untersucht. Die Messungen an reinen DPPC- sowie 80:20 mol% DPPC:DPPG-Vesikeln wurden an einem K2 multifrequency phase modulation fluorometer der Firma ISS Inc., Champaign, USA, unter Nutzung einer temperierbaren Hochdruck-Messzelle für die druckabhängigen Untersuchungen bei 55 °C, 65 °C und 75 °C durchgeführt. Druckinduzierte Phasenübergänge im komplexen 20:5:45:5:25 mol% DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Chol.-System konnten durch den limitierten maximalen Arbeitsdruck der Messzelle von 2 kbar nicht untersucht werden. Die Temperatur der Messzelle wurde durch die Nutzung eines Kälte-Umwälzthermostates der Firma Julabo (Seelbach, Deutschland) gewährleistet, während die Temperatur der Zelle mittels eines in die Messzelle eingesetzten Thermofühlers überwacht wurde. Die Anregung des Fluorophors erfolgte bei einer Wellenlänge von 390 nm, die Detektion der Emissionsintensitäten zwischen 420 nm und 520 nm. Zur Quantifizierung der spektralen Änderungen wurde die Methode der generalisierten Polarisation (*GP*) genutzt. Diese ist definiert als $GP = (I_B - I_R) / (I_B + I_R)$, wobei I_R sich auf die Emissionsintensität bei einer Wellenlänge von 490 nm und I_B sich auf die Emissionsintensität bei 440 nm bezieht. Hierbei ist die Emission bei 490 nm charakteristisch für einen flüssig-kristallinen Zustand der Membran, wohingegen eine Emission bei 440 nm eine geordnetere Gelphase anzeigt. Somit zeigt ein hoher *GP*-Wert eine hohe laterale Ordnung an, während sinkende Werte der *GP*-Funktion steigende Unordnung und Fluidität der Membran anzeigen. Für alle Systeme, Temperaturen, Drücke und Konzentrationen wurde die Emissionsintensität mittels Photonenzählung über einen Zeitraum von einer Sekunde pro Wellenlänge gemittelt. Die Messungen wurden zur Auswertung für mindestens zwei separat voneinander präparierte Proben durchgeführt.

5.2.6 Fluoreszenzmikroskopie (FM)

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden nur an dem heterogenen 20:5:45:5:25 mol% DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Chol.-Lipidsystem durchgeführt. Das System wurde aus Stammlösungen der einzelnen Lipide in gewünschter Zusammensetzung angesetzt. Zudem wurden dieser Lösung 0,1 mol% des Fluorophors *N*-Rhodamin-DHPE zugesetzt (die Struktur des verwendeten Fluorophors ist in Abb. 10-2 im Anhang einzusehen), die Gesamtlipidkonzentration wurde mit Chloroform auf 1 mg mL^{-1} verdünnt. Anschließend wurden 20 μL der so präparierten Lösung auf zuvor mit Chloroform gereinigte, optisch transparente und Indium-Zinn bedampfte Deckgläser (ITO-Coverslips) gegeben und mittels eines Spin-Coaters bei 800 U min^{-1} für eine Minute beschichtet. Lösungsmittelfreiheit wurde durch anschließende Gefriertrocknung unter Vakuum für mindestens zwei Stunden gewährleistet. Im Anschluss daran wurden die beschichteten Deckgläser für die Präparation von riesigen unilamellaren Vesikeln (GUVs) durch Elektroformation bei einer Temperatur von $80 \text{ }^\circ\text{C}$ in einer RC-21B Formationskammer der Firma Warner Instruments, Hamden, USA, herangezogen. Hierzu wurden durch ein Schlauchsystem Pufferlösungen der gewünschten Y^{3+} -Konzentrationen von 0 mM, 8,7 mM sowie 17,3 mM in die Präparationszelle gegeben. Das Schlauchsystem ermöglicht den Austausch der die Lipidschicht umgebenden Puffers während der Messung oder zwischen einzelnen Messungen, wodurch Untersuchungen des Effektes der trivalenten Kationen und insbesondere deren osmotische Einflüsse auf die gebildeten Vesikel ermöglicht werden. Zur Bildung der Vesikel wurde zwischen den elektrisch leitenden Deckgläsern ein elektrisches Wechselfeld mit einer Spannung von 2 V bei einer Frequenz von 10 Hz für eine Zeit von 2 h appliziert, welches durch einen Funktionsgenerator TG315 der Firma Thurlby Thandar Instruments, Huntingdon, UK, erzeugt und über ein 6 mm schmales Kupferklebeband 3M™ ET1181 mit elektrisch leitfähiger Klebeseite der Firma 3M, Neuss, Deutschland, auf die Deckgläser übertragen wurde. [8] Nach Ablauf der zweistündigen Prozedur wurde die Temperatur der Präparationszelle von $80 \text{ }^\circ\text{C}$ langsam innerhalb einer Stunde auf Raumtemperatur äquilibriert. Weitere Details zur Methode der Elektroformation sind den angegebenen Quellen [108,109] zu entnehmen. Im Falle der temperaturabhängigen Untersuchungen wurde die Messzelle anschließend erneut durch einen externen Kälte-Umwälzthermostat auf die gewünschte Temperatur eingestellt und vor Aufnahme der Mikroskopiebilder für 15 Minuten bei dieser Temperatur äquilibriert. Die Bilder wurden durch das konfokale Laser Scanning Mikroskop Biorad MRC 1024 der Zeiss,

Deutschland, verbunden mit einem invertierten Nikon Eclipse TE-300 Mikroskop, aufgenommen. Die Fluoreszenzanregung der verwendeten Fluorophore erfolgte bei Wellenlängen von 488 nm sowie 561 nm durch einen Laser L4Cc-CSB-130 der Firma Oxxius Simply Light, Frankreich. Die Bildaufnahme wurde durch die Software LaserSharp2000 der Firma Zeiss, Deutschland, gesteuert und kontrolliert. Als Objektiv wurde für diese Aufnahmen das ölgestützte Objektiv Nikon Plan Apo λ 100x, NA = 1.45 der Firma Nikon, Tokyo, Japan, verwendet. Zeitaufgelöste Aufnahmen wurden mit Hilfe der CCD Kamera Andor iXon Ultra, Acal BFi der Firma Andor, Deutschland, unter Verwendung einer Quecksilberdampfampe Hg 100 W der Firma Nikon, Tokyo, Japan und der Software *NIS Elements BR V. 4.50.00* der Firma Nikon, Tokyo, Japan, erstellt. Bei allen untersuchten Systemen, Temperaturen und Konzentrationen wurden die exemplarisch gezeigten Beobachtungen in vielzähligen Bereichen jeder Probe in mindestens zwei unabhängig voneinander präparierten Proben nachgewiesen.

5.2.7 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Um Informationen über die Größenverteilung innerhalb wässriger Suspensionen der Lipidvesikel sowie deren Zeta-Potential, dem Oberflächenpotential relativ zu einem Punkt im Lösungsmittel in großer Entfernung von der elektrischen Doppelschicht, zu erhalten, wurden Messungen der dynamischen Lichtstreuung dieser Suspensionen durchgeführt. Hierfür wurden Vesikel der gewünschten Zusammensetzung entsprechend der Vorschrift aus 5.2.3 in einer Gesamtlipidkonzentration von 10 mM in Pufferlösungen der gewünschten Y^{3+} -Konzentrationen präpariert. Anschließend wurden die so präparierten multilamellaren Vesikel mittels 21-facher Extrusion durch einen 100 nm Porengröße aufweisenden Nucleopore[®] Polycarbonatfilter Track-Etch[™] der Firma Whatman GmbH, Dassel, Deutschland, extrudiert, um eine homogene Größenverteilung an unilamellaren Vesikeln zu gewährleisten. Die Messungen wurden an einem ZetaSizer Nano ZS der Firma Malvern Instruments, Malvern, UK, mit Hilfe der Einweg-Messzellen DTS 1070 derselben Firma durchgeführt. Die Partikelgröße sowie das Oberflächenpotential wurden bei 25 °C (zusätzlich bei 50 °C sowie 70 °C im Falle des Fünf-Komponenten-Systems) bestimmt. Für alle untersuchten Systeme, Temperaturen und Konzentrationen wurden die Messergebnisse über drei Messungen jedes Datenpunktes, wovon jeder Datenpunkt als Mittel

aus mindestens 17 einzelnen Scans dargestellt wurde, gemittelt. Die Untersuchungen wurden für mindestens zwei unabhängig voneinander präparierte Proben durchgeführt.

5.2.8 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Präparation der Proben zur Rasterkraftmikroskopie erfolgte initial entsprechend der Vorgehensweise aus 5.2.3. Die Rehydratation der getrockneten Fünf-Komponenten-Lipidfilme erfolge hier durch einen 20 mM TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)-Puffer bei einem pH Wert von 6,7 und für eine Gesamtlipidkonzentration von $1,94 \text{ mg mL}^{-1}$. Eine detaillierte Beschreibung der Probenpräparation für die Rasterkraftmikroskopie ist unter ^[110] einzusehen. Die Sedimentation der Vesikel mit anschließender Ausbildung einer planaren Doppelschicht wurde im Anschluss äquivalent zur unter 5.2.7 beschriebenen Extrusion durch einen 100 nm Porenfilter auf atomar planaren Mica-Oberflächen (5-D-10, Nanoandmore GmbH, Wetzlar, Deutschland) durchgeführt, indem die Lösung der extrudierten Vesikel auf dieser platziert und im Anschluss für 2 h bei $80 \text{ }^\circ\text{C}$ in einer Umgebung maximaler Luftfeuchtigkeit inkubiert wurden. Die Mikroskopiebilder wurden durch ein MultiMode scanning probe Mikroskop in Verbindung mit einem NanoScope IIIa Controller der Firma Digital Instruments, Santa Barbara, USA, unter der Verwendung eines J-Scanners aufgenommen. Als Abtastsonden wurden Cantilever der Firma Bruker, Billerica, USA, einer nominalen Kraftkonstante von $0,35 \text{ N m}^{-1}$ in Flüssigkeiten im Tapping Mode[®] innerhalb einer Flüssigkeitszelle (MTFML, Veeco, Mannheim, Deutschland) und einer Abtastrate von $1,0 \text{ Hz}$ verwendet. Bei allen untersuchten Konzentrationen wurden die gezeigten Resultate in mindestens drei Positionen mindestens zweier unabhängig voneinander präparierter Proben erzielt.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

5.3.1 FT-IR-Spektroskopie

Die Betrachtung der Änderungen in den Vibrationsmoden der IR-Spektren ausgehend von den Alkylketten der untersuchten Lipide liefert wertvolle Informationen über die Konformationsordnung der untersuchten Lipiddoppelschicht. ^[102,111] Phasenübergänge von der Gel- in die fluide Phase zeichnen sich in einem Anstieg der Resonanzfrequenz der Vibrationsbanden in einer Spektralregion zwischen 2800 cm^{-1} und 3100 cm^{-1} aus. Die

asymmetrischen sowie symmetrischen CH_2 -Banden bei $2916\text{--}2925\text{ cm}^{-1}$ und $2849\text{--}2855\text{ cm}^{-1}$ stellen in diesem Bereich die Banden höchster Intensität dar. Temperaturinduzierte Änderungen in den Positionen dieser Banden entstehen als Resultat des temperaturabhängigen *trans-gauche*-Verhältnisses der CH_2 -Gruppen in den Alkylketten der Lipide. ^[102,111] Um weiterführende, thermodynamische Informationen über das Phasenverhalten der betrachteten Systeme zu erlangen, wurden zusätzlich Messungen mit der Methode der Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC) durchgeführt.

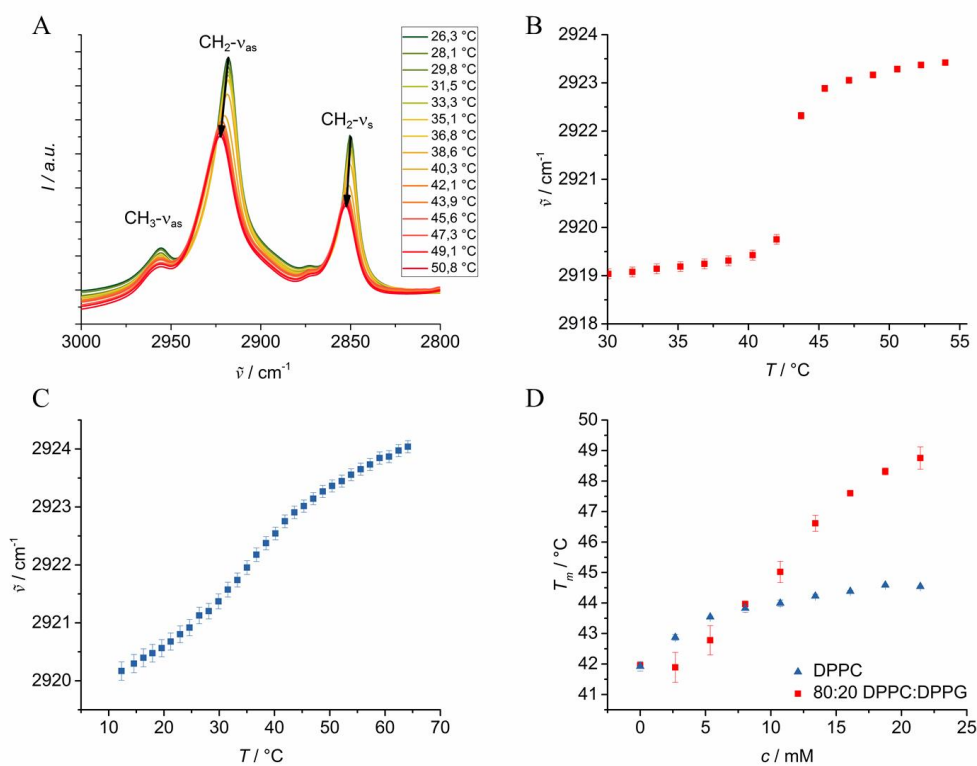


Abb. 5-1: FT-IR-Daten der CH_2 -Schwingungen in Abhängigkeit der Y^{3+} -Konzentration

A) 80:20 mol% DPPC:DPPG-Vesikel in 10 mM MOPS, 0 mM YCl_3 ; Veränderung der CH_2 -Vibrationsmode als Funktion steigender Temperatur. Jede Linie repräsentiert das Mittel aus 128 separaten Scans. B) Anstieg der Wellenzahl der asymmetrischen CH_2 -Streckschwingung $\tilde{\nu}_{as}(CH_2)$ von DPPC-Vesikeln in 21,4 mM YCl_3 als Funktion steigender Temperatur. C) Das anionische, heterogene 20:5:45:5:25 mol% DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Chol.-Gemisch in 10,7 mM YCl_3 weist lediglich einen breiten Phasenkoexistenzbereich auf. D) Die Hauptphasenübergangstemperaturen des zwitterionischen DPPC (\blacktriangle) sowie des 20 % anionischen 80:20 DPPC:DPPG (\blacksquare) Lipidsystems als Funktion der Y^{3+} -Ionenkonzentration in Pufferlösung. Die Datenpunkte in B), C) und D) repräsentieren das Mittel zweier separater Untersuchungen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Ergebnisses.

Abb. 5-1 A) zeigt die Veränderungen in Form und Position der CH_2 -Vibrationsmoden als Funktion steigender Temperatur für Vesikel bestehend aus 80:20 mol% DPPC:DPPG. Abb. 5-1 B) bildet die Wellenzahl der asymmetrischen CH_2 -Streckschwingung $\nu_{as}(CH_2)$ als Funktion steigender Temperatur der Ein-Komponenten-DPPC-Vesikel in Anwesenheit des trivalenten Ions ab. Die Temperatur des Hauptphasenübergangs, T_m , von der Gel- in die fluide Phase des Systems ohne Einflüsse von Y^{3+} -Ionen kann hieraus in guter Übereinstimmung mit der Literatur zu 42 °C bestimmt werden. ^[112] Abb. 5-1 C) zeigt die FT-IR-Daten des heterogenen, 20:5:45:5:25 mol% DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Chol. Lipidgemisches in Anwesenheit von 10,7 mM YCl_3 , welches über weite Temperaturbereiche ein breites Phasenkoexistenzgebiet von flüssig geordneten sowie flüssig ungeordneten Domänen ausbildet. Die Phasenkoexistenz in diesem Bereich wurde durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen, welche im späteren Verlauf dieser Arbeit beschrieben werden, bestätigt. Abb. 5-1 D) zeigt den Anstieg der Temperatur des Hauptphasenübergangs, T_m , für Vesikel aus reinem, zwitterionischen DPPC sowie für 20 % anionische Vesikel aus 80:20 mol% DPPC:DPPG als Funktion der Y^{3+} -Ionenkonzentration. Steigende Y^{3+} -Ionenkonzentrationen führen demnach zu einem ausgeprägten Anstieg der Gel-zu-fluid Hauptphasenübergangstemperatur.

Besonders ausgeprägt zeigte sich dieses Verhalten für die anionische Membran, in welcher ein maximaler Anstieg von 7 °C bei einem Zusatz von 21,4 mM Y^{3+} im Vergleich zum unbeeinflussten System zu beobachten war. Zugabe der gleichen Konzentration zu dem neutralen, zwitterionischen Membransystem resultierte lediglich in einem Anstieg der Hauptphasenübergangstemperatur von 2 °C. Diese Anstiege indizieren in verschiedenem Ausmaß eine Stabilisierung der geordneten Gelphase gegenüber steigender Temperaturen durch das zugegebene Kation. Der deutliche Anstieg in der Hauptphasenübergangstemperatur deutet auf ein nicht rein elektrostatisches Binden des Y^{3+} an die Kopfgruppenregion der Membransysteme hin, da das elektrische Oberflächenpotential der Membran bei hohen Salzkonzentrationen im umgebenden Medium zu großen Teilen abgeschirmt wird. Somit ist als treibende Kraft hinter dem beobachteten Anstieg in T_m ein Anstieg im lateralen Kompressionsdruck der Membran aufgrund der Bindung von Y^{3+} in die Membran zu vermuten.

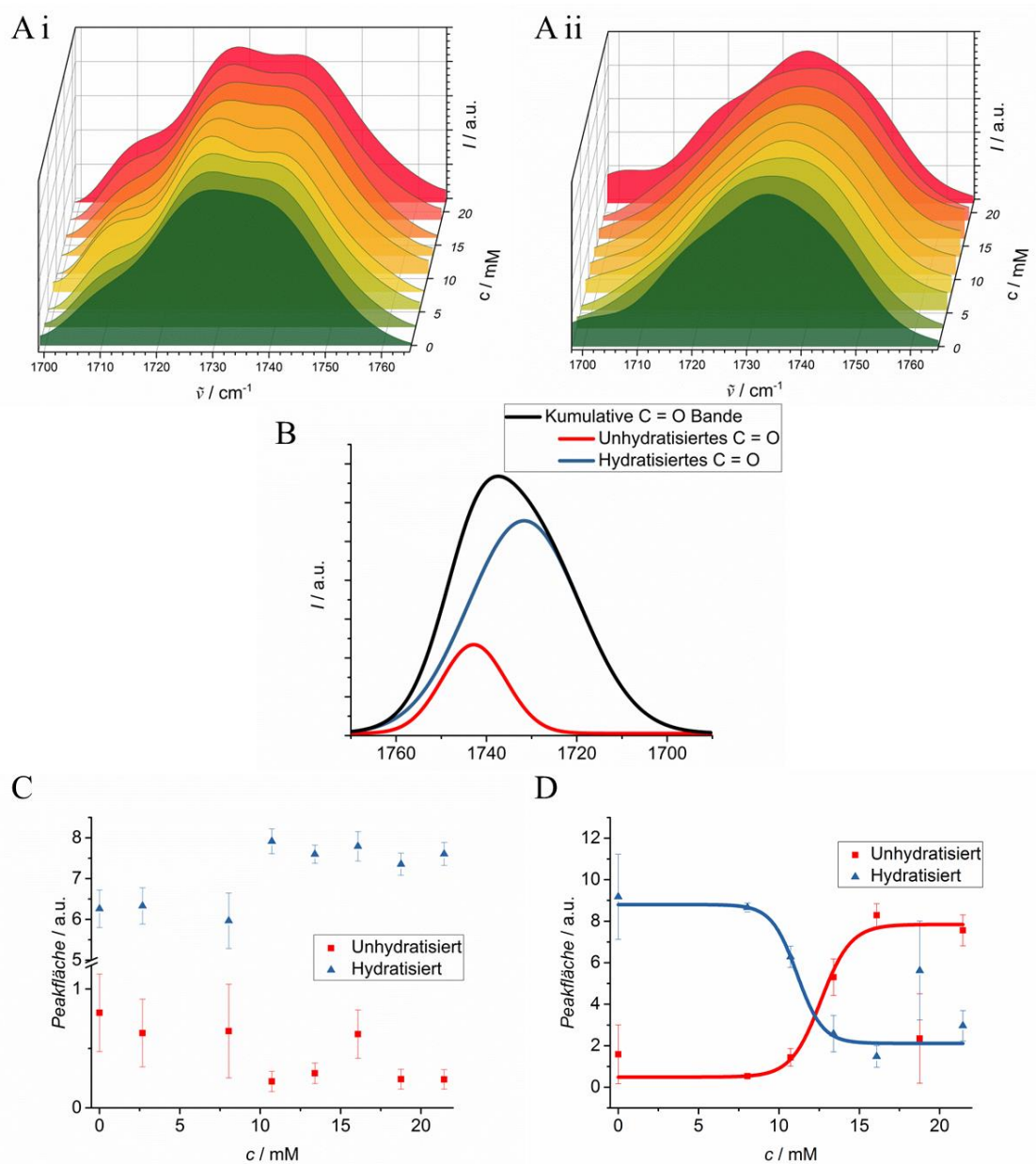


Abb. 5-2: FT-IR-Auswertung der Lipidhydratation als Funktion der Y^{3+} -Konzentration

A) i) C=O IR-Bande als Funktion der Y^{3+} -Ionenkonzentration für reine DPPC Vesikel und ii) für 80:20 mol% DPPC:DPPG Vesikel. Jede Linie in A) i) sowie A) ii) repräsentiert das Mittel von 128 Einzelspektren. B) C=O Spektralbereich mit entschlüsselten Subbanden für die unhydratisierte und hydratisierte C=O Gruppe. C) Peakflächen der hydratisierten und unhydratisierten C=O Gruppen als Funktion der Y^{3+} -Ionenkonzentration für reine DPPC-Vesikel bei einer Temperatur von 55 °C. D) Peakflächen der hydratisierten und unhydratisierten C=O Gruppen als Funktion der Y^{3+} -Ionenkonzentration für 80:20 mol% DPPC:DPPG-Vesikel bei einer Temperatur von 55 °C. Die Datenpunkte in C) und D) repräsentieren das Mittel aus mindestens zwei separaten Untersuchungen; die Fehlerbalken geben die Standardabweichung dieser Mittelwerte an.

Änderungen in der Form der C=O Vibrationsbande im Spektralbereich zwischen 1690 cm^{-1} und 1770 cm^{-1} erlauben Rückschlüsse auf mögliche Veränderungen in der Hydratation der Kopfgruppenregion der Lipiddoppelschichten. Der asymmetrische C=O Peak bei $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$ setzt sich aus zwei darunterliegenden Subbanden um 1743 cm^{-1} und 1728 cm^{-1} zusammen, wobei ersterer eine unhydratisierte, letzterer eine hydratisierte C=O Gruppe repräsentiert (siehe Abb. 5-2 A) und B)).^[58] Entschlüsselung dieser kombinierten C=O Bande und Berechnung der Peakflächen der zugrundeliegenden Subbanden liefert Informationen über die Veränderungen im Hydratationsgrad der Modellmembran.^[58]

Wie in den Abb. 5-2 C) und D) gezeigt, deutet sich ein geringfügiger Anstieg in der Kopfgruppenhydratation in der fluiden Phase der reinen DPPC-Membran bei einer Temperatur von 55 °C bei Y^{3+} -Ionenkonzentrationen über $8\text{-}10\text{ mM}$ an, wobei zu beachten ist, dass der Effekt aufgrund seiner geringen Ausprägung innerhalb des Fehlerbereiches des Experimentes liegt. In der fluiden Phase des anionischen $80:20\text{ mol\% DPPC:DPPG}$ -Systems zeigt sich hingegen eine signifikante Veränderung der Kopfgruppenhydratation. Beginnend bei einer Y^{3+} -Ionenkonzentration von $8\text{-}10\text{ mM}$ lässt sich ein deutlicher Abfall der Kopfgruppenhydratation beobachten, was die Theorie des Einbaus der trivalenten Kationen in den Kopfgruppenbereich der anionischen Modellmembran mit einer daraus folgenden Dehydratation dieses Bereiches stützt. Maximale Ausprägung dieses Effektes zeigt sich für Y^{3+} -Ionenkonzentrationen oberhalb von 10 mM .

5.3.2 Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC)

Die Untersuchungen der reinen DPPC- sowie der $80:20\text{ mol\% DPPC:DPPG}$ -Membranen mittels Wärmestromdifferenzkalorimetrie zeigen in den Scans der beschriebenen Proben in einem weiten Temperaturbereich teils mehrere deutliche Wärmestromüberschüsse, welche auf große Konformationsänderungen während des Gel-zu-flüssig Phasenüberganges hindeuteten, deren Hauptphasenübergangstemperatur, T_m , signifikant durch den Einfluss steigender Y^{3+} -Ionenkonzentration verändert wurde (siehe Abb. 5-3). Des Weiteren wird deutlich, dass die Übergangstemperatur des Vorübergangs bei Ein-Komponenten-DPPC-Doppelschichten mit steigender Y^{3+} -Ionenkonzentration in höherem Maße steigt als die Hauptübergangstemperatur derselben Doppelschicht, sodass bei Y^{3+} -Konzentrationen ab $10,8\text{ mM}$ eine Kombination dieser beiden Wärmestrompeaks resultie-

rend in einem verbreiterten Hauptphasenübergang, und nicht mehr existentem Vorübergang auftritt. Die Untersuchungen der 80:20 mol% DPPC:DPPG-Doppelschichten zeigen ein vergleichbares Verhalten, wobei bei diesem anionischen Modellsystem die Kombination von Vor- und Hauptphasenübergang bereits ab Konzentrationen von 2,7 mM Y^{3+} auftreten. Zudem deutet die signifikant erhöhte Breite des Phasenübergangs sowie die sich ausbildende Schulter desselben bei hohen Temperaturen auf ausgeprägte Phasenkoexistenzbereiche bei hohen Y^{3+} -Ionenkonzentrationen hin.

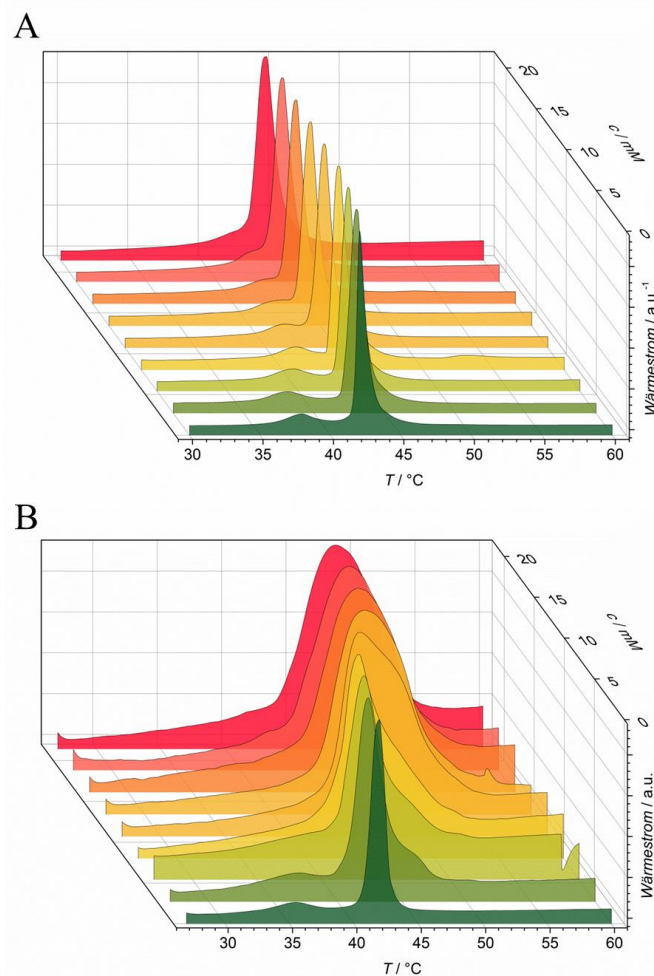


Abb. 5-3: DSC-Thermogramme in Abhängigkeit der Y^{3+} -Konzentration

DSC-Thermogramme der Ein-Komponenten-DPPC- (A) sowie der 20 % anionischen DPPC:DPPG-Vesikel (B) als Funktion steigender Y^{3+} -Ionenkonzentration. Besonders ausgeprägt zeigen sich die Effekte des Ions auf die anionische Modellmembran. Jede Linie repräsentiert einen einzelnen Thermoscan, deren Resultate in mindestens zwei separat voneinander untersuchten Proben nachgewiesen wurden.

Dieses Verhalten korrespondiert mit der ebenfalls erhöhten Konzentration an dehydratisierten Gruppen in der Kopfgruppenregion der Modellmembran oberhalb von 10 mM Y^{3+} , was durch die FT-IR-Untersuchungen bestätigt wurde. Aufgrund der Vergleichbarkeit der Hauptphasenübergangstemperaturen von DPPC und DPPG, welche bei 42,4 °C sowie 41,0 °C liegen, war in diesem System keine ausgeprägte Phasentrennung, wie in Experimenten mit anderen Lipidzusammensetzungen und der Addition von Ca^{2+} in einer Konzentration von 10 mM beschrieben, zu erwarten. [81]

Der Anstieg der Phasenübergangstemperaturen resultiert aus der Einbringung und Bindung der zugegebenen Kationen an die Lipidgrenzschicht, wodurch eine Stabilisierung der Gelphase gegenüber steigender Temperatur durch intermolekulare Vernetzung erfolgt. Das Verschwinden des Vorübergangs stützt dieses Resultat, da eine Vernetzung der Moleküle untereinander ein Ausbilden der gewellten Überstruktur behindert. Wie erwartet, fällt der Effekt auf die Membranen im Falle des anionischen Systems ausgeprägter aus, da in diesem Falle die elektrostatische Interaktion mit den anionischen Lipidkopfgruppen an der Grenzfläche hinzutritt. Aufgrund der außerordentlich ausgeprägten Phasenkoexistenz im Falle der heterogenen Fünf-Komponenten-Membran konnten mit dieser Methode keine Erkenntnisse über den Effekt von Y^{3+} auf dieses Modellsystem untersucht werden.

5.3.3 Fluoreszenzspektroskopie (FS)

Abb. 5-4 zeigt die Temperaturabhängigkeit der Laurdan *GP*-Werte der Vesikel verschiedener Lipidzusammensetzung bei verschiedenen Y^{3+} -Ionenkonzentrationen. Die Systeme wurden über einen Temperaturbereich von 15 °C bis 80 °C bei Umgebungsdruck vermessen. Werte der generalisierten Polarisation aller drei Lipidsysteme weisen einen deutlichen Abfall bei steigender Temperatur des Systems auf, was einer Absenkung des lateralen Ordnungsparameters entspricht. Beim Vergleich der drei Systeme in Abwesenheit des trivalenten Kations fällt auf, dass das reine DPPC- sowie das 80:20 mol% DPPC:DPPG-Modellsystem einen scharfen Phasenübergang vollzieht, wohingegen das komplexe, heterogene 20:5:45:5:25 mol% DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Chol.-Modellsystem einem weit aus sanfteren Anstieg der lateralen Unordnung unterliegt.

Die reinen DPPC- sowie die 80:20 mol% DPPC:DPPG-Vesikel reagieren sehr sensitiv auf einen Anstieg der Y^{3+} -Ionenkonzentration. In der Gelphase bewirkt die Addition der trivalenten Kationen keine signifikante Änderung der lateralen Membranordnung, was sich durch die geringe Abweichung in den Startwerten der *GP*-Kurve darstellt. In der fluiden Phase hingegen zeigt sich, dass der Abfall der generalisierten Polarisation in Anwesenheit des trivalenten Kations signifikant schwächer ausfällt als in den ionenfreien Untersuchungen.

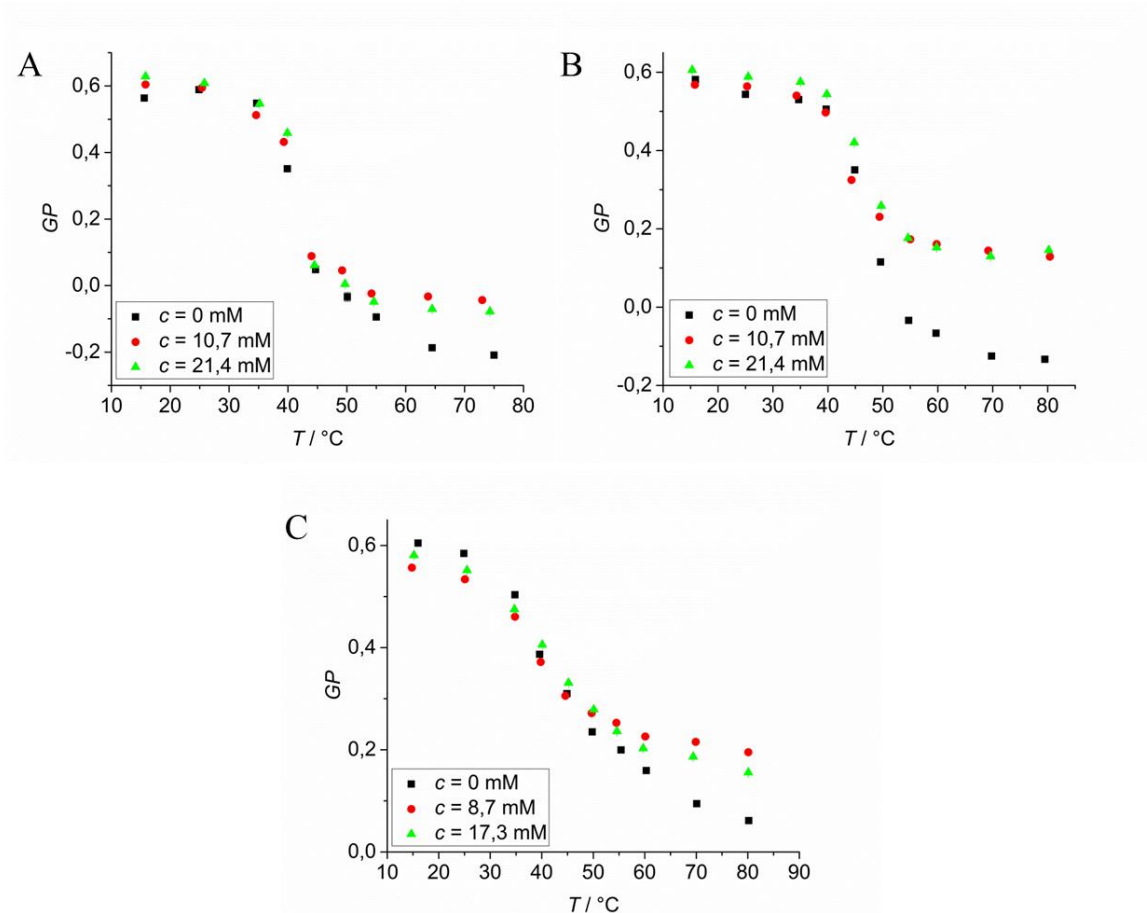


Abb. 5-4: Temperaturabhängige Fluoreszenzspektroskopie bei steigender Y^{3+} -Konzentration

Temperaturabhängigkeit der Laurdan *GP*-Werte von A) Ein-Komponenten-DPPC-Vesikeln, B) 20 % anionischen 80:20 mol% DPPC:DPPG-Vesikeln und C) 10 % anionischen, heterogenen 20:5:45:5:25 mol% DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Chol.-Vesikeln für verschiedene Y^{3+} -Ionenkonzentrationen. Die Datenpunkte repräsentieren das Mittel aus mindestens zwei separat präparierten Proben; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung dieses Mittelwertes an.

Dies deutet auf eine stark erhöhte Konformationsordnung und gleichzeitig auf eine deutlich reduzierte Hydratation der Kopfgruppenregion durch Bindung an die Membran hin. Dies steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der FT-IR- sowie DSC-Untersuchungen, welche bei steigender Ionenkonzentration eine deutliche Verringerung der Hydratation der 80:20 mol% DPPC:DPPG-Modellmembran zeigten.

Das 10 % anionische 20:5:45:5:25 mol% DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Chol.-Modellsystem zeigt vergleichbare Effekte wie das 80:20 mol% DPPC:DPPG-System in schwächerer Ausprägung. In allen drei untersuchten Systemen führt der Anstieg der Y^{3+} -Ionenkonzentration zu einer höheren lateralen Lipidordnung in der fluiden Phase, angezeigt durch die relativ zueinander gestiegenen *GP*-Werte. Am ausgeprägtesten zeigt sich dieser Effekt für das 20 % anionische 80:20 DPPC:DPPG-Gemisch, während die geringsten Effekte für das reine DPPC-System auftreten. Die nur noch unwesentlichen Änderungen in den *GP*-Werten nach Verdopplung der Y^{3+} -Ionenkonzentration weisen auf einen Sättigungseffekt oberhalb eines molaren Y^{3+} : Lipid-Verhältnisses von 2:5 hin.

Weitergehend wurden mittels der Laurdan-Fluoreszenz druckabhängige Messungen mit Hilfe einer von PALADINI und WEBER 1981 beschriebenen Hochdruck-Messzelle ^[113] durchgeführt. Die Untersuchungen fanden an reinen DPPC- sowie an 80:20 mol% DPPC:DPPG-Vesikeln bei Temperaturen von 55 °C, 65 °C und 75 °C für Y^{3+} -Ionenkonzentrationen von 0 mM, 10,8 mM sowie 17,3 mM statt. Wie in Abb. 5-5 gezeigt, weisen beide Systeme in der fluiden wie auch in der Gelphase für höhere Ionenkonzentrationen höhere Ordnungsparameter, angezeigt durch die *GP*-Werte auf. Der flüssig-zu-Gel Übergangsdruck verringert sich drastisch in Anwesenheit höherer Y^{3+} -Ionenkonzentrationen, was auf einer deutlichen Destabilisierung der fluiden Phase und Stabilisierung der Gelphase entspricht. Der Einfluss des trivalenten Kations auf den Phasenübergangsdruck bei gegebener Y^{3+} -Ionenkonzentration ist zusammenfassend in Abb. 5-5 G) und H) dargestellt. Bemerkenswerterweise stellt sich der Y^{3+} -induzierte, ordnende Effekt ausgeprägter dar als eine druckinduzierte Ordnung der Alkylketten der Lipide. Y^{3+} -Ionenkonzentrationen oberhalb von 10 mM zeigten keinen weiteren signifikanten Einfluss auf das Phasenübergangsverhalten der Modellsysteme.

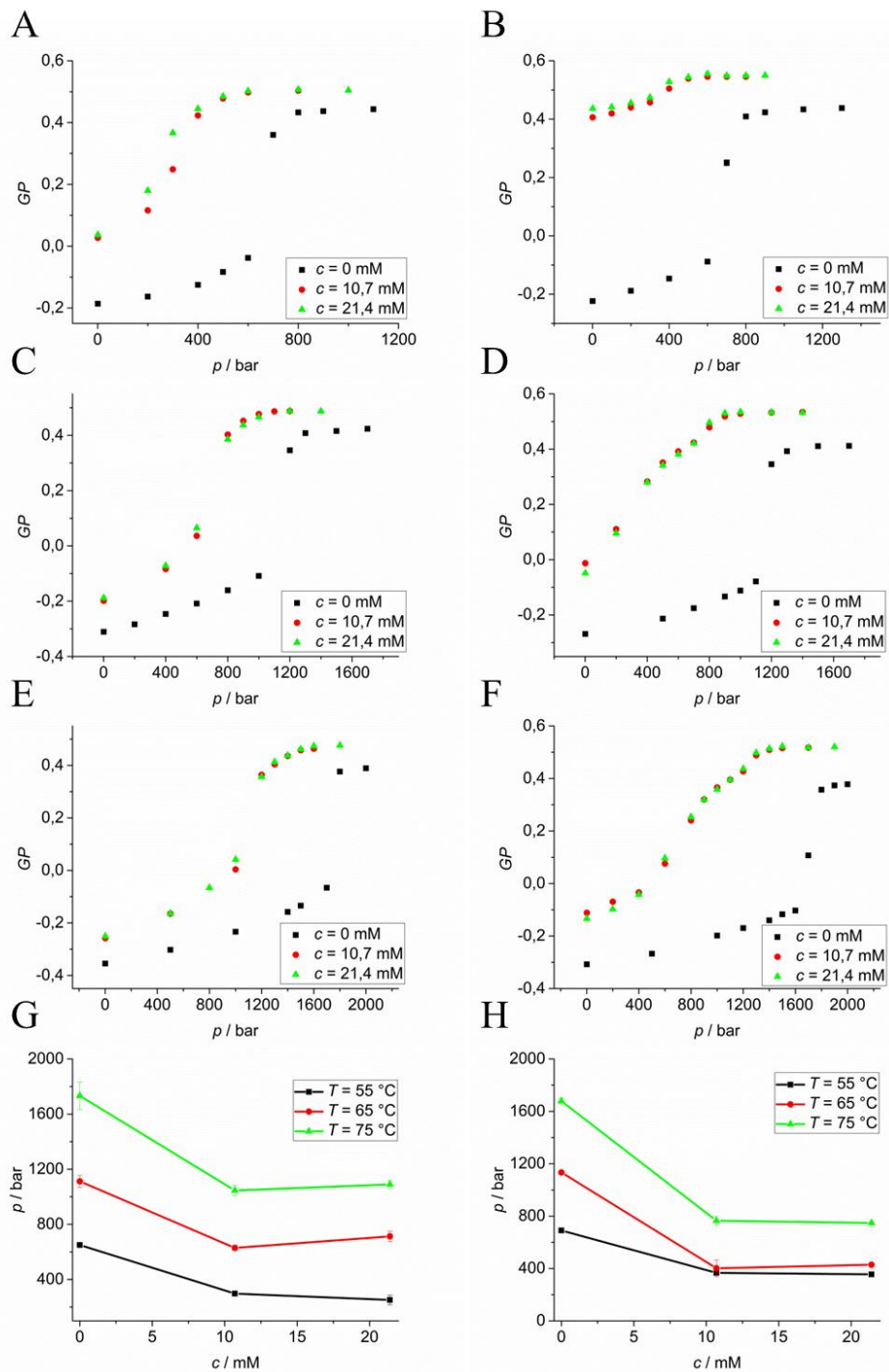


Abb. 5-5: Druckabhängige Fluoreszenzspektroskopie bei steigender Y^{3+} -Konzentration

Druckabhängigkeit der Laurdan-Fluoreszenz in reinen DPPC-Vesikeln (A, C, E) und 20 % anionischen, 80:20 mol% DPPC:DPPG-Vesikeln (B, D, F) bei einer Temperatur von je 55 °C (A, B), 65 °C (C, D) und 75 °C (E, F) für verschiedene Y^{3+} -Ionenkonzentrationen. G) Hauptphasenübergangsdrücke der reinen DPPC- sowie H) der 80:20 mol% DPPC:DPPG-Vesikel bei gegebener Temperatur und steigender Y^{3+} -Ionenkonzentration. Die Datenpunkte in dieser Abbildung repräsentieren das Mittel von mindestens zwei separaten, unabhängig voneinander präparierten Untersuchungen; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung dieses Mittelwertes.

Steigende Ionenkonzentrationen führen somit zu höherer Konformationsordnung der Lipide in allen gezeigten Systemen, am ausgeprägtesten in der anionischen Modellmembran. Alle betrachteten Modellsysteme weisen einen deutlichen Abfall im für den Phasenübergang aufzubringenden Umgebungsdruck auf, am ausgeprägtesten in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 10,8 mM Y^{3+} . Höhere Konzentrationen resultieren in keinen weiterführenden Effekten. Maximale Ausprägung des ordnenden Effektes auf die laterale Membranstruktur lässt sich für das 80:20 mol% DPPC:DPPG-System bei einer Temperatur von 55 °C nachweisen, in welchem die Addition des trivalenten Kations über einen weiten Temperatur- und Druckbereich nahezu gelphasenartige Ordnung induziert. Die erhöhte Breite des Phasenübergangs resultiert mit hoher Wahrscheinlichkeit aus Y^{3+} -induzierten Phasenkoexistenzgebieten, vergleichbar mit den in den temperaturabhängigen Messungen gezeigten Daten bei Umgebungsdruck. Die Vergleichbarkeit der Phasenübergangsdrücke bei Y^{3+} -Ionenkonzentrationen von 10,7 mM und 21,4 mM entsprechend molarer Y^{3+} : Lipid Verhältnisse von 2:5 und 4:5, indiziert bereits einen Sättigungseffekt des Einflusses des Kations auf das Phasenverhalten bei einer Konzentration von 10,7 mM.

5.3.4 Zeta-Potential und Partikelgröße durch dynamische Lichtstreuung (DLS)

Als Zeta-Potential wird das elektrische Potential an der Scherschicht der Lipiddoppelschicht bezeichnet, welche in Relation zu einem weit entfernten Punkt innerhalb des umgebenden Lösungsmittels betrachtet wird. In dieser Untersuchung wurde das Potential an der Grenze zwischen der die Vesikel umgebenden Pufferlösung und der stationären, damit der Oberfläche des Vesikels verbundenen Lösungsmittelschicht betrachtet. Durch Adsorption von Ionen an die Oberfläche eines Liposoms zeigt sich eine Änderung des Zeta-Potentials bis hin zu einem Wechsel des Vorzeichens. ^[114] Um Informationen über die Adsorption und Anbindung der trivalenten Y^{3+} -Kationen an diese Vesikel zu erhalten und um Aussagen über die Stabilität der kolloidalen Lipiddispersion treffen zu können, wurden die Zeta-Potentiale von Vesikeln verschiedener Lipidzusammensetzung bestimmt. Zeta-Potentiale von > 20 mV führen hierbei zu einer Stabilisierung der Vesikel und schützen die kolloidale Dispersion gegenüber Aggregation. ^[114]

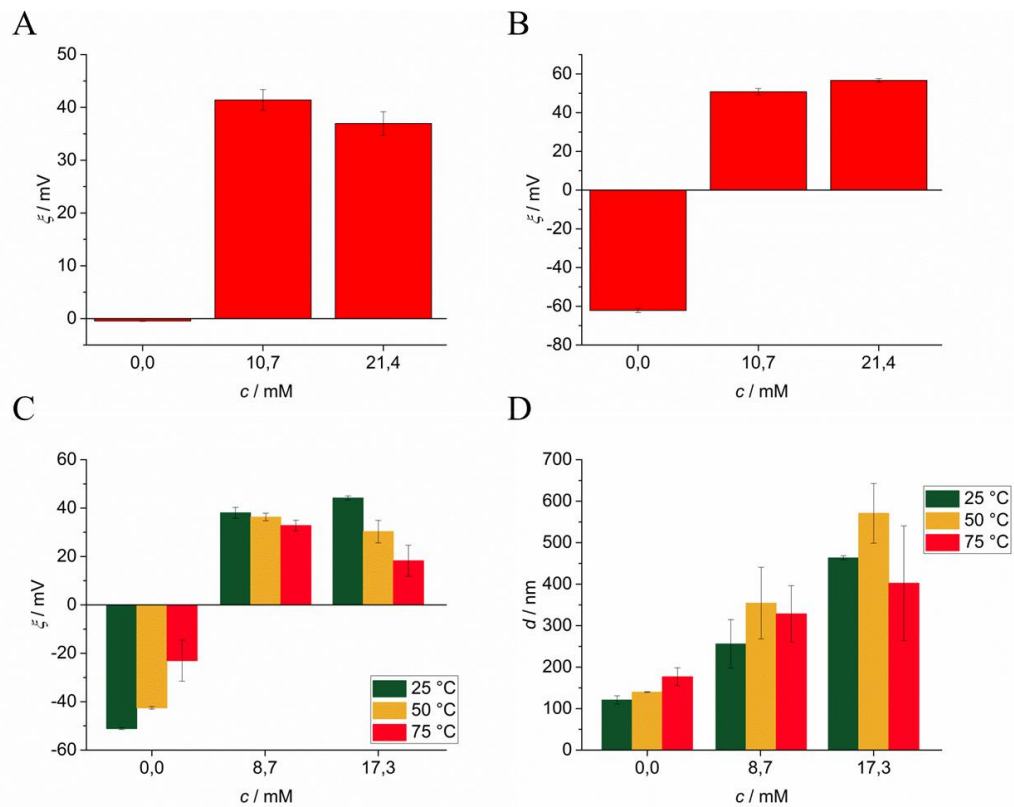


Abb. 5-6: Zeta-Potentiale und Partikelgrößen in Abhängigkeit der Y^{3+} -Konzentration

Zeta-Potentiale der A) reinen DPPC- und B) 80:20 mol% DPPC:DPPG-Vesikel bei einer Temperatur von 25 °C. C) und D) zeigen das Zeta-Potential sowie die Partikelgröße des heterogenen 20:5:45:5:25 mol% DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Chol.-Lipidsystems bei verschiedenen Temperaturen für steigende Y^{3+} -Ionenkonzentrationen. Steigende Zeta-Potentiale indizieren starke Adsorption der trivalenten Kationen an die anionischen, wie auch an die neutrale Membran, während die Auswirkungen auf die anionischen Membranen von höherer Ausprägung sind als die auf die neutrale Membran. Steigende Partikelgrößen deuten auf Vesikelfusion oder Aggregation des heterogenen Fünf-Komponenten-Systems mit steigender Ionenkonzentration hin. Die Balkendiagramme repräsentieren die Mittelwerte aus jeweils drei Einzelmessungen zweier unabhängig voneinander untersuchter Proben von denen jede Einzelmessung als Mittel von 17 Scans dargestellt wurde. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung dieser Ergebnisse an.

Abb. 5-6 zeigt die Zeta-Potentiale der zwitterionischen DPPC-Membran und der 20 % anionischen 80:20 DPPC:DPPG-Membran bei einer Temperatur von 25 °C, wie auch die Zeta-Potentiale der 10 % anionischen Fünf-Komponenten-Membran bei Temperaturen von 25 °C, 50 °C und 70 °C bei verschiedenen Y^{3+} -Ionenkonzentrationen. Im Allgemeinen ist bei einem Anstieg der Temperatur aufgrund einer erhöhten Unordnung der Alkylketten der Lipide und folglich einer Erhöhung der Querschnittsfläche selbiger eine Schwächung der Ion-Dipol-Interaktionen zwischen gebundenen Kationen und den polaren, geladenen Kopfgruppenregionen zu erwarten. Des Weiteren wird die Partikelgröße der zuvor durch einen 100 nm Porengröße aufweisenden Polycarbonatfilter extrudierten

Vesikel des heterogenen Fünf-Komponenten-Systems für verschiedene Y^{3+} -Ionenkonzentrationen und Temperaturen dargestellt. Es zeigt sich deutlich, dass die Partikelgröße als Folge erhöhter Y^{3+} -Ionenkonzentrationen der Pufferlösung steigt, was auf eine Aggregation oder eine Fusion der Vesikel hindeutet. Die Liposomen des Fünf-Komponenten-Systems wiesen bei einer Temperatur von 25 °C in Abwesenheit des trivalenten Kations ein Zeta-Potential von etwa - 50 mV auf, die des 20 % anionischen 80:20 mol% DPPC:DPPG-Gemisches etwa - 60 mV und die Vesikel bestehend aus reinem, zwitterionischem DPPC in etwa 0 mV. Bei steigenden Y^{3+} -Ionenkonzentrationen zeigt sich bei einer Temperatur von 25 °C an den anionischen Membranen ein Wechsel des Vorzeichens und ein deutlicher Anstieg des Zeta-Potentials auf bis auf + 50 mV für das Fünf-Komponenten-System und bis auf + 60 mV für das DPPC:DPPG-System. Aus der Tatsache, dass selbst bei der initial neutralen Membran aus reinem DPPC ein deutlicher Anstieg des Zeta-Potentials auf bis zu + 40 mV nachgewiesen wurde und der deutlichen, positiven Überladung der betrachteten, anionischen Membranen weit über den Neutralpunkt hinaus, zeigt sich deutlich, dass die Antriebskraft hinter den Kation-Kopfgruppen-Interaktionen der trivalenten Kationen über unspezifische, elektrostatische Wechselwirkungen hinaus geht. ^[90] Weiterhin weist der annähernd doppelt so ausgeprägte Anstieg des Zeta-Potentials der anionischen Membran verglichen mit dem Anstieg des Zeta-Potentials der neutralen Membran auf zusätzliche, elektrostatische, adsorptive Effekte an der anionischen Oberfläche dieser Liposomen hin. Weitere Erhöhung der Ionenkonzentrationen liefert keine weiteren signifikanten Anstiege der Zeta-Potentiale der untersuchten Liposomen. Die Zeta-Potentiale des heterogenen Fünf-Komponenten-Systems näherten sich bei steigenden Temperaturen einem neutraleren Potential an, was zu einer Destabilisierung des kolloidalen Systems gegenüber Aggregation führt. Steigende Y^{3+} -Ionenkonzentrationen führen, wie bereits beschrieben, zudem zu einer Erhöhung der Partikelgröße durch Fusion oder Aggregation der Liposomen. Die beobachtete partielle Reversibilität dieses Prozesses bei steigender Temperatur suggeriert eine Aggregation der Vesikel anstelle der Fusion. Dies deutet darauf hin, dass die Y^{3+} -Ionen dazu in der Lage sind, den Raum zu benachbarten Vesikeln zu überbrücken und somit die Adhäsionskräfte zwischen den Vesikeln zu steigern, wie es auch für Ca^{2+} -Ionen in bestimmten Konzentrationen beschrieben wurde. ^[90,115,116]

5.3.5 Fluoreszenzmikroskopie (FM)

Wie bereits durch die spektroskopischen sowie kalorimetrischen Untersuchungen motiviert, wurden die dort suggerierten Koexistenzbereiche der l_o - sowie der l_d -Phasen der 10 % anionischen 20:5:45:5:25 mol% DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Chol.-Lipidvesikel mit Hilfe der konfokalen Laser scanning Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Um das temperaturabhängige Phasenverhalten dieses Membransystems zu visualisieren, wurden die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen an riesigen unilamellaren Vesikeln (GUVs) des Fünf-Komponenten-Systems durchgeführt, welches mit 0,1 mol% *N*-Rh-DHPE als Marker der l_d -Phase versetzt wurde. Die Untersuchungen wurden für ausgewählte Temperaturen sowie für drei relevante Y^{3+} -Ionenkonzentrationen durchgeführt.

Wie in Abb. 5-7 gezeigt, kann die l_o - l_d -Phasenkoexistenz im benannten System in Abwesenheit des trivalenten Kations über einen weiten Temperaturbereich beobachtet werden. Wie erwartet, steigt der Anteil der l_d -Phase mit steigender Temperatur als Resultat des partiellen Phasenübergangs der Domänen initialer l_o -Struktur. Bei einer Temperatur von 75 °C bestehen nahezu keine l_o -Bereiche mehr; die Gesamtheit der Domänen innerhalb des Liposoms hat somit den Phasenübergang vollzogen. Des Weiteren zeigt sich, dass eine gesteigerte Y^{3+} -Ionenkonzentration nur einen geringen bis keinen signifikanten Einfluss auf die laterale Domänenstruktur aufweist. Da die Fluoreszenzmikroskopie aufgrund ihres Auflösungsvermögens lediglich Domänen auf der Mikrometerskala detektiert, musste für Einblicke höherer räumlicher Auflösung die Rasterkraftmikroskopie (AFM) bemüht werden, deren Resultate im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

Zusätzlich wurden die osmotischen Einflüsse der trivalenten Kationen auf die riesigen unilamellaren Vesikel des Fünf-Komponenten-Systems durch sukzessive Erhöhung der Y^{3+} -Ionenkonzentration im umgebenden Puffermedium untersucht, während das Vesikelinterne Medium keine Y^{3+} -Ionen enthielt, was zu großem osmotischem Stress entlang der Membran führt. Die Bilder wurden mittels einer Quecksilberdampflampe mit nachgeschaltetem Grünfilter zur Anregung des Fluorophors aufgenommen. Bei Konzentrationen bis zu 17,3 mM Y^{3+} konnten über einen Zeitraum von 30 Minuten keine signifikanten, makroskopischen Effekte auf die Topologie der Vesikel beobachtet werden.

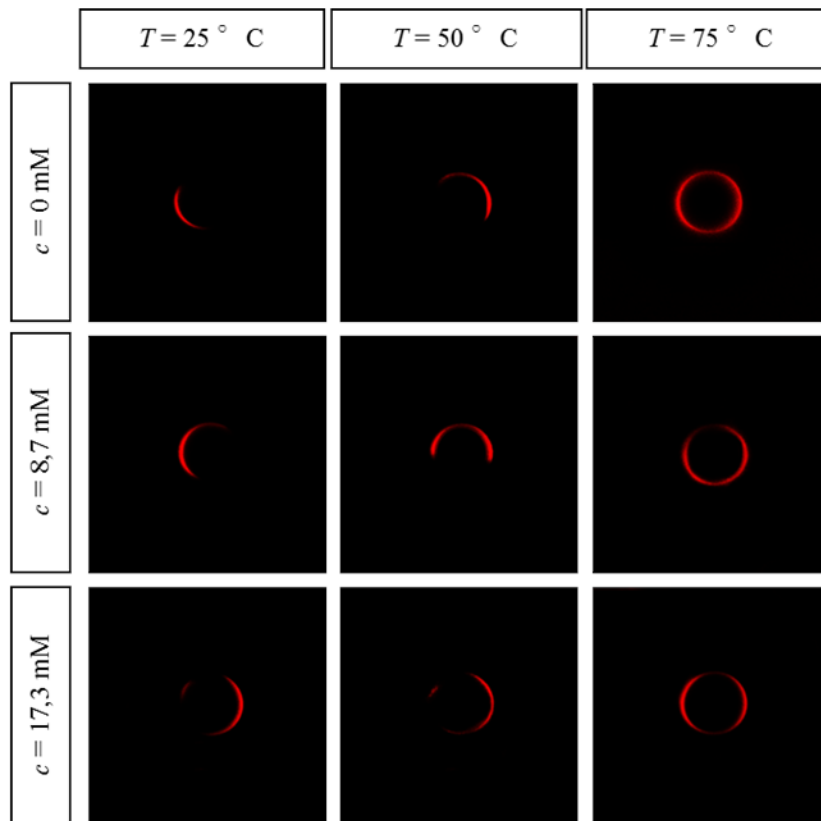


Abb. 5-7: Fluoreszenzmikroskopie der Fünf-KS-Vesikel bei steigender Y^{3+} -Konzentration

Temperaturabhängige, konfokale Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen als Querschnittsaufnahmen der heterogenen Fünf-Komponenten-Liposomen bei ausgewählten Temperaturen und relevanten Y^{3+} -Ionenkonzentrationen. Rote Fluoreszenz markiert die flüssig ungeordneten l_d -Phasen als Resultat des präferierten Einbaus des *N*-Rh-DHPE in die fluiden Phasen. Die Abbildungen zeigen exemplarisch die in einer Vielzahl an Liposomen nachgewiesenen Effekte mehrerer, unabhängig voneinander präparierter Proben.

Die Zugabe hoher Y^{3+} -Mengen auf Konzentrationen von 1 mg mL^{-1} führte hingegen zu spontanem Zerreißen und Ausbildung von Einstülpungen in der Membran der Vesikel innerhalb weniger Sekunden, wie in Abb. 5-8 gezeigt ist. Darüber hinaus vollzogen einige der Vesikel deutliche Formveränderungen, wie sie bereits in stärkerem Ausmaß für La^{3+} , Gd^{3+} sowie für Ca^{2+} beschrieben wurden. ^[92,117] Kürzliche Arbeiten legen nahe, dass Ca^{2+} die Membrankrümmung durch die Interaktion mit den anionischen Lipiden beeinflusst und somit die Fusion von Vesikeln fördert. Diese wird zum Teil durch die erhöhte Adhäsion zwischen den Vesikeln, jedoch ebenfalls vermutlich durch die Einflüsse auf die Membrankrümmung, ausgehend von multivalenten Kationen, induziert, welche die Fusionsstadien zu stabilisieren scheinen. ^[117] Ca^{2+} -Ionen, wie auch die hier untersuchten Y^{3+} -

Ionen führen somit zu Einstülpungen in den Membranen der GUVs aufgrund einer spontanen, negativen Krümmung, welche durch die Kationen generiert wird. [117]

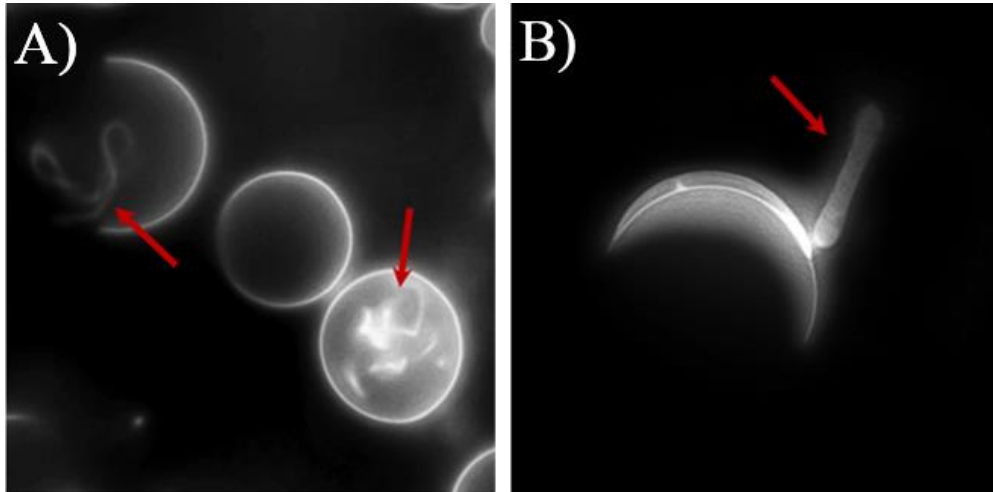


Abb. 5-8: Fluoreszenzmikroskopie: Osmotischer Stress durch Y^{3+} -Ionen

Beispielhafte Aufnahmen von A) Ruptur und B) Formveränderung von Vesikeln als Resultat der Zugabe von $1 \text{ mg mL}^{-1} Y^{3+}$ zu den 10 % anionischen 20:5:45:5:25 mol% DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Chol.-GUVs. Die roten Pfeile markieren die Membranfragmente in A) sowie tubulierte Vesikel in B). Die Bilder wurden mit einer Quecksilberdampflampe unter Verwendung einer CCD Kamera aufgenommen. Die Abbildungen repräsentieren beispielhaft in mehreren unabhängig voneinander untersuchten Proben mehrfach beobachtete Resultate.

5.3.6 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Um detailliertere Einblicke in die Morphologie und laterale Membranstruktur der heterogenen Fünf-Komponenten-Membran in höherer Auflösung als durch die Fluoreszenzmikroskopie möglich zu erhalten, wurden Rasterkraftmikroskopieaufnahmen dieser Membran bei verschiedenen Y^{3+} -Ionenkonzentrationen in Flüssigkeiten unter Verwendung des Tapping-Mode[®] aufgenommen. In Abwesenheit des trivalenten Kations zeigen die Aufnahmen bei Raumtemperatur in Übereinstimmung mit vorangegangenen Veröffentlichungen deutliche l_d -/ l_o -Phasentrennung. [94] Die koexistierenden Phasen können anhand ihrer Höhendifferenz von 1,2 – 1,5 nm voneinander unterschieden werden, wie in dem in Abb. 5-9 A) gezeigten Höhenprofil der Membran zu erkennen ist. Diese Höhendifferenz der reinen Membrandomänen steht in Übereinstimmung mit der Literatur [94,110,118]. Die Höhenverteilung der Lipiddoppelschicht, welche in Abb. 5-9 B) zu sehen ist, zeigte eine konstante Höhendifferenz zwischen den ungeordneten l_d -Domänen und den geordneteren l_o -Domänen, wie aus der Differenz der Maxima der Höhenverteilungsfunktion zu erken-

nen ist. Zugabe von 8,7 mM Y^{3+} resultierte in keinen signifikanten Effekten auf die laterale Organisation der Lipiddoppelschicht. Erhöhung der Konzentration der Y^{3+} -Ionen auf 17,3 mM führte lediglich zu minimalen, vernachlässigbaren Effekten. Die Höhendifferenz zwischen den beiden ausgebildeten Phasen verringert sich hierbei minimal, während der Anteil der separierten Domänen an der Gesamtheit der Membran, wie in Abb. 5-9 C) dargestellt, einen minimalen Anstieg der flüssig-geordneten Phase verzeichnet. Einbeziehung der Messunsicherheiten relativieren diesen Anstieg jedoch deutlich, sodass nicht von einer signifikanten Veränderung in den Anteilen der einzelnen Domänen an der Gesamtmembran auszugehen ist. Aus diesem Grund kann der Schluss gezogen werden, dass die Y^{3+} -Ionen keinen signifikanten Einfluss auf die laterale Domänenstruktur der heterogenen Fünf-Komponenten-Membran aufweisen. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie auf der Mikroebene, auf welcher ebenfalls keine signifikanten Effekte nachgewiesen werden konnten. Somit kann abschließend zusammengefasst werden, dass die Adsorption der Y^{3+} -Ionen zu keinen nachweisbaren Veränderungen in der lateralen Domänenstruktur der heterogenen Modellmembran führt, wie sie beispielsweise für Ca^{2+} -Ionen nachgewiesen wurde. Somit besteht bezüglich dieses Aspektes eine Analogie zum Einfluss von Mg^{2+} auf diese Art von Membranen, welche ebenfalls keine gruppierenden Eigenschaften auf Membrandomänen dieser Art aufweisen. ^[119-121]

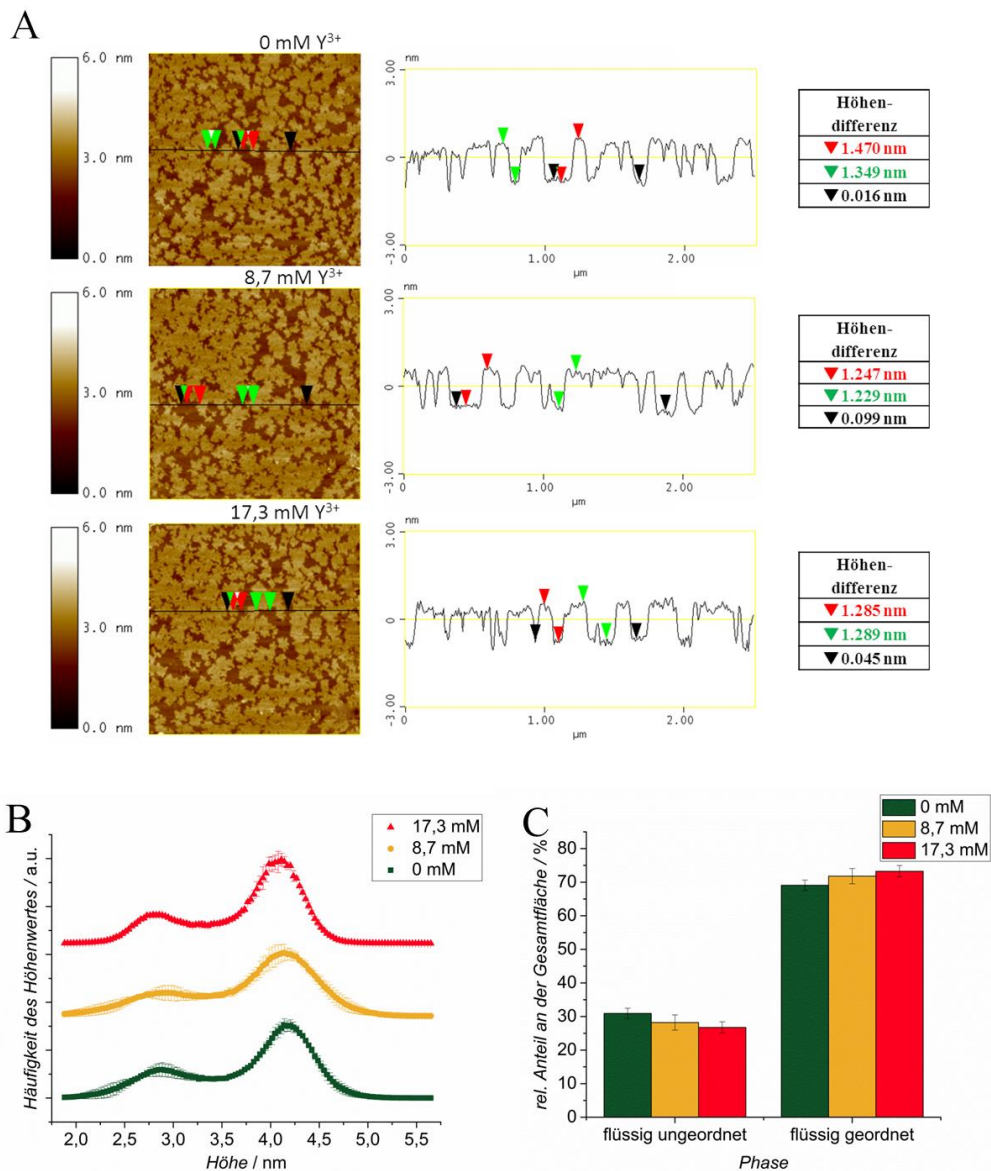


Abb. 5-9 AFM-Bilder der Fünf-KS-Membran bei verschiedenen Y^{3+} -Konzentrationen

A) AFM-Aufnahmen der heterogenen, 10 % anionischen Fünf-Komponenten-Lipidmembran auf Mica bei Raumtemperatur in Abwesenheit und Anwesenheit verschiedener Y^{3+} -Ionenkonzentrationen. Die Abbildungen zeigen eine heterogene Lipiddoppelschicht mit koexistierenden flüssig-geordneten l_o (hell) sowie flüssig-ungeordneten l_d -Domänen (dunkel). Geringe Y^{3+} -Ionenkonzentrationen zeigen keinen nachweisbaren Effekt auf die laterale Organisation der Lipiddoppelschicht. Aufkonzentration der Y^{3+} -Ionen auf 17,3 mM führt zu lediglich minimalen Änderungen der Membranstruktur, welche sich als minimale Veränderung der Höhendifferenzen zwischen den beiden Domänenarten zeigt. Obwohl die laterale Dynamik der Membran infolge der Y^{3+} -Zugabe reduziert erscheint, zeigen Form und Größe der Domänen keine signifikanten Veränderungen. B) Höhenverteilung der Membranbestandteile relativ zur Mica-Oberfläche bei verschiedenen Y^{3+} -Ionenkonzentrationen. Die Differenz zwischen den Maxima der Verteilungsfunktionen repräsentiert den Höhenunterschied zwischen den beiden betrachteten Domänen und verringert sich nur marginal. C) Domänenflächenverteilung für verschiedene Y^{3+} -Ionenkonzentrationen. Die zu erkennende Abnahme des Anteils der Fläche der flüssig-ungeordneten Phase im Vergleich zur flüssig-geordneten Phase liegt innerhalb der Messunsicherheit. A) zeigt exemplarische Bilder der in mehreren unabhängig voneinander präparierten Proben gemachten Beobachtungen. B) und C) zeigen die Mittelwerte der Höhenverteilung sowie der Flächenverteilung zweier separat voneinander ausgewerteter Messungen. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen dieser Mittelwerte.

5.4 Zusammenfassung

In der in diesem Kapitel vorgestellten Studie konnte gezeigt werden, dass trivalente Y^{3+} -Kationen stark an die Kopfgruppenregion von Lipidvesikeln verschiedener Zusammensetzung binden, um so Effekte, vergleichbar mit den durch die Addition von Ca^{2+} -Ionen hervorgerufenen Effekten, zu induzieren. Der Effekt des trivalenten Yttrium-Kations fällt, verglichen mit dem des Ca^{2+} , jedoch deutlich schwächer aus. Beispielsweise ist bekannt, dass die Addition von bereits 10 mM $CaCl_2$ zu reinen DPPS-(Dipalmitoylphosphatidylserin) sowie DPPG-Membranen zu einer vollständigen Unterdrückung des Hauptphasenübergangs in einem Temperaturbereich von 0-70 °C führt, was im Falle des Yttrium-Ions nicht beobachtet werden konnte. ^[81] Y^{3+} -Ionenkonzentrationen von 8-10 mM beeinflussen jedoch dennoch signifikant das Phasenverhalten von Lipidvesikeln, was zu einem Sättigungseffekt oberhalb eines Y^{3+} :Lipid-Verhältnisses von bereits 2:5 führte. Die trivalenten Kationen erhöhten die Hauptphasenübergangstemperatur der neutralen Membran um etwa 2 °C und um 7 °C im Falle der 20 % anionischen Membran. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Effekten durch Ca^{2+} -Ionen, für welche gezeigt wurde, dass diese nur schwach mit zwitterionischen Membranen, jedoch intensiv mit anionischen Membranen wechselwirken. ^[117,122] Vergleichsweise wurde eine geringe Erhöhung der Hauptphasenübergangstemperatur von 1-2 °C als Resultat der Addition monovalenter Kationen wie Na^+ zu neutralen Membransystemen beobachtet, während die Addition von Mg^{2+} zu Phosphatidylserin-Membranen einen Anstieg der Phasenübergangstemperatur von bis zu 8 °C induzierte. ^[81,97] Des Weiteren führte die Addition von Y^{3+} -Kationen zu einer deutlichen Verschiebung des L_{β^-} - zu P_{β^-} -Vorphasenübergangs sowie zu einer deutlichen Phasenübergangsverbreiterung in reinen DPPC- sowie den 80:20 mol% DPPC:DPPG-Membranen aufgrund von Phasentrennungen, wie sie ebenfalls für Ca^{2+} beschrieben wurde. ^[81] Dieser Effekt resultiert höchstwahrscheinlich aus verschiedenen Affinitäten des trivalenten Kations zu den Lipiden DPPC und DPPG, entsprechend ihrer Nettoladung. Die drastische Änderung im Zeta-Potential aller betrachteten Membransysteme belegt eine intensive Kopfgruppen-Kation-Interaktion. Diese besteht mit hoher Wahrscheinlichkeit in direkter Bindung des trivalenten Kations an die Phosphatgruppen der Kopfgruppen (siehe Abb. 5-10). Diese Folgerung steht in Einklang mit der beobachteten Abnahme der Kopfgruppenhydratation, wie sie durch die FT-IR-Untersuchungen sowie durch die Laurdan-Fluoreszenzspektroskopie beobachtet wurde.

Die Messung der Partikelgröße der Vesikel des Fünf-Komponenten-Lipidsystems zeigte einen Anstieg der Partikelgröße mit steigender Y^{3+} -Ionenkonzentration, während eine Erhöhung der Temperatur der vergrößerten Partikel einen gegenläufigen Effekt besaß. Dieses Verhalten lässt sich durch die Aggregation anstelle der ebenfalls möglichen Fusion der Vesikel erklären. Ähnliches Verhalten wurde ebenfalls bereits für Ca^{2+} beschrieben.^[90] Diese Vergleichbarkeiten zu Ca^{2+} sind gut zu erklären, da die Radien beider Ionen mit $r(Y^{3+}) = 0.92 \text{ \AA}$ und $r(Ca^{2+}) = 0.99 \text{ \AA}$ sehr ähnlich sind.^[123] Im Vergleich dazu beträgt der Radius eines Wassermoleküls, welches durch die Komplexierung eines Y^{3+} -Ions ersetzt würde, $\sim 1,5 \text{ \AA}$. Einbau und Komplexierung des Y^{3+} -Ions durch die Phosphatgruppen in der Kopfgruppenregion mehrerer Lipide der Membran führt somit zu einer Versteifung der Membran und einer Stabilisierung der Gel-Phase gegenüber der fluiden Phase bei steigender Temperatur. In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Ergebnissen zeigte sich ein gesteigerter Lipid-Ordnungsparameter in der fluiden Phase durch die Laurdan Fluoreszenzspektroskopie. Des Weiteren ließ sich eine Verminderung des fluid-zu-Gel Phasenübergangsdruckes als Resultat des erhöhten lateralen Kompressionsdruckes in der Membran, hervorgerufen durch die intermolekulare Vernetzung der Membranlipide durch Komplexierung des Y^{3+} , nachweisen. Bemerkenswerterweise zeigten die Fluoreszenzmikroskopie sowie die Rasterkraftmikroskopie keine signifikanten Effekte gesteigerter Y^{3+} -Ionenkonzentrationen auf die laterale Organisation der heterogenen, anionischen Lipiddoppelschichten in Bezug auf die Domänenbildung der verschiedenen Phasen. Dieses Resultat präsentiert sich gegensätzlich zu den Effekten von Ca^{2+} auf heterogene Lipiddoppelschichten, in denen eine Verringerung der Domänengrößen beobachtet wurde.^[119] Der Einfluss auf die laterale Domänenstruktur ähnelt somit eher der des divalenten Kations Mg^{2+} , zu dem berichtet wurde, dass dieses in heterogenen Phosphatidylserinmembranen keine Clusterbildung der Domänen induziert, während es dennoch die Lipidordnung erhöht.^{54-57,59}

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass Y^{3+} -Ionen in der Lage sind, die Einflüsse von Ca^{2+} auf Lipiddoppelschichten und deren Phasenübergänge nachzuahmen, wenn auch in geringerer Ausprägung. Y^{3+} -Ionen dringen tief in die Kopfgruppenregion der Lipiddoppelschichten ein und binden koordinativ an die hier verorteten Phosphatgruppen (Abb. 5-10), was in einer dichteren Packung der Lipide und partieller Dehydrata-

tion der Kopfgruppenregion resultiert, ohne dabei die laterale Struktur der heterogenen Phasenseparation zu beeinflussen.

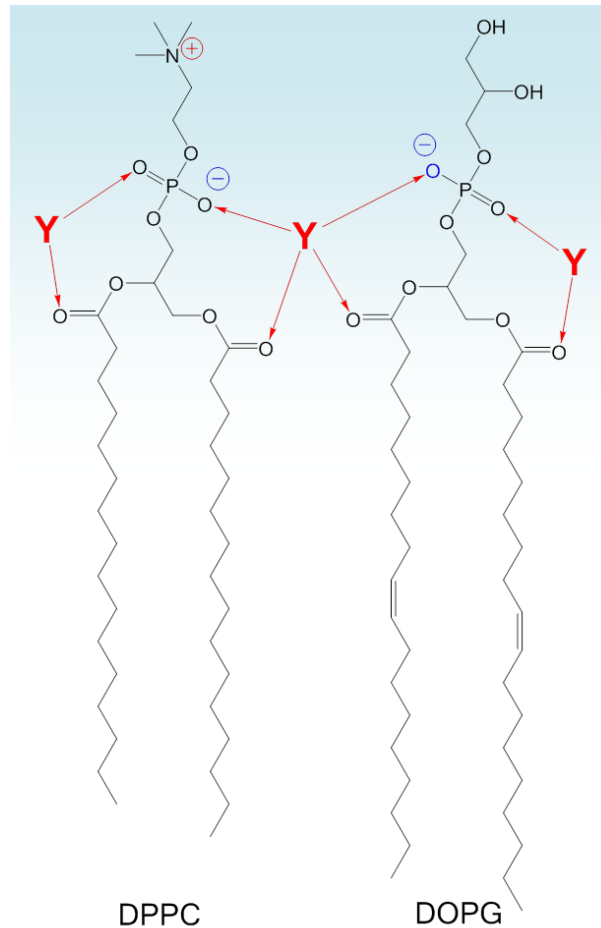


Abb. 5-10 Schematische Darstellung der Y^{3+} -Lipid-Komplexierung

Schematische Darstellung der vorgeschlagenen Y^{3+} -Komplexierung durch die Phospholipid-Modellmembran. Die roten Pfeile repräsentieren mögliche koordinative Bindungen zu den Sauerstoffatomen der Kopfgruppen. Die Phosphatgruppen stellen die bevorzugten Bindungsstellen des Kations dar. Durch die Komplexierung des Y^{3+} -Ions resultiert die Dehydratation der Kopfgruppenregion durch Verdrängung der Wassermoleküle, wobei partielle Dehydratation durch in hohem Maße hydratisierte Y^{3+} -Kationen auftreten kann, wodurch sich innenliegende Komplexe mit den negativ geladenen Phosphatgruppen ausbilden.

Die Koordination des Y^{3+} an mehrere Lipide gleichzeitig resultiert in der erhöhten Packungsdichte sowie der Minimierung der Abstände zwischen den einzelnen Lipiden und den eingebrachten Kationen. Der Anstieg des lateralen Kompressionsdruckes in der Membran als Ergebnis der intermolekularen Vernetzung durch das Y^{3+} liefert zudem eine Erklärung für eine Abnahme der wellenartigen Undulationen der riesigen unilamellaren

Vesikel in Anwesenheit des Y^{3+} , wodurch eine Annäherung der Vesikel untereinander und eine folgende Aggregation dieser begünstigt wird. Der Anstieg des Lipid-Ordnungsparameters, die Abnahme der Querschnittsfläche der Alkylketten und der Anstieg des lateralen Kompressionsdruckes innerhalb der Membran beeinflussen mit hoher Wahrscheinlichkeit die Konformationsstabilität sowie die Funktion membrangebundener Proteine, wie Ionenkanäle oder lipidierter Signalproteine.

6 MEMBRAN-INTERAKTIONEN UND TRANSFEKTIONSVERMÖGEN IMIDAZOLIUMBASIERTER LIPIDE

Teile der in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse sind publiziert in:

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.*, **2020**, *Accepted Manuscript*.

6.1 Einleitung

Bereits im Jahre 1991 wurden die ersten *N*-heterocyclischen Carbene (NHC) isoliert, woraufhin das Interesse an diesen neuartigen Molekülen besonders im Bereich der Organometallkomplexe, der Materialforschung, Medikamentenentwicklung und Katalyse stetig wuchs. ^[125–131] Zu Beginn wurde den zu den Carbenen zugehörigen Imidazoliumsalzen, die durch Addition aliphatischer Kohlenwasserstoff-Restgruppen sehr gut verschiedene Eigenschaften von Membranlipiden imitieren können, nur wenig Aufmerksamkeit zuteil. Heutzutage jedoch stellen die imidazoliumbasierten, lipidartigen Moleküle einen interessanten Ansatz im Kampf gegen Krebs, wie auch als antimikrobieller und antimykotischer Wirkstoff dar. ^[132,133] Darüber hinaus existieren Variationen der *N*-substituierten Imidazoliumringe in einer Vielzahl bioaktiver Moleküle des menschlichen Metabolismus und in vielen weiteren natürlichen Produkten. Ihr amphiphiler und hochpolarer, heterocyclischer Ring neigt aufgrund dieser Eigenschaften zu elektrostatischen Interaktionen mit verschiedensten biologischen Systemen. Insbesondere mit Biomembranen wurde eine ausgeprägte Membranaktivität dieser Imidazoliumsalze beobachtet. ^[134–137] Bedingt durch die kationischen Kopfgruppen dieser alkylierten Imidazoliumderivate weisen diese in Abhängigkeit der Kettenlänge der addierten Alkylketten selbst eher tensidähnliche Eigenschaften auf. ^[138–141]

Durch die Strategie der Molekularhybridisierung zur Entwicklung neuer medizinischer Wirkstoffe wurden durch Prof. Dr. Glorius alkylierte Imidazoliumsalze entworfen und synthetisiert, welche in der Länge der beiden aliphatischen Kohlenwasserstoffreste an der 4- und 5-Position des Imidazoliumringes sowie der Struktur der kationischen Kopfgruppe

Einleitung

variieren. ^[142–144] Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit dieser Derivate mit natürlichen Phospholipiden sind diese Moleküle in der Lage, die physikochemischen Eigenschaften natürlicher Membranbausteine nachzuahmen, wobei sich zeigte, dass einige dieser artifiziellen Lipide eine beträchtliche Anti-Tumor Aktivität wie auch zelluläre Toxizität aufweisen. ^[143,144] Die Zytotoxizität dieser artifiziellen Lipide ist in hohem Maße abhängig von der Länge der Alkylketten an der 4- und 5- Position des Imidazoliumringes. Lange C₁₅-Alkylketten zeigen den Untersuchungen zufolge die geringste Zytotoxizität der verglichenen Spezies, wohingegen verhältnismäßig kurze C₇-Alkylketten eine sehr hohe Toxizität aufweisen. ^[143,144] Im Gegenzug dazu zeigt sich bei längeren Alkylketten eine deutlich höhere Oberflächenaktivität, wodurch deutlich wird, dass die biologische Aktivität der Moleküle stark von deren biophysikalischen Eigenschaften beeinflusst wird. Untersuchungen der Interaktion dieser Moleküle mit Phospholipidmembranen zeigen einen bereitwilligen Einbau des C₁₅Ime·HI in die Lipidmembran, wohingegen das kürzere C₁₁Ime·HI einen lytischen, destabilisierenden Effekt auf die Membran ausübt. Das noch kürzere C₇Ime·HI zeigt hingegen nicht-lytische Eigenschaften und beeinflusst die Membranstruktur nur marginal. ^[143] Weitere Studien fokussieren sich neben dem Einfluss der Alkylkettenlänge auf den Einfluss der Kopfgruppe der lipidartigen Imidazoliumsalze. Hier zeigt sich, dass kleine, hydrophile Substituenten an der Kopfgruppe eine Versteifung einer DPPC Membran bewirken, während sterisch anspruchsvolle, hydrophobe Substituenten zu einer Fluidisierung der Membran führen. ^[142]

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei neuartige imidazoliumbasierte Lipide, das C₁₁IPr·HBr (im Folgenden als C₁₁IPr bezeichnet) mit einer sterisch hoch anspruchsvollen Kopfgruppe, sowie das C₁₁Ime·HI (im Folgenden als C₁₁Ime bezeichnet) mit einer sterisch weniger anspruchsvollen Methyl-Substitution in der Kopfgruppe verglichen, welches bereits zum Teil in der Literatur beschrieben wurde. ^[143–146] Zusätzlich wurde, basierend auf den Resultaten der vorangegangenen Untersuchungen, ein speziell für Transfektion und Fusionsinduktion entworfenes Molekül (im Folgenden als TM bezeichnet) auf seine biophysikalischen Einflüsse in der *raft*-Membran untersucht. Details zu diesen Molekülen sind dem Abschnitt 6.2.2 sowie Abb. 6-1 zu entnehmen. Das C₁₁IPr wurde hierbei mit dem C₁₁Ime in Membransystemen verschiedener Komplexität untersucht und verglichen. Die Molekülstrukturen sind in Abb. 6-1 dargestellt. Aufgrund ihrer Strukturen und

Eigenschaften können die betrachteten Moleküle zur derzeit intensiv untersuchten Klasse der ionischen Flüssigkeiten gezählt werden. ^[147,148]

Begonnen wurden die Untersuchungen an einem simplen Ein-Komponenten-Membransystem, bestehend aus reinem DPPC. Die Komplexität der Membranen wurde anschließend über ein heterogenes, neutrales Drei-Komponenten-System, bestehend aus DPPC:DOPC:Chol. (2:1:1) bis hin zu einem 10 % anionischen, heterogenen DPPC:DOPC:DPPG:DOPG:Chol. (45:5:20:5:25) Fünf-Komponenten-System gesteigert. Letzteres ähnelt in physiologischer Konzentration der anionischen Lipide und in physiologischem Verhalten als *raft*-Membran natürlichen Plasmamembranen. ^[149,150] Die Mehrkomponentensysteme mit eingelagertem Cholesterin weisen bei Raumtemperatur Phasenkoexistenzgebiete *raft*-artiger flüssig-geordneter (l_o) sowie flüssig-ungeordneter (l_d) Phasen auf. ^[151,152] Diese Domänen verschiedener Zusammensetzung und Fluidität stehen in der Diskussion von hoher Relevanz für membranverbundene Prozesse wie Signaltransport, Exo- sowie Endocytose wie auch die Aufnahme von Viren zu sein (Details siehe Kapitel 2.1.4). ^[152–155] Das Ein-Komponenten-System, bestehend aus reinen DPPC-Doppelschichten, lässt hingegen in Ermangelung von Phasenkoexistenzgebieten bei Temperaturerhöhung die Untersuchung auf die Einflüsse von scharfen, lamellaren Phasenübergängen in Form von Gel-zu-Gel Vorphasenübergängen ($L_{\beta'}/P_{\beta'}$), wie auch von Gel-zu-flüssig Hauptphasenübergängen ($P_{\beta'}/L_{\alpha}$) zu. ^[102,156] Für die Untersuchung des Transfektionspotentials des TM wurde eine DPPC:DOPE (1:1) Lipidmischung als Trägersystem für das TM gewählt, da DOPE als neutrales Lipid mit einer kleinen Ethanolamin-Kopfgruppe negative Krümmungen in der Membran induziert, welche im Zuge der Ausbildung nicht-lamellarer Phasen für die Induktion von Membranfusion förderlich ist (Details siehe Kapitel 2.2). ^[157]

6.2 Material und Methoden

6.2.1 Material

Tab. 6-1: Chemikalien Imidazoliumsalzstudie

Für die in diesem Kapitel untersuchten Proben verwendete Chemikalien sowie zur Präparation der Proben genutzte Lipide und deren Bezugsquellen.

Chemikalien und Lipide	Bezugsquelle
DPPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DOPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DOPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DOPE	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Cholesterin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
N-Rh-DHPE	Invitrogen (Carlsbad, California, USA)
NBD-DHPE	Invitrogen (Carlsbad, California, USA)
Atto-647	ATTO-TEC GmbH (Siegen, Germany)
Laurdan	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Chloroform	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
HEPES	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
TRIS	Alfa Aesar (Haverhill, USA)
PVA	Merck (Darmstadt, Deutschland)

6.2.2 Lipidartige Imidazoliumsalzderivate

Die imidazoliumsalzbasierten Lipide, die für die Untersuchungen in dieser Arbeit Verwendung fanden, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Glorius am Institut für Organische Chemie der Universität Münster entworfen und synthetisiert. Die Lipidstrukturen sowie das Verhalten verschiedener lipidähnlicher 4,5-dialkylierter Imidazoliumderivate wurden zum Teil bereits untersucht und beschrieben. ^[142–146] Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden drei verschiedene Imidazoliumsalzderivate verwendet, deren Strukturen in Abb. 6-1 dargestellt sind. Als Vergleichsmolekül wurde das 1,3-dimethyl-4,5-diundecyl-1H-imidazol-3-iumiodid (C₁₁IME) verwendet, da dies bereits in verschiedenen Untersuchungen verwendet wurde und die gleiche Kettenlänge aufweist. ^[142] Das

zweite verwendete, neu entworfene Molekül stellt das 3-bis(2,6-diisopropylphenyl)-4,5-diundecyl-1H-imidazol-3-iumbromid dar, welches sich durch seine sterisch anspruchsvolle Kopfgruppensubstituenten auszeichnet und im Folgenden als $C_{11}IPr$ bezeichnet wird. Als drittes synthetisiertes Molekül wurde das 1,3-Dimethyl-4,5-dipentadecyl-2-(5-(trimethylammonio)pentyl)imidazoliumiodid, welches im Folgenden als Transfektionsmolekül (TM) bezeichnet wird, entworfen, um eine Vesikelfusion kationischer Lipoplexe mit anionischen Zielsystemen zu induzieren. Die für dieses spezielle Molekül ausgewählten Methoden sind darauf ausgelegt, das Transfektionspotential dieser Struktur zu bestimmen, wohingegen die Methoden der $C_{11}IMe$ - sowie der $C_{11}IPr$ -Untersuchungen ausgewählt wurden, um deren Interaktion mit den Modellmembranen und deren Einflüsse auf die biophysikalischen Eigenschaften dieser zu untersuchen.

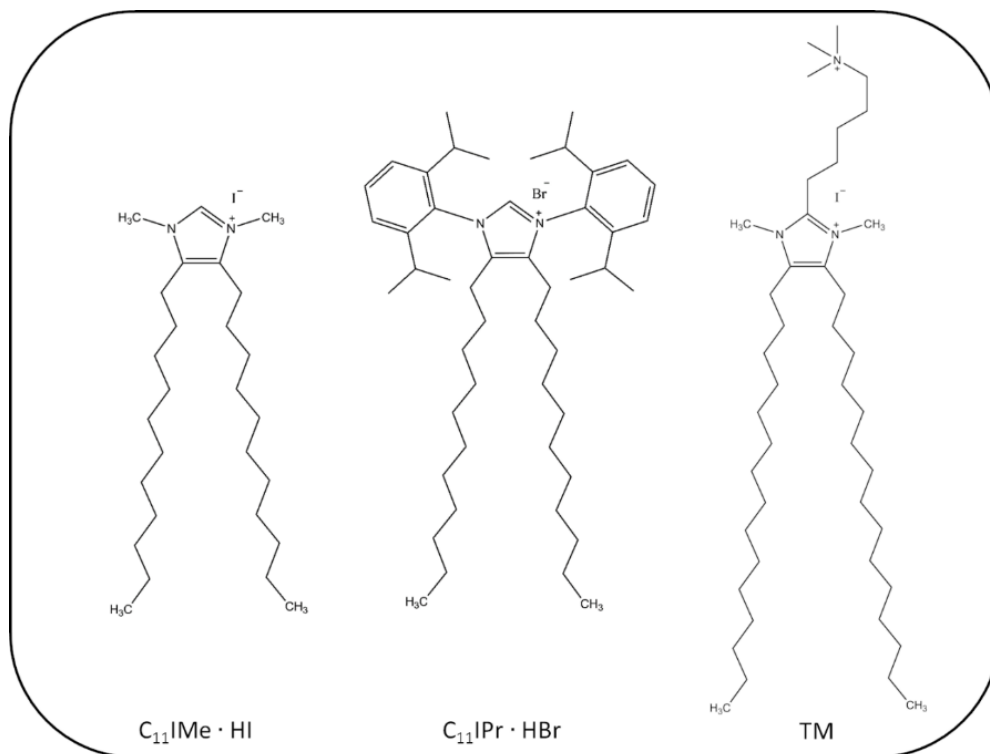


Abb. 6-1: Lipidartige Imidazoliumsalzderivate

Die in dieser Arbeit verwendeten lipidartigen Imidazoliumsalzderivate. $C_{11}IMe \cdot HI$ als Vergleichsmolekül, $C_{11}IPr \cdot HBr$ als Molekül mit sterisch anspruchsvoller Kopfgruppe und TM zur Induktion von Fusions- und Transfektionsprozessen.

6.2.3 Präparation der Lipidvesikel

Die Modellmembranen unterschiedlicher Zusammensetzung wurden durch Mischung zuvor präparierter 10 mg mL^{-1} Stammlösungen der reinen Lipidkomponenten in Chloroform hergestellt. Es wurden fünf Grundsysteme erstellt: a) reines DPPC, b) 2:1:1 mol% DPPC:DOPC:Cholesterin, c) 20:5:45:5:25 mol% DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Cholesterin, d) 1:1 mol% DOPE:DPPC sowie e) 1:2:1 mol% DOPE:DPPC:Cholesterin. Die Imidazoliumsalzderivate wurden entsprechend der in den einzelnen Messungen angegebenen Mischungsverhältnisse angesetzt, wobei der molare Anteil der imidazoliumsalzderivatehaltigen Lipidlösungen durch äquivalente Reduzierung des DPPC-Anteils in der Membran kompensiert wurde. Für die fluoreszenzspektroskopischen sowie fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden $10 \mu\text{L mg}^{-1}$ Lipid einer 1 mM Laurdan[®] Lösung beziehungsweise 0,1 mol% *N*-Rhodamin-DHPE oder NBD-DHPE der Membrankennung zur Lipidmischung hinzugegeben (Strukturen der Fluorophore siehe Anhang Abb. 10-2 und Abb. 10-3). Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurde in einigen Fällen Atto-647 als Fluoreszenzmarker des Umgebungspuffers in einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ verwendet. Die Struktur dieses Fluorophors ist im Anhang in Abb. 10-4 einzusehen. Die Präparation der multilamellaren Vesikel, der riesigen unilamellaren Vesikel sowie der großen unilamellaren Vesikel erfolgte entsprechend der Präparationsvorschrift aus Kapitel 5.2.2 sowie der Literatur. ^[156,158,159] Die Messungen wurden an mindestens drei unabhängig voneinander präparierten Proben durchgeführt.

6.2.4 FT-IR-Spektroskopie

Für die FT-IR-Untersuchungen wurden multilamellare Vesikel einer Gesamtlipidkonzentration von 10 gew% in 10 mM HEPES Puffer in D₂O bei einem pH-Wert von 7,4 verwendet. Es wurden insgesamt fünf verschiedene C₁₁Ime und C₁₁IPr Konzentrationen in einem Bereich von 0 mol% bis 15 mol% in reinen DPPC-Membranen sowie drei verschiedene Konzentrationen zwischen 0 mol% und 10 mol% in 2:1:1 DPPC:DOPC:Chol.- und 20:5:45:5:25 mol% DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Chol.-Membransystemen untersucht. Die temperaturabhängigen FT-IR-Spektren wurden mit Hilfe einer Messzelle, bestehend aus zwei infrarottransparenten Calciumfluoridfenstern (Korth Kristalle GmbH, Deutschland) separiert durch eine zentral gelochte Folie zur Aufnahme von $20 \mu\text{L}$ Probe, aufgenommen. Die für jede Messlinie aufgenommenen und gemittelten 128 Einzelspektren

wurden mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} an einem Bruker Vertex-70 FT-IR-Spektrometer (Billerica, USA) aufgenommen. Störungen durch CO_2 oder H_2O in der die Messzelle umgebenden Gasphase wurden durch mindestens 15 minütiges Spülen der Mess- sowie Detektorkammer mit CO_2 -freier, getrockneter Luft vor jeder Messung ausgeschlossen. Die temperaturabhängige Messung wurde durch die Nutzung eines externen Kälte-Umwälzthermostates der Firma Julabo (Seelbach, Deutschland) und des zugehörigen Kontrollprogrammes Julabo Easy Temp zur Erstellung einer Temperaturreampe unter Nutzung eines Pt-100 Thermofühlers in der Messzelle realisiert. Vor jeder Messung wurde die Messzelle für mindestens 15 Minuten thermisch äquilibriert, wobei die Temperatur der Zelle alle drei Sekunden aufgezeichnet wurde.

6.2.5 Wärmestromdifferenzkalorimetrie

Die Untersuchungen mittels Wärmestromdifferenzkalorimetrie wurden an reinen DPPC Vesikeln unter Zumischung verschiedener Konzentrationen zwischen 0 mol% und 15 mol% C_{11}IME sowie 0 mol% bis 50 mol% C_{11}IPr durchgeführt. Die Präparation der multilamellaren Vesikel erfolgte analog der oben beschriebenen Präparation für die FT-IR-Untersuchungen. Die DSC-Messungen wurden an einem Q20 Differential Scanning Calorimeter der Firma TA Instruments (New Castle, USA) unter Verwendung der zugehörigen Tzero[®] Probenpfännchen (TA Instruments, New Castle, USA) durchgeführt. Das Probenvolumen betrug $20\ \mu\text{L}$ der zu untersuchenden Mischung, wobei $20\ \mu\text{L}$ des reinen verwendeten Puffers als Referenz vermessen wurden. Vor jeder Messung wurden die Proben für 5 Minuten thermisch äquilibriert bevor eine Temperaturreampe mit einer Heizrate von $1,5\ \text{°C min}^{-1}$ im in den Messdaten angegebenen Temperaturbereich appliziert wurde.

6.2.6 Fluoreszenzspektroskopie

Um Informationen über die temperaturabhängige Änderung der lateralen Ordnung der Modellmembranen sowie der ebenfalls temperaturabhängigen Membranfluidität zu erhalten, wurden fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen unter Zuhilfenahme des Fluorophors 6-dodecanoyl-N,N-dimethyl-2-naphthylamine (Laurdan) durchgeführt. Die Untersuchungen wurden in einem Temperaturbereich zwischen $10\ \text{°C}$ und $80\ \text{°C}$ durchge-

führt. Die Präparation der multilamellaren Vesikel erfolgte analog der Präparation der oben beschriebenen FT-IR- und DSC-Proben. Es wurde eine Gesamtlipidkonzentration von 10 mg mL^{-1} unter Zugabe einer Laurdan-Lösung auf ein Verhältnis von 1 mol Lipid: 0,000735 mol Laurdan gewählt. Die Konzentrationen der Imidazoliumsalzderivate wurden auf 5 mol% und 10 mol% für das $C_{11}\text{Ime}$ sowie das $C_{11}\text{IPr}$ festgelegt. Für die Untersuchungen in reinen DPPC-Membranen sowie in den Untersuchungen des Transfektionsmoleküls wurde eine Konzentration 10 mol% für die eingesetzten Moleküle ausgewählt. Die Untersuchungen des $C_{11}\text{Ime}$ sowie des $C_{11}\text{IPr}$ wurden an reinen DPPC-Vesikeln, wie auch an dem Drei- und Fünf-Komponenten-System durchgeführt, wohingegen die Untersuchungen des Transfektionsmoleküls an reinen DPPC-Membranen sowie an 1:1 DPPC:DOPE und dem anionischen Fünf-Komponenten-System durchgeführt wurden. Zur Messung der spektroskopischen Daten wurde ein K2 multifrequency phase modulation fluorometer der Firma ISS Inc., Champaign, USA verwendet. Anregung des Fluorophors erfolgte bei einer Wellenlänge von 390 nm während die Emissionsintensität in einem Spektralbereich von 420 nm bis 520 nm detektiert wurde. Quantifizierung der spektralen Änderungen wurde durch die Anwendung des Prinzips der generalisierten Polarisation (*GP*) gewährleistet. In allen Messungen wurde eine Detektionszeit der Photonen-zählung von 1 s gewählt. Temperaturabhängige Messungen wurden durch die Verwendung eines externen Kälteumwälzthermostates der Firma Julabo, Seelbach, Deutschland, realisiert, welcher an die temperierbare Messzelle des Fluoreszenzspektrometers angeschlossen wurde.

6.2.7 Fluoreszenzmikroskopie

Die präsentierten Untersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden an reinen DPPC-Membranen, wie auch an den heterogenen Drei- sowie Fünf-Komponenten-Lipidsystemen durchgeführt. Zur Präparation wurden Stammlösungen der Lipide in Chloroform angesetzt, welche entsprechend der gewünschten Zusammensetzung des Modellmembransystems in einer Gesamtlipidkonzentration von 1 mg mL^{-1} gemischt wurden. Zur fluoreszenten Markierung der Membran wurden $3 \mu\text{L}$ einer $0,1 \text{ mM}$ *N*-Rh-DHPE beziehungsweise NBD-DHPE Lösung zu der Lipidmischung in Chloroform zugegeben, um ein molares Lipid-zu-Fluorophor-Verhältnis von 500:1 entsprechend einer Fluorophorkonzentration von 0,1 mol% zu erreichen. Riesige, unilamellare Vesikel wurden

durch Elektroformation entsprechend der Vorgehensweise aus Kapitel 5.2.6 bei einer Temperatur von 75 °C mittels eines elektrischen Wechselfeldes einer Amplitude von 2 V und einer Frequenz von 500 Hz mittels eines TG315 Funktionsgenerators der Firma Thurlby Thandar Instruments, Huntington, UK, hergestellt, welches über ein 3 mm schmales Kupferklebeband 3M™ ET1181 mit elektrisch leitfähiger Klebeseite der Firma 3M, Neuss, Deutschland, auf die Coverslips übertragen wurde. ^[8] Die Präparation der riesigen unilamellaren Vesikel der anionischen Fünf-Komponenten-Mischung erfolgte hingegen mit Hilfe eines elektrischen Wechselfeldes der Amplitude 0,14 V für die initialen 5 min, 1,25 V für die folgenden 20 min und anschließenden 3,5 V für weitere 90 min bei einer konstanten Frequenz von 10 Hz. Nach Ablauf dieser Protokolle wurde die Temperatur der Präparationszelle stetig mit einer Rate von 1 °C min⁻¹ bis auf Raumtemperatur reduziert. Die Temperaturabhängigkeit der Mikroskopiemessungen wurde durch Temperierung der ebenfalls zur Messung verwendeten Präparationszelle durch einen externen Kälte-Umwälzthermostat der Firma Julabo, Seelbach, Deutschland, realisiert.

Die riesigen, unilamellaren Vesikel der DPPC:DOPE-Mischung in den Untersuchungen des Transfektionsmoleküls wurden zudem unter anderem mittels Polyvinylalkohol (PVA, $M \approx 145000 \text{ g mol}^{-1}$) -unterstützter Präparation hergestellt. Hierzu wurden runde Objektträger mit 150 µL einer 5 gew% PVA-Lösung beschichtet und mittels eines Spin-Coaters bei 1800 U min⁻¹ für 60 s auf der Oberfläche verteilt, um anschließend bei 65 °C für 45 min im Ofen getrocknet zu werden. Anschließend wurde die PVA-Schicht mit 20 µL der Lipidlösung in Chloroform versehen, welche bei 800 U min⁻¹ für 60 s auf dieser verteilt wird. Nach Entfernen des Lösungsmittels durch Gefriertrocknung unter Vakuum für mindestens 2 h wurden die beschichteten Objektträger mit Puffer versehen und bei 75 °C für 45 min inkubiert. Die so präparierten Vesikel wurden den parallel durch Elektroformation erstellten Vesikeln durch das Schlauchsystem der Whatman Elektroformationszelle zugefügt. Das Schlauchsystem erlaubt einen Austausch des Umgebungspuffers des Elektroformationsansatzes sowie die Zugabe extern präparierter Additive während der Messung.

Die Bilder wurden mit Hilfe des konfokalen Laser scanning Mikroskopes Biorad MRC 1024, Zeiss, Deutschland, aufgenommen, welches an ein invertiertes Nikon Eclipse TE-300 DV Mikroskop gekoppelt ist. Fluoreszenzanregung erfolgte bei Wellenlängen von 488 nm, 561 nm sowie 648 nm durch einen kombinierten L4Cc-CSB-130 Laser der Firma

Oxxius Simply Light, Lannion, Frankreich. Die Verarbeitung der aufgenommenen Bilder erfolgte durch die Software LaserSharp2000 der Firma Zeiss, Deutschland. Die Aufnahmen wurden mittels eines ölunterstützten Objektivs des Typs CFI Plan Apo λ 100x Oil, NA 1.45 WD 0.13, Nikon, Tokyo, Japan, aufgenommen. Für alle Modellmembransysteme und Temperaturen wurden repräsentative Aufnahmen der auftretenden Effekte an mehreren Stellen jeder Probe und für mindestens 3 separat voneinander präparierte Proben aufgenommen.

6.2.8 *Dynamische Lichtstreuung*

Um Informationen über das Zeta-Potential der elektrischen Doppelschicht an der Grenzfläche der Vesikel relativ zu einem weit entfernten Punkt im umgebenden Medium zu erhalten, wurde die Methode der dynamischen Lichtstreuung gewählt. Die Messungen wurden an Vesikeln aus reinem DPPC sowie aus dem anionischen Fünf-Komponenten-System unter Einfluss der C₁₁Ime und C₁₁IPr Moleküle durchgeführt. Die Präparation multilamellarer Vesikel einer Gesamtlipidkonzentration von 10 mM erfolgte analog zur oben beschriebenen FT-IR-Präparation. Unilamellarität sowie eine homogene Größenverteilung der Vesikel wurde durch 21-maliges Extrudieren durch einen 100 nm Porengröße aufweisenden Polycarbonatfilters Nucleopore[®] Polycarbonate Track-Etch[™], Whatman GmbH, Dassel, Deutschland, gewährleistet. Die Messungen wurden an einem ZetaSizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK, unter Verwendung der zugehörigen Kapillarzellen DTS 1070 des gleichen Herstellers bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. An allen betrachteten Systemen wurden mindestens drei separat voneinander präparierte Proben in 15 separaten Scans pro Probe untersucht, deren Ergebnisse gemittelt wurden.

6.2.9 *Rasterkraftmikroskopie*

Zur bildgebenden Untersuchung der Mikrokompartimentierung innerhalb der Membran auf der Nanometerskala wurde die Rasterkraftmikroskopie in Flüssigkeiten unter Verwendung des Tapping-Mode[®] herangezogen. Die Präparation der Proben erfolgte initial analog der Präparation der multilamellaren Vesikel der FT-IR-Untersuchung. Rehydratation des Lipidfilms erfolgte hierbei jedoch durch einen 20 mM TRIS, 5 mM CaCl₂ Puffer bei pH 7,4 bis zu einer Gesamtlipidkonzentration von 1,94 g mL⁻¹. Eine detaillierte Be-

schreibung der Präparation ist in Referenz ^[110] einzusehen. Die multilamellaren Vesikel wurden analog zur DSC-Präparation 21-fach durch einen Polycarbonatfilter (Nucleopore[®] Polycarbonate Track-Etch[™], Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) extrudiert. Inkubation der Vesikel auf atomar planaren Micaplatten (5-D-10, Nanoandmore GmbH, Wetzlar, Deutschland) erfolgte für 2 h bei 80 °C unter Ausschluss des Verdampfens des Lösungsmittels des Puffers. Die Mikroskopiebilder wurden durch ein MultiMode scanning probe Mikroskop in Verbindung mit einem NanoScope IIIa Controller der Firma Digital Instruments, Santa Barbara, USA, unter der Verwendung eines J-Scanners aufgenommen. Als Abtastsonden wurden Cantilever der Firma Bruker, Billerica, USA, einer nominalen Kraftkonstante von 0,35 Nm⁻¹ in Flüssigkeiten im Tapping Mode[®] innerhalb einer Flüssigkeitszelle, MTFML, Veeco, Mannheim, Deutschland bei einer Abtastrate von 1,0 Hz verwendet. Es wurden mindestens zwei separat voneinander präparierte Proben untersucht, wobei die einzelnen Membranen an mindestens drei verschiedenen Stellen der Probe betrachtet wurden.

6.2.10 Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration

Die Bestimmung der kritischen Mizellbildungskonzentration des C₁₁IPr erfolgte mittels Filmwaagenmessung. Hierfür wurde eine 0,1 M Stammlösung des Imidazoliumsalzes in Chloroform hergestellt und in definierter Menge auf eine Wasseroberfläche in einem LANGMUIR-Trog gegeben. Der Oberflächendruck Π_s wurde bei einer Temperatur von 20 °C mittels einem Oberflächendrucksensor Type PS4 (NIMA Technology Ltd., Coventry/England) aufgezeichnet. Eine detaillierte Beschreibung des Messablaufes sowie der Auswertung ist den Referenzen ^[143,144] zu entnehmen.

6.3 Ergebnisse und Diskussion

6.3.1 FT-IR-Spektroskopie

Teile der FT-IR-Untersuchungen wurden unter Anweisung und Aufsicht durch S. Kriegler und D. Brandis im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.

Um Rückschlüsse auf die Konformationsordnung der Lipid-Alkylketten der Modellmembransysteme ziehen zu können, wurden die Änderungen in den IR-Banden in der

spektralen Region zwischen 2800 cm^{-1} und 3100 cm^{-1} untersucht. ^[102,111] Als Indikator für den Gel-zu-flüssig Phasenübergang der Membran wurden insbesondere die Vibrationsmoden der CH_2 -Gruppen der Lipid-Alkylketten in der spektralen Region zwischen 2916 cm^{-1} und 2925 cm^{-1} betrachtet. Aufgrund der temperaturinduzierten Veränderungen des *trans-gauche* Verhältnisses der CH_2 -Gruppen der Alkylketten tritt hier beim Phasenübergang eine signifikante Verschiebung der Position der vibrationspezifischen Banden auf. ^[102,111] Somit kann die Änderung des Bandenmaximums der spezifischen Vibrationsbande als Observable für die Fluidität der Membran herangezogen werden.

In der reinen DPPC-Membran zeigt sich als Resultat des Einbaus des C_{11}IME eine signifikante Verringerung der Gel-zu-flüssig Hauptphasenübergangstemperatur, T_m , was einen fluidisierenden, die flüssige Phase gegen niedrigere Temperaturen stabilisierenden Effekt, dieses Moleküls aufzeigt. Eine Sättigung erreicht dieser Effekt bereits bei einer Konzentration von $7,5\text{ mol}\%$ C_{11}IME in der Membran, welcher sich in einer um 3 °C gesenkten Hauptphasenübergangstemperatur gegenüber der reinen DPPC-Membran darstellt. Eine weitere Erhöhung auf bis zu $15\text{ mol}\%$ C_{11}IME in der Membran zeigte keine weitere Senkung der Phasenübergangstemperatur.

Tab. 6-2: T_m : C_{11}IME und C_{11}IPr in DPPC-Membranen ¹

Anteil / mol%	$T_m / \text{°C}$ (C_{11}IME)	$T_m / \text{°C}$ (C_{11}IPr)
0	$40,4 \pm 0,2$	$40,4 \pm 0,2$
7,5	$37,5 \pm 0,2$	$37,8 \pm 0,5$
10	$38,6 \pm 0,4$	$34,6 \pm 0,3$
12,5	$37,1 \pm 0,3$	$33,6 \pm 0,3$
15	$36,9 \pm 0,3$	$29,9 \pm 0,6$

Der Einbau von C_{11}IPr in die DPPC-Membran zeigte im Vergleich deutlich ausgeprägtere Effekte. Während bei einem molaren Anteil von $7,5\text{ mol}\%$ C_{11}IPr in der Membran ledig-

¹ Ergebnisse auf Basis der Messungen von S. Kriegler im Rahmen der Bachelorarbeit.

lich eine Verringerung der Übergangstemperatur, T_m , von etwa 2 °C auftritt, führt einer weiteren Erhöhung des molaren Anteils des Moleküls in der Membran zu einer maximalen Verringerung von T_m von bis zu 10 °C bei einem molaren Anteil von 15 mol% C₁₁IPr in der Membran. Im Falle des C₁₁IME ist für die Verringerung der T_m bereits bei einem molaren Anteil von 7,5 mol% eine Sättigung des Effektes zu beobachten, woraufhin weitere Erhöhung der Konzentration im Rahmen der methodisch bedingten Messunsicherheit keine signifikanten Änderungen der Phasenübergangstemperatur nach sich zieht. Durch die generelle Absenkung der T_m zeigt sich eine deutliche Störung der Membrandoppelschicht durch den Einbau des C₁₁IPr, welche in geschwächten intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten der Lipide resultieren. Bei beiden Imidazoliumsalzderivaten kann dies zum Teil auf die kürzere Kettenlänge der Moleküle zurückgeführt werden, wobei die ausgeprägte Differenz zwischen den maximalen Effekten beider Salze im Falle des C₁₁IPr auf die deutlich ausgeprägtere Störung der Membran durch die große Kopfgruppe des Moleküls zurückzuführen ist.

Die Maxima der spezifischen Vibrationsbanden aus den gemessenen FT-IR-Kurven der reinen DPPC-Membran sowie der heterogenen 2:1:1 DPPC:DOPC:Chol.- und der anionischen 45:5:20:5:25 DPPC:DPPG:DOPC:DOPG:Chol.-Modellmembran sind in Abb. 6-2 dargestellt. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung der heterogenen Membransysteme weisen diese einen breiten Phasenkoexistenzbereich auf, die sich aufgrund der Koexistenz von flüssig-ungeordneten und flüssig-geordneten Domänen in der lateralen Membranstruktur ausbilden und einen scharfen Gel-zu-flüssig Phasenübergang verhindern. Wie zu erwarten ist, beeinflussen beide Imidazoliumsalzderivate auch die Ordnung dieser heterogenen Membransysteme. Der Einbau des C₁₁IME und des C₁₁IPr in das neutrale Drei-Komponenten-System führt zu einer Erhöhung der Wellenzahl der CH₂-Vibrationsbande im gesamten untersuchten Temperaturbereich, was auf eine gesteigerte Unordnung der Alkylketten durch eine höhere Anzahl an *gauche*-Konformeren und somit einer gesteigerten Fluidität der Membran hinweist. Der Einbau der Moleküle in das anionische Fünf-Komponenten-System spiegelt vergleichbare Effekte wieder.

Um weitere Informationen über die in den heterogenen Membranen auftretenden Effekte zu erlangen, wurden im Folgenden fluoreszenzspektroskopische sowie fluoreszenzmikroskopische und rasterkraftmikroskopische Untersuchungen an diesen Systemen durchgeführt.

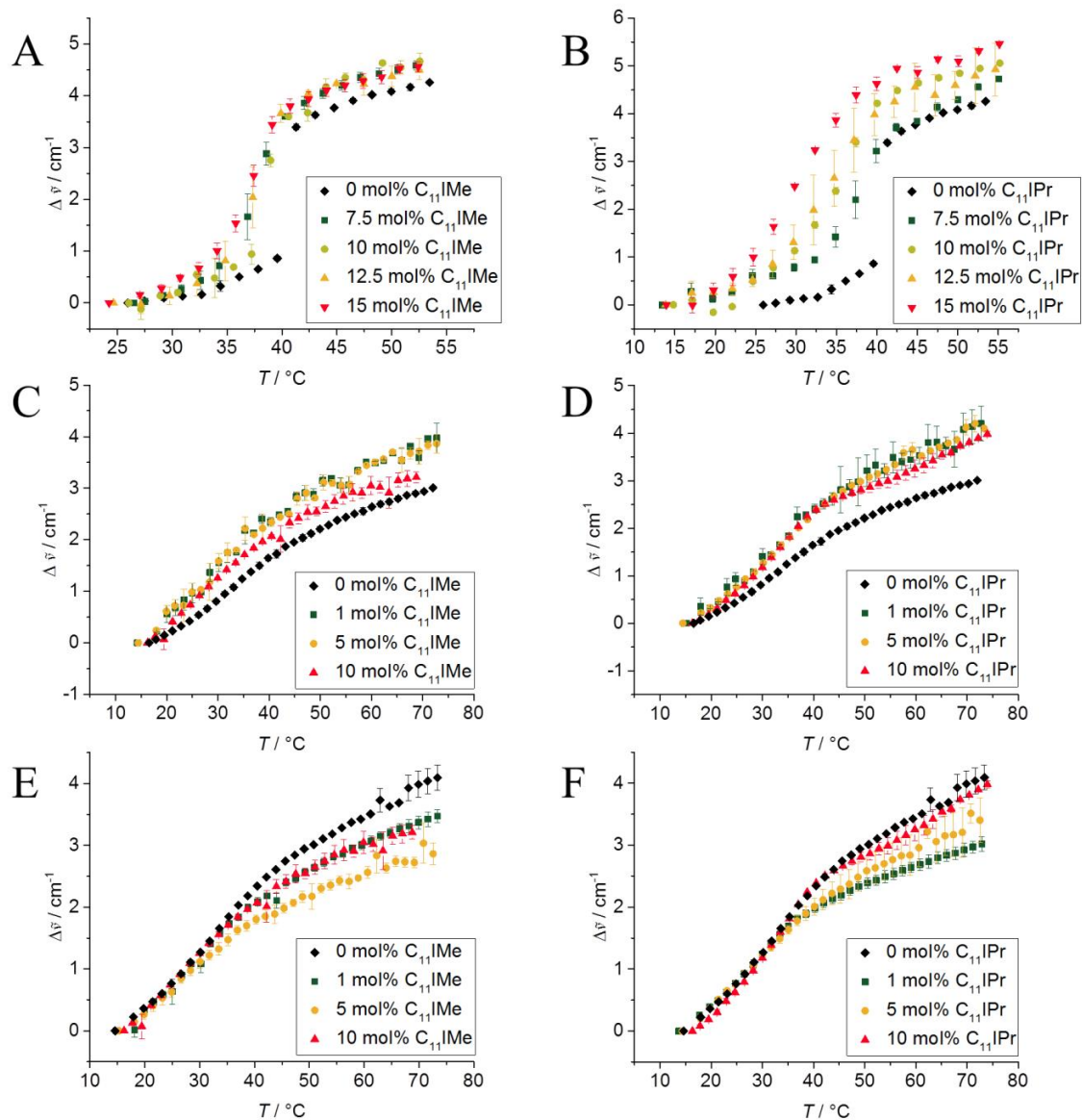


Abb. 6-2: Temperaturabhängige FT-IR-Daten von C₁₁Ime und C₁₁IPr in Modellmembranen²

Änderungen der Wellenzahl, $\Delta\tilde{\nu}$, der CH₂-Vibrationsbanden einer A), B) reinen DPPC- C), D) 2:1:1 DPPC:DOPC:Chol.- und E), F) 45:5:20:5:25 DPPC:DPPG:DOPC:DOPG:Chol.-Membran ohne und mit eingebautem C₁₁Ime (A), C), E)) und C₁₁IPr (B), D), F)). Die heterogenen Lipidsysteme weisen eine ausgeprägte Phasenkoexistenz auf, während die reine DPPC-Membran einen scharfen Gel-zu-flüssig Phasenübergang zeigt. Alle Phasenübergänge werden signifikant durch den Einbau der Imidazoliumsalzderivate beeinflusst.

² Messungen in A & B durchgeführt durch S. Kriegler sowie in E & F durch D. Brandis im Rahmen der Bachelorarbeit.

6.3.2 Wärmestromdifferenzkalorimetrie

Teile der DSC-Untersuchungen wurden unter Anweisung und Aufsicht durch S. Krieger im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt.

Für zusätzliche thermodynamische Einblicke in die Phasenübergangsvorgänge der Membransysteme in Gegenwart und Abwesenheit der Imidazoliumsalzderivate wurden Messungen der Wärmestromdifferenzkalorimetrie durchgeführt. Aufgrund sich bildender Phasenkoexistenzgebiete in den Mehrkomponentensystemen liefern die DSC-Messungen dieser Systeme durch die sich stetig ändernden thermodynamischen Eigenschaften dieser nur Thermogramme eines breiten Koexistenzbereiches, welcher keine relevanten Informationen liefert. Das reine DPPC-System hingegen zeigt durch den scharfen Phasenübergang dieses Systems deutliche Einflüsse der Imidazoliumsalze auf das Phasenübergangverhalten.

Wie in Abb. 6-3 gezeigt, sinkt die Hauptphasenübergangstemperatur, T_m , als Funktion steigender Imidazoliumsalzkonzentration beider Salze, was in guter Übereinstimmung mit den zuvor gezeigten FT-IR-Daten steht. Die Gel-zu-Gel Vorphasenübergangstemperatur, T_p , des DPPC:C₁₁Ime-Systems sinkt ebenfalls als Funktion steigender Imidazoliumsalzkonzentration, verschwindet jedoch komplett bei molaren Anteilen über 5 mol% C₁₁Ime in der Membran. Der Einbau des C₁₁IPr unterdrückt bereits bei einem Anteil von 1 mol% in der Membran den Vorphasenübergang.

Abb. 6-4 zeigt als Resultat des Einbaus des C₁₁Ime das Verschwinden des L _{β} '-zu-P _{β} ' Vorphasenübergangspeaks der DPPC-Membran ab einem molaren Anteil von 5 mol% C₁₁Ime in der Membran. Aller Wahrscheinlichkeit nach liegt dies in der Störung der effizienten Packung benachbarter Lipide durch den Einbau des Fremdmoleküls, welche für die Ausbildung der gewellten P _{β} '-Gelpphase wichtig ist. Fortwährende Erhöhung des C₁₁Ime-Anteils in der Membran führt zu einer Verbreiterung des Hauptphasenübergangspeaks, was auf die Ausbildung von Phasenkoexistenzgebieten bei höheren Imidazoliumsalzkonzentrationen in der Membran hindeutet.

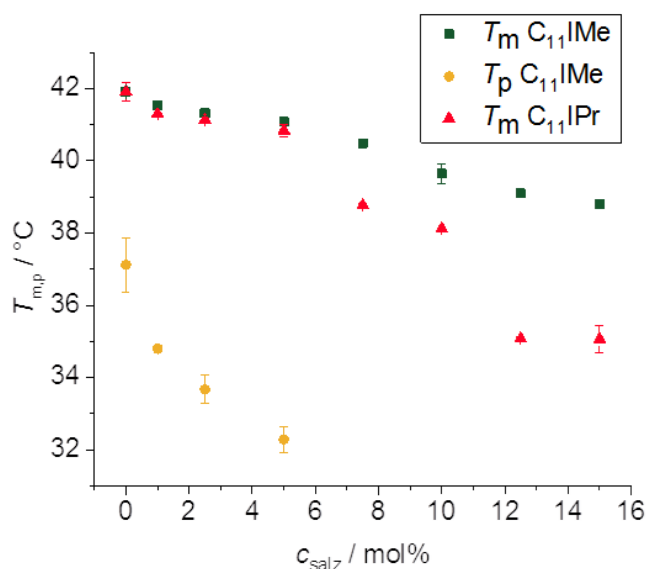


Abb. 6-3: DSC-Daten der Abnahme der T_m von DPPC durch C_{11}IME und C_{11}IPr ³

Abnahme der Hauptphasenübergangstemperatur, T_m , und der Vorphasenübergangstemperatur, T_p , der DPPC-Membran in Gegenwart und Abwesenheit des C_{11}IME und des C_{11}IPr verschiedener Konzentration. Die Vorphasenübergänge werden bei Anwesenheit von C_{11}IME ab 5 mol% unterdrückt, während die Vorphasenübergänge bei Anwesenheit von C_{11}IPr in jedem Mischungsverhältnis unterdrückt werden.

Der Einbau des C_{11}IPr in die Membran zeigt deutlich ausgeprägtere Effekte auf das Phasenverhalten der Lipidmembran. Bereits ein Anteil von 1 mol% des Moleküls in der Membran führt zu einem Ausbleiben des Vorphasenübergangs und zu einer Verbreiterung des Hauptphasenübergangspeaks, wie in Abb. 6-4 B) verdeutlicht wird. Eine detailliertere Ansicht der verbreiteten Peaks wird in Abb. 6-4 C) gezeigt, welche das Auftreten zweier definierter, separater Peaks bei hohen Anteilen des Moleküls in der Membran oberhalb von 12,5 mol% C_{11}IPr zeigt. Sehr hohe molare Anteile des Moleküls in der Membran von 25 mol% oder gar 50 mol% zeigen eine deutliche Ausprägung dieser beiden Peaks, was auf eine Separation der C_{11}IPr -Moleküle von den DPPC-Molekülen innerhalb der Membran in definierte Domänen, oder die Ausbildung mizellarer Strukturen des Moleküls hinweist (Abb. 6-4 D).

³ Ergebnisse auf Basis der Messungen von S. Kriegler im Rahmen der Bachelorarbeit.

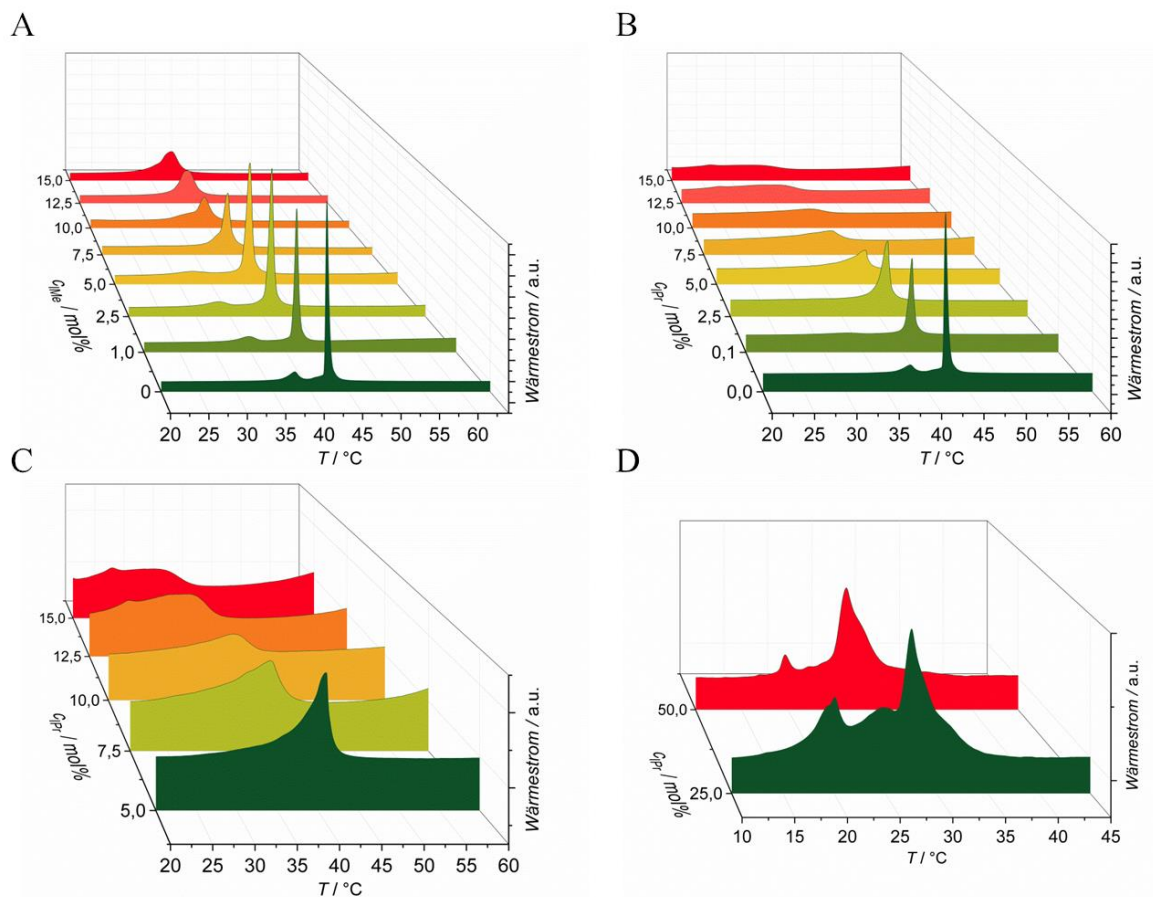


Abb. 6-4: DSC Thermogramme DPPC:C₁₁Ime, DPPC:C₁₁IPr⁴

DSC-Thermogramme der reinen DPPC-Membranen in Abwesenheit sowie in Anwesenheit von A) C₁₁Ime und B), C), D) C₁₁IPr verschiedener molarer Anteile in der Membran. A) zeigt das Verschwinden des Vorphasenübergangspeaks über 5 mol% C₁₁Ime und die Verbreiterung des Hauptphasenübergangspeaks bei höheren C₁₁Ime-Anteilen, was auf die Ausbildung von Phasenkoexistenzgebieten in der Membran hindeutet. B) zeigt das Verschwinden des Vorphasenübergangspeaks unter Einbau des C₁₁IPr bereits bei 1 mol% des Moleküls in der Membran. Weitere Erhöhung der C₁₁IPr-Konzentration führt zu deutlicher Peakverbreiterung, welche detaillierter in C) dargestellt ist. Anteile von 25 mol% sowie 50 mol% C₁₁IPr in der Membran führen zur Ausbildung zweier separater Peaks, was auf die Bildung definierter C₁₁IPr-Domänen oder mizellerer Strukturen des Moleküls hinweist und in D) dargestellt wird.

Um ausführliche Informationen über die laterale Membranorganisation, unter diesen Bedingungen wie auch über das Potential des C₁₁IPr, eigenständige, mesoskopische Strukturen auszubilden, zu erhalten, wurden weitere Experimente an reinen C₁₁IPr Lösungen durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten, dass C₁₁IPr selbst nicht dazu in der Lage ist, eigenständige mesoskopische Strukturen auszubilden, welche temperaturabhängige Phasenübergänge vollziehen. Hieraus wird deutlich, dass die separat auftretenden DSC-Peaks

⁴ Ergebnisse auf Basis der Messungen von S. Kriegler im Rahmen der Bachelorarbeit.

bei molaren Anteilen von 25 mol% und 50 mol% in der Membran nicht durch reine C₁₁IPr-Doppelschichten oder mizellare Strukturen, sondern wahrscheinlicher durch abgetrennte, gemischte Domänen in der Membran oder DPPC-stabilisierte, gemischte mizellare Strukturen auftreten.

Hohe Konzentrationen des C₁₁IME in DPPC wurden bereits zuvor untersucht. Die DSC-Daten hierzu zeigen ein vollständiges Verschwinden des Phasenübergangs oberhalb eines Anteils von 60 mol% C₁₁IME in der Membran. ^[146]

6.3.3 Fluoreszenzspektroskopie

Teile der Untersuchungen unter Anleitung und Aufsicht von S. Kriegler im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt.

Tiefere Einblicke in die Änderungen im Ordnungsparameter der Lipide gewährten fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen unter der Verwendung des Fluorophors Laurdan. Es wurde der Einfluss beider lipidartiger Imidazoliumsalzderivate sowie des Transfektionsmoleküls in reinen DPPC-Membranen, in Drei-Komponenten-Membranen bestehend aus DPPC:DOPC:Chol. oder DPPC:DOPE:Chol. sowie in anionischen Fünf-Komponenten-*raft*-Systemen untersucht. Die Fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen umfassten zusätzlich zu den Untersuchungen der Effekte des C₁₁IME und des C₁₁IPr auch die Untersuchung des TM auf die laterale Ordnung der Membranen. In jeder Messung wurden die *GP*-Werte über die gemittelten Intensitätswerte bei Wellenlängen von 440 nm und 490 nm bestimmt und gegen die Temperatur aufgetragen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abb. 6-5 dargestellt.

Die *GP*-Kurve in Abb. 6-5 A) zeigt den annähernd sigmoidalen, charakteristischen Verlauf der *GP*-Werte eines scharfen Phasenüberganges. Die Daten der reinen DPPC-Membran weisen einen nahezu konstanten Verlauf der *GP*-Werte bis hin zur Hauptphasenübergangstemperatur der Membran bei 41,9 °C auf, bei dem der Übergang von der Gel-Phase zur fluiden L_α-Phase stattfindet. Die Alkylketten der Lipide in der fluiden L_α-Phase weisen eine hohe Konformationsunordnung auf, die durch die hohe Anzahl an *gauche*-Konformeren in den Ketten zustande kommt.

In dieser fluiden Phase kann das Lösungsmittel aus der Umgebung leicht in obere Bereiche der Lipiddoppelschicht eindringen und am dort verorteten Laurdan zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von 490 nm und der damit einhergehenden Verringerung des *GP*-Wertes bis hin zu negativen Werten führen (für Details siehe Abschnitt 3.3.2). Die so ermittelte Hauptphasenübergangstemperatur, T_m , steht in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Werten. ^[4] Unterhalb der Übergangstemperatur, T_m , liegt die Membran in der Gel-Phase vor, in welcher überwiegend eine *all-trans*-Konformation in den Alkylketten vorliegt. Dies führt zu einer deutlich verringerten lateralen Diffusion sowie Rotationsdiffusion der Lipide in der dicht gepackten Membran, wodurch die Umgebung des im Bereich der Kopfgruppen eingebauten Laurdans eine geringere Polarität aufweist. Dies führt zu einem Emissionsmaximum des Fluorophors bei etwa 440 nm. Verringerung der Polarität der Umgebung durch Übergang in die Gel-Phase führt somit zu einer Erhöhung des *GP*-Wertes auf Werte um 0,5 in dicht gepackten, kristallinen Gel-Phasen.

Wie in Abb. 6-5 A), C) und E) gezeigt, führt der Einbau von $C_{11}IMe$ sowie $C_{11}IPr$ zu vergleichbaren Effekten auf den Ordnungsparameter in allen untersuchten Membransystemen. In der Gel-Phase zeigt sich eine Absenkung der *GP*-Werte als Reaktion auf den Einbau der lipidartigen Imidazoliumsalze als Funktion steigender Konzentration dieser, wobei zusätzlich eine Verbreiterung des Hauptphasenübergangs auftritt. Hierbei zeigt das $C_{11}IMe$ in der Gel-Phase einen deutlicheren Einfluss als das $C_{11}IPr$, wobei das $C_{11}IPr$ einen ausgeprägteren Effekt auf die *GP*-Werte und der damit verbundenen Lipidordnung bei Temperaturen oberhalb der Hauptphasenübergangstemperatur aller untersuchter Lipidsysteme zeigt. Dies zeigt eine deutliche Erhöhung der Gesamtlipidordnung in der fluiden Phase nach Einbau des sterisch anspruchsvollen Imidazoliumsalzes gegenüber den reinen Lipidsystemen

Ergebnisse und Diskussion

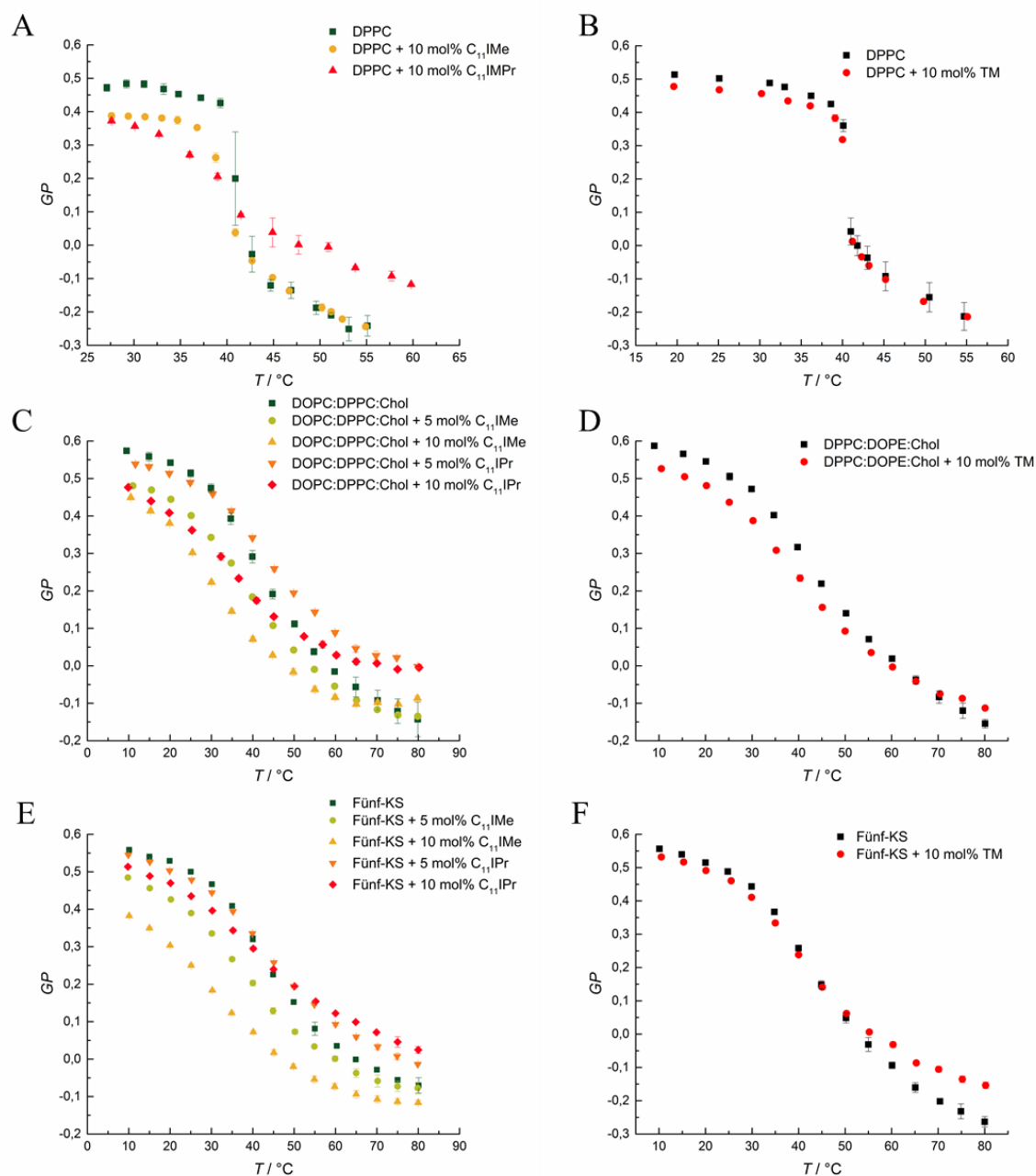


Abb. 6-5: Fluoreszenzspektroskopie der Imidazoliumsalze und des TM in den Membranen⁵

Repräsentative Ergebnisse der Laurdan *GP*-Werte für A) DPPC mit 10 mol% $C_{11}Ime$ und 10 mol% $C_{11}IPr$, B) DPPC mit 10 mol% TM, C) DPPC:DOPC:Chol. mit 5 mol% und 10 mol% $C_{11}Ime$ und $C_{11}IPr$, D) DPPC:DOPE:Chol. mit 10 mol% TM, E) DPPC:DPPG:DOPC:DOPG:Chol. mit 5 mol% und 10 mol% $C_{11}Ime$ und $C_{11}IPr$ und F) DPPC:DPPG:DOPC:DOPG:Chol. mit 10 mol% TM als Funktion der Temperatur.

Im Gegenzug dazu zeigt das $C_{11}Ime$ weder einen ausgeprägten Einfluss auf die *GP*-Werte bei hohen Temperaturen, noch eine Konzentrationsabhängigkeit in der fluiden Phase. Der

⁵ Messung in A durchgeführt von S. Kriegler im Rahmen der Bachelorarbeit.

Effekt der beiden Imidazoliumsalze auf die Hauptphasenübergangstemperatur der reinen DPPC-Membran ist in Tab. 6-3 zusammengefasst. Beide Imidazoliumsalze senken die Übergangstemperatur T_m , während der Effekt beim $C_{11}IPr$ ausgeprägter erfolgt. Die Resultate stehen in guter Übereinstimmung mit den zuvor gezeigten FT-IR- und DSC-Resultaten.

Tab. 6-3: T_m der DPPC Membran mit und ohne $C_{11}IME/C_{11}IPr$ durch Fluoreszenzspektroskopie ⁶

Probe	$T_m / ^\circ C$
DPPC	$41,89 \pm 0,02$
DPPC + 10 mol% $C_{11}IME$	$40,78 \pm 0,01$
DPPC + 10 mol% $C_{11}IPr$	$38,38 \pm 0,01$

Konträr zu dem $C_{11}IME$ und dem $C_{11}IPr$ zeigt das Transfektionsmolekül keinerlei signifikante Effekte auf die Konformationsordnung und das Phasenverhalten der Lipidmembranen, wie in Abb. 6-5 B), D) und F) zu sehen ist. In der Gel-Phase lässt sich eine geringfügig verringerte Ordnung der Membranen nach Einbau des TM nachweisen, was auf geringfügige Änderungen in der Packungsdichte der Membran zurückzuführen ist. Die Hauptphasenübergangstemperatur der reinen DPPC-Membran wird durch die Addition des TM nur marginal beeinflusst. Es zeigt sich eine Änderung in T_m von $40,9^\circ C$ in reinem DPPC zu $41,2^\circ C$ im DPPC:TM-System. In der fluiden Phase zeigt die anionische Fünf-Komponenten-Membran einen geringfügigen Anstieg des Ordnungsparameters der mit dem TM bestückten gegenüber der reinen Membran. Dies zeigt, dass sich das TM besser und mit weniger Störungen in die Membranen einbauen lässt als die zuvor untersuchten lipidartigen Imidazoliumsalzderivate.

⁶ Ergebnisse auf Basis der Messungen von S. Kriegler im Rahmen der Bachelorarbeit.

6.3.4 Zeta-Potential Messungen durch DLS

Die Messungen der Zeta-Potentiale wurden unter Anleitung und Aufsicht von S. Kriegler und D. Brandis im Rahmen ihrer Bachelorarbeiten durchgeführt.

Um Einflüsse der eingebauten Imidazoliumsalzderivate auf die Oberflächenladungsdichte der Lipidmembranen zu untersuchen, wurden Messungen des Zeta-Potentials, ζ , durchgeführt. Dieses beschreibt das elektrische Potential an der hydrodynamischen Scherschicht der Lipidvesikel inklusive der anhaftenden Hydrathülle gegenüber eines entfernten Punktes im umgebenden Medium, welches in hohem Maße von der Einbaueffizienz des Imidazoliumsalzes in die Lipiddoppelschichten abhängt. Da die reinen in dieser Studie untersuchten Membranen neutraler oder anionische Natur sind, ist zu erwarten, dass der Einbau der kationischen Imidazoliumsalzderivate $C_{11}IME$ und $C_{11}IPr$ zu einer Erhöhung des Zeta-Potentials bis hin zu einer Vorzeichenumkehr dessen führt, wie es bei Adsorption und Adsorption von Kationen an die Lipid-Grenzfläche bereits beobachtet wurde. [114,156] Untersucht wurden in dieser Studie die Einflüsse der lipidähnlichen Imidazoliumsalze $C_{11}IME$ und $C_{11}IPr$ unter Einbau in reine DPPC Vesikel sowie in die anionische Fünf-Komponenten-*raft*-Membran.

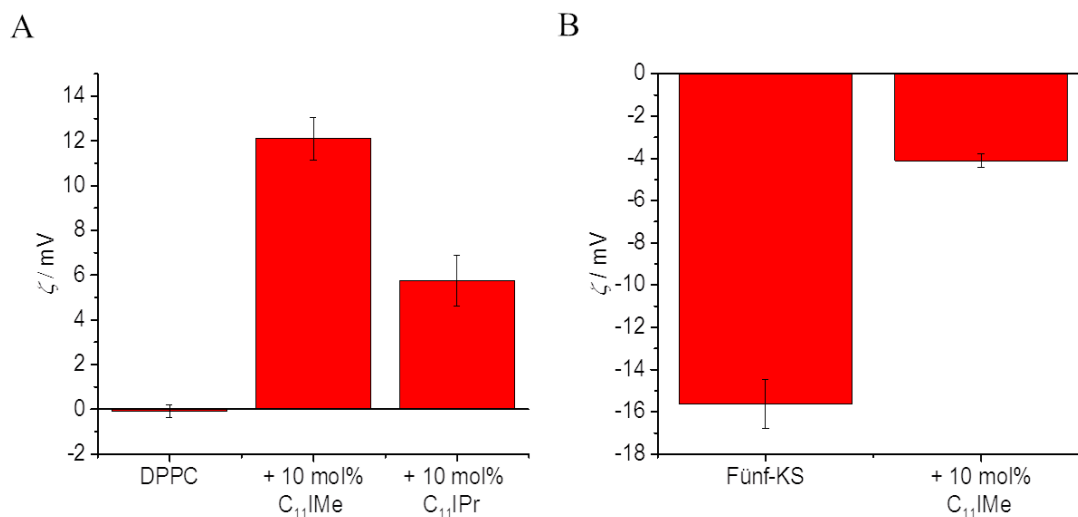


Abb. 6-6: Zeta-Potentiale von $C_{11}IME$ & $C_{11}IPr$ in DPPC und *raft*-Membran ⁷

Zeta-Potentiale der A) reinen, neutralen DPPC-Membran und B) anionischen, Fünf-Komponenten-*raft*-Membran in Abwesenheit und Anwesenheit von 10 mol% $C_{11}IME$ und 10 mol% $C_{11}IPr$. Der Einbau der Imidazoliumsalze führt zu einem signifikanten Anstieg des Zeta-Potentials, welcher beim $C_{11}IME$ stärker ausgeprägt ist. Dies deutet auf eine höhere Einbaueffizienz und/oder homogenere Verteilung des Moleküls gegenüber dem $C_{11}IPr$ hin.

⁷ Messungen in A durchgeführt von S. Kriegler sowie in B von D. Brandis im Rahmen der Bachelorarbeit.

In Abb. 6-6 A) und Abb. 6-6 B) sind die Ergebnisse der Messungen der neutralen DPPC-Membran sowie der anionischen Fünf-Komponenten-*raft*-Membran dargestellt. Einbau von 10 mol% C₁₁IMe in die DPPC-Membran resultiert in einem signifikanten Anstieg des Zeta-Potentials von etwa 0 mV im natürlichen Zustand der Membran auf etwa +12 mV in Anwesenheit des C₁₁IMe. Dieser deutliche Anstieg belegt einen effizienten Einbau des Moleküls in die DPPC-Doppelschicht. Einbau von 10 mol% C₁₁IPr in reine DPPC-Vesikel resultiert ebenfalls in einem signifikanten Anstieg des Zeta-Potentials, wobei die Ausprägung des Anstiegs auf ein Potential von +6 mV, verglichen mit dem C₁₁IMe, deutlich geringer ausfällt. Auch hier belegt der Anstieg des Potentials den Einbau des Moleküls in die Membran. Die deutlich geringere Ausprägung bei gleichem molarem Anteil wie im Falle des C₁₁IMe deutet jedoch entweder auf eine geringere Einbaueffizienz des Moleküls oder, wahrscheinlicher, einer starken Abschirmung der positiven Ladung der Molekülkopfgruppe durch die sterisch anspruchsvollen Kopfgruppensubstituenten des C₁₁IPr (siehe Abb. 6-1) hin.

Das Zeta-Potential der anionischen Fünf-Komponenten-*raft*-Membran wurde im natürlichen Zustand mit -16 mV bestimmt. Einbau von 10 mol% C₁₁IMe in diese Membran führt zu einer Erhöhung des Potentials um etwa 12 mV auf -4 mV, womit die Potentialdifferenz nach Einbau der 10 mol% C₁₁IMe in Übereinstimmung mit der von diesem Molekül erzeugten Potentialdifferenz in der zuvor untersuchten, reinen DPPC-Membran liegt. Ein Anteil von 10 mol% C₁₁IPr in der anionischen *raft*-Membran resultiert jedoch in spontaner Aggregation der Probe im Anschluss an die Extrusion der Vesikel, was die Messungen dieser Mischung mit der dynamischen Lichtstreuung verhindert. Unter der Annahme einer im Vergleich mit der neutralen Membran äquivalenten Potentialdifferenz von etwa +6 mV durch das C₁₁IPr, wäre in diesem Fall ein resultierendes Zeta-Potential von etwa -10 mV zu erwarten. Da höhere Zeta-Potentiale um Werte von $|\zeta| > 20$ mV für eine effektive elektrostatische Stabilisierung von Vesikeln gegenüber Aggregation vonnöten sind, sind Vesikel mit Zeta-Potentialen unterhalb dieses Wertes nahe 0 mV als Resultat fehlender elektrostatischer Abstoßung anfälliger für spontane Aggregation, was hier gegebenenfalls zu beobachten ist. ^[114]

Um detailliertere Einblicke in den Einbau des C₁₁IPr in die anionische *raft*-Membran zu erhalten, wurden fluoreszenzmikroskopische sowie rasterkraftmikroskopische Untersu-

chungen dieser Membranen durchgeführt, deren Ergebnisse im späteren Verlauf dieser Arbeit beschrieben werden.

6.3.5 Kritische Mizellbildungskonzentration $C_{11}IPr$

Die Bestimmung der Oberflächenaktivität des $C_{11}IPr$ erfolgte über die Messung der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC, von engl. critical micelle concentration) der Substanz im Lösungsmittel Wasser über eine Filmwaagenmessung. Abb. 6-7 zeigt die resultierende Auftragung der Oberflächenspannung in Abhängigkeit der Konzentration des Imidazoliumsalzes. Die CMC des $C_{11}IPr$ konnte anhand dieser Messung nach Auswertung äquivalent zu den Referenzen ^[143,144] mit $0,7 \pm 0,08 \mu\text{M}$ bestimmt werden, was in guter Übereinstimmung mit den bereits bekannten CMC-Werten strukturell ähnlicher Imidazoliumsalze, wie dem $C_{11}IMe$ sowie dem in Abb. 10-5 dargestellten $C_{11}IBn \cdot HBr$ (1,3-dibenzyl-4,5-di-undecylimidazoliumbromid) steht (siehe Tab. 6-4).

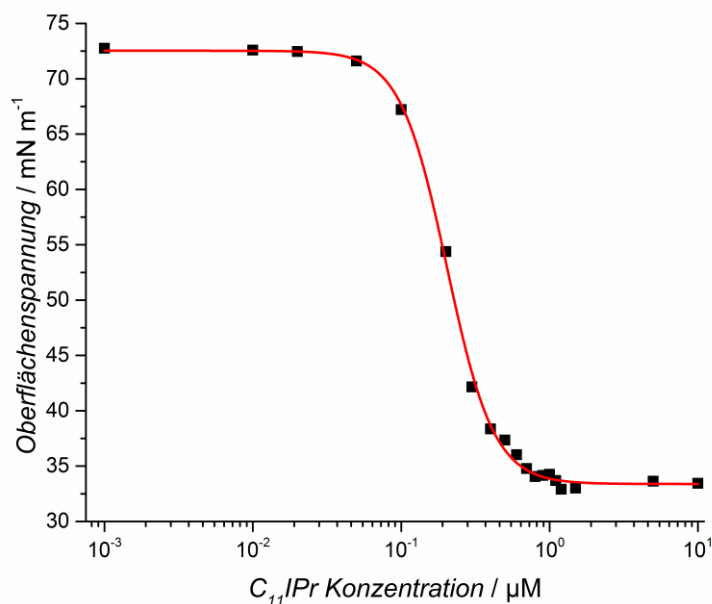


Abb. 6-7: CMC-Bestimmung von $C_{11}IPr$

Oberflächenspannung des Lösungsmittels Wasser in Abhängigkeit der Konzentration des $C_{11}IPr$.

Die CMC des C₁₁IPr stellt sich gegenüber der des C₁₁IBn aufgrund der zusätzlichen Isopropylreste in der Kopfgruppe als geringfügig niedriger dar.

Tab. 6-4: CMC-Werte des C₁₁IPr im Vergleich zu den bekannten CMC-Werten strukturell ähnlicher Imidazoliumsalze

Imidazoliumsalz	CMC / μM
C ₁₁ IMe·HI	8,5 (5 – 10) ^[143,144]
C ₁₁ IBn·HBr	2,3 (2,0 – 5,0) ^[144]
C ₁₁ IPr·HBr	0,7 \pm 0,08

6.3.6 Fluoreszenzmikroskopie an C₁₁IME & C₁₁IPr in Membranen

Teile der Untersuchungen wurden unter Anleitung und Aufsicht von D. Brandis im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.

Um detailliertere Informationen über den Effekt des C₁₁IME und des C₁₁IPr auf die mikroskopische Struktur und das Phasenverhalten von Lipidvesikeln zu erhalten, wurden ergänzend Untersuchungen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden riesige unilamellare Vesikel bestehend aus reinem DPPC, aus der neutralen Drei-Komponenten-Mischung, sowie aus der anionischen Fünf-Komponenten-*raft*-Mischung hergestellt. Die Membranen wurden durch den Fluorophor *N*-Rh-DHPE markiert, welcher sich bevorzugt in der flüssig-ungeordneten l_d-Phase der Membran einbaut und somit innerhalb der l_o-l_d-Phasenkoexistenz die fluiden Domänen markiert. Der Einfluss des C₁₁IME auf reine DPPC-Vesikel wurde bereits zuvor untersucht und beschrieben, wobei sich zeigte, dass dieses Molekül zu fluidisierten und ungeordneten DPPC-Liposomen führte. ^[146]

Abb. 6-8 zeigt die ausgeprägten topologischen Änderungen durch den Einbau des C₁₁IPr verschiedener molarer Anteile in die DPPC-Membran. Riesige unilamellare DPPC-Vesikel zeigen in Abwesenheit des Moleküls in Abb. 6-8 A) eine sphärische Struktur. Ein Verhältnis von 9:1 DPPC:C₁₁IPr führt bereits zu sichtbaren Einschlüssen und Ausstülpungen an den Vesikeln, wie in Abb. 6-8 B) zu sehen ist. Ein Verhältnis von DPPC:C₁₁IPr von 1:1 resultiert in vielen schlaffen, oval geformten Vesikeln großen Durchmessers neben einigen kleinen Vesikeln oder davon abgetrennten, potentiell mizellaren Strukturen (Abb. 6-8 C).

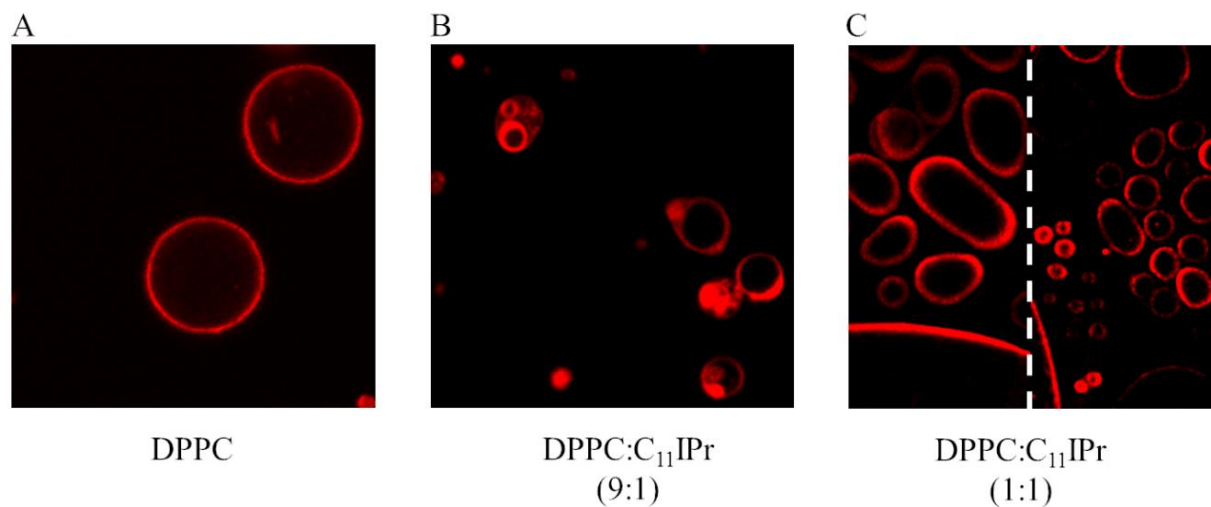


Abb. 6-8: Fluoreszenzmikroskopie: C₁₁IPr in DPPC-Membranen

Repräsentative konfokale Fluoreszenzmikroskopie Querschnittsaufnahmen der reinen DPPC-Vesikel in Abwesenheit sowie unter Einfluss verschiedener molarer Anteile an C₁₁IPr in der Membran. Rote Fluoreszenz entsteht durch den Fluorophor *N*-Rh-DHPE.

Der Effekt beider Imidazoliumsalze auf die neutrale Drei-Komponenten-Membran, in Reinform bestehend aus 2:1:1 DPPC:DOPC:Chol., ist in Abb. 6-10 bei Raumtemperatur repräsentativ dargestellt. Teilabbildung A) zeigt eine repräsentative Querschnittsaufnahme der reinen Drei-Komponenten-Vesikel mit ausgeprägter l_o-l_d-Phasenkoexistenz. Die rote Fluoreszenz markiert die fluide, ungeordnete l_d-Phase, der Maßstabsbalken repräsentiert 10 µm. Teilabbildung B) zeigt eine Querschnittsaufnahme einer 9:5:5:1 DPPC:DOPC:Chol.:C₁₁IME Membran, welche kleine sowie große Vesikel sphärischer Form nebeneinander ausbildet. Eine Separation der in l_d- und l_o-Phasen zeigt sich lediglich bei einer Temperatur von unter 5 °C, während das Drei-Komponenten-System in Abwesenheit des C₁₁IME selbst bei Temperaturen von 50-60 °C *raft*-Domänen ausbildet (siehe Abb. 6-9). Dies belegt eine hochgradig fluidisierende Wirkung des C₁₁IME auf die Membranstruktur. Der 30 µm repräsentierende Maßstabsbalken belegt hier ein signifikantes Wachstum der Vesikel durch Einbau des Imidazoliumsalzes.

In Teilabbildung C) ist eine Querschnittsaufnahme einer 8:5:5:2 DPPC:DOPC:Chol.:C₁₁IME-Mischung zu sehen, in welcher auch bei niedrigen Temperaturen, wie in Abb. 6-11 gezeigt, keine Phasenseparation und kein thermischer Phasen-

übergang mehr zu beobachten ist. Die Vesikel variieren in ihrer Größe von kleinen bis hin zu sehr großen, verzerrt ovalen Vesikeln. Der Maßstabsbalken repräsentiert auch hier 30 μm .

DPPC:DOPC:Chol
(2:1:1)

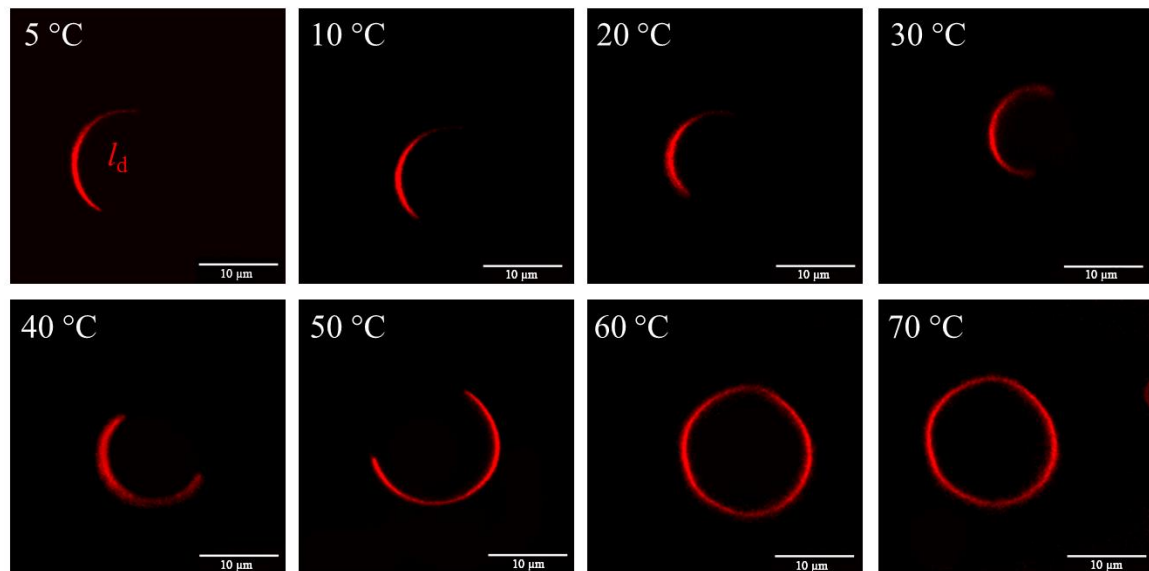


Abb. 6-9: Thermotropes Phasenverhalten des neutralen Drei-Komponenten-Systems

Thermotropes Phasenseparationsverhalten des neutralen Drei-Komponenten-Systems. Die rote Fluoreszenz markiert die fluide Phase der Membran. Der Hauptphasenübergang tritt hier in einem Temperaturbereich zwischen 50 °C und 60 °C auf. Bei 60 °C liegt das System vollständig in der fluiden Phase vor.

Abb. 6-10 D) zeigt die Effekte des Einbaus des C_{11}IPr in die Drei-Komponenten-Membran in einem molaren Verhältnis von 9:5:5:1 DPPC:DOPC:Chol.: C_{11}IPr . In dieser Mischung ist eine Phasenseparation bei einer Temperatur von 60 °C noch teilweise erkennbar, während die Vesikelgröße von kleinen bis hin zu sehr großen Vesikeln variiert (siehe Abb. 6-12). Der Maßstabsbalken repräsentiert hier 30 μm . Zusätzlich ist zu erkennen, dass der Einbau des C_{11}IPr -Salzes zudem in erhöhter Aggregation zwischen verschiedenen Vesikeln führt. Eine Erhöhung des Anteils des Imidazoliumsalzes auf 8:5:5:2 DPPC:DOPC:Chol.: C_{11}IPr führt zu sehr großen, stark deformierten Vesikeln, welche neben sehr kleinen, sphärischen Strukturen sowie abgetrennten, möglicherweise mizellaren, Strukturen bestehen. Ein Phasenübergang dieser Mischung ist unter der Ausbildung sepa-

rierter Phasen, wie in Abb. 6-12 zu sehen, bei einer Temperatur von etwa 25 °C nachweisbar.

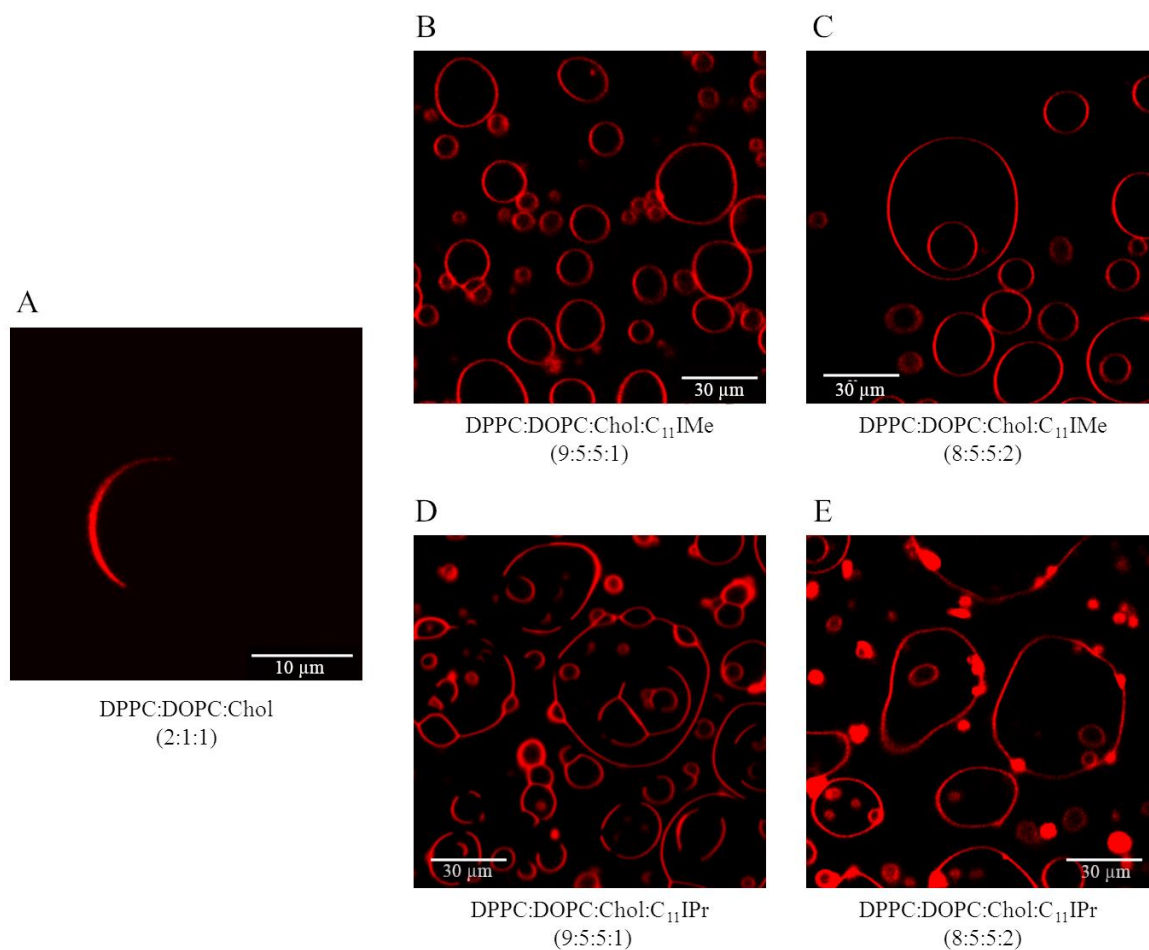


Abb. 6-10: Fluoreszenzmikroskopie: C₁₁IMe & C₁₁IPr im neutralen Drei-Komponenten-System

Repräsentative konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Querschnittsaufnahmen des Einflusses von C₁₁IMe und C₁₁IPr auf die Struktur der neutralen Drei-Komponenten-Membran, in reiner Form bestehend aus 2:1:1 DPPC:DOPC:Cholesterin.

Abb. 6-13 zeigt den Einfluss der beiden Imidazoliumsalze auf die Morphologie der anionischen Fünf-Komponenten-*raft*-Mischung, bestehend aus 45:5:20:5:25 DPPC:DOPC:DPPG:DOPG:Chol. unter Zugabe verschiedener molarer Anteile an C₁₁IMe sowie C₁₁IPr.

In Abb. 6-13 A) sind repräsentative Querschnittsaufnahmen von riesigen unilamellaren Vesikeln dieser Komposition bei Raumtemperatur gezeigt, welche eine deutliche Separation in l_d- und l_o-Phasen aufweisen. Der Maßstabsbalken repräsentiert hier 20 µm. Einbau

des C₁₁Ime zu einer Zusammensetzung von 44:5:20:5:25:1 DPPC:DPPG:DOPC:DOPG:Chol.:C₁₁Ime zeigt keine signifikanten Änderungen gegenüber dem reinen Membransystem, wie in Teilabbildung B) zu sehen ist. Der Maßstabsbalken repräsentiert hier 20 µm.

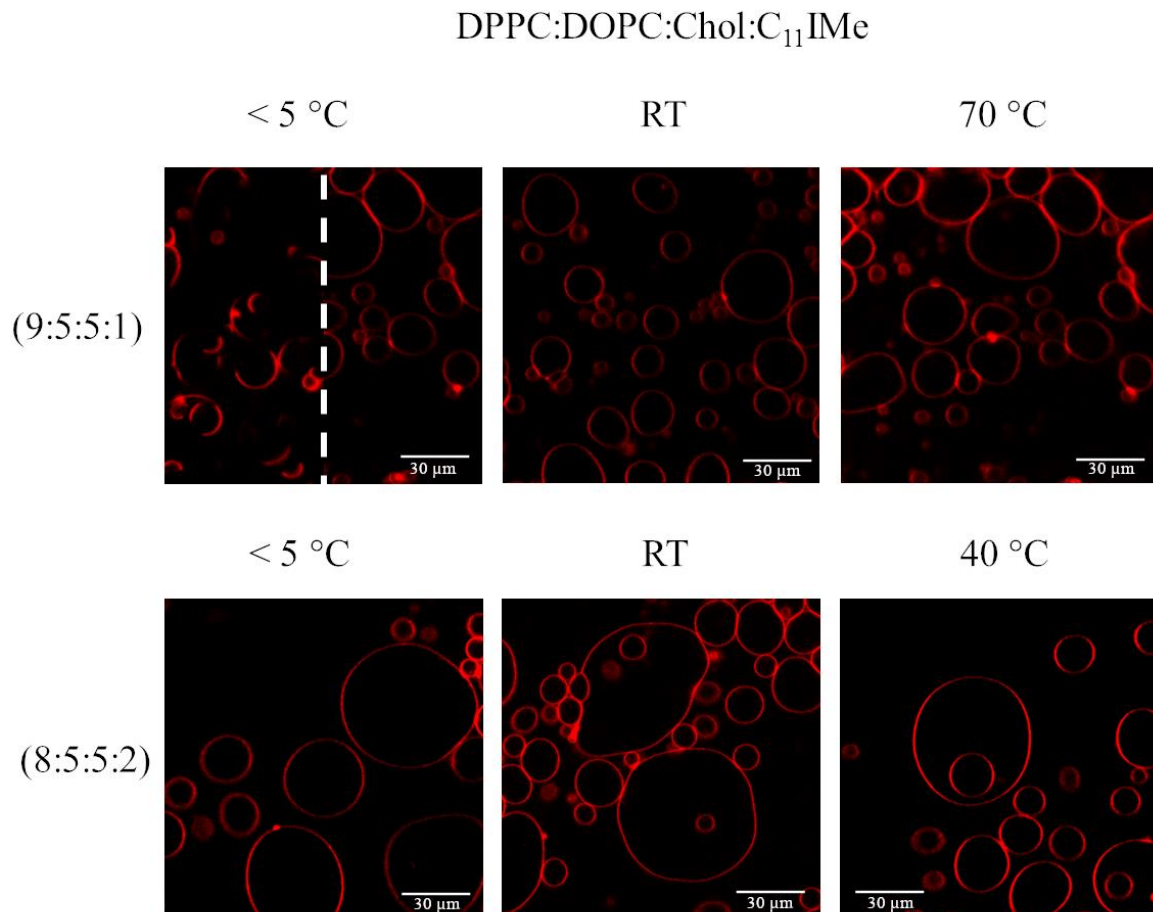


Abb. 6-11: Temperaturabhängigkeit: Neutrales Drei-Komponenten-System mit C₁₁Ime

Repräsentative konfokale Fluoreszenzmikroskopie Querschnittsaufnahmen des Einflusses von C₁₁Ime und auf das thermotrope Phasenseparationsverhalten der neutralen Drei-Komponenten-Membran bei verschiedenen molaren Anteilen des C₁₁Ime. Die Maßstabsbalken repräsentieren jeweils 30 µm.

Teilabbildung C) zeigt, dass die Erhöhung des molaren Anteils des C₁₁Ime auf 40:5:20:5:25:5 DPPC:DPPG:DOPC:DOPG:Chol.:C₁₁Ime bereits zu einem erhöhten Vesikeldurchmesser führt. Zudem weist diese Mischung, wie in Abb. 6-14 gezeigt, eine im Vergleich zum reinen System deutlich verschobene Phasenseparationstemperatur von ursprünglich etwa 75 °C im reinen System auf unter 7 °C unter Einfluss des Imidazoliumsalzes auf. Somit zeigt sich der stark fluidisierende Effekt des Moleküls bei einem

Anteil von 5 mol% in der Membran äquivalent zum neutralen System auch im anionischen Fünf-Komponenten-System. Der Maßstabsbalken repräsentiert hier 20 μm .

Abb. 6-13 D) zeigt die Effekte bei Erhöhung des C_{11}IME Anteils auf 35:5:20:5:25:10 DPPC:DPPG:DOPC:DOPG:Chol.: C_{11}IME . Hier zeigt sich, wie in Abb. 6-14 dargestellt, eine vollständige Unterdrückung der Phasenseparation bis unter Temperaturen von 5 $^{\circ}\text{C}$ sowie die Ausbildung kleiner, an der Membran angelagerter Partikel, welche sich möglicherweise als gemischte mizellare Strukturen darstellen. Der Maßstabsbalken repräsentiert hier 30 μm .

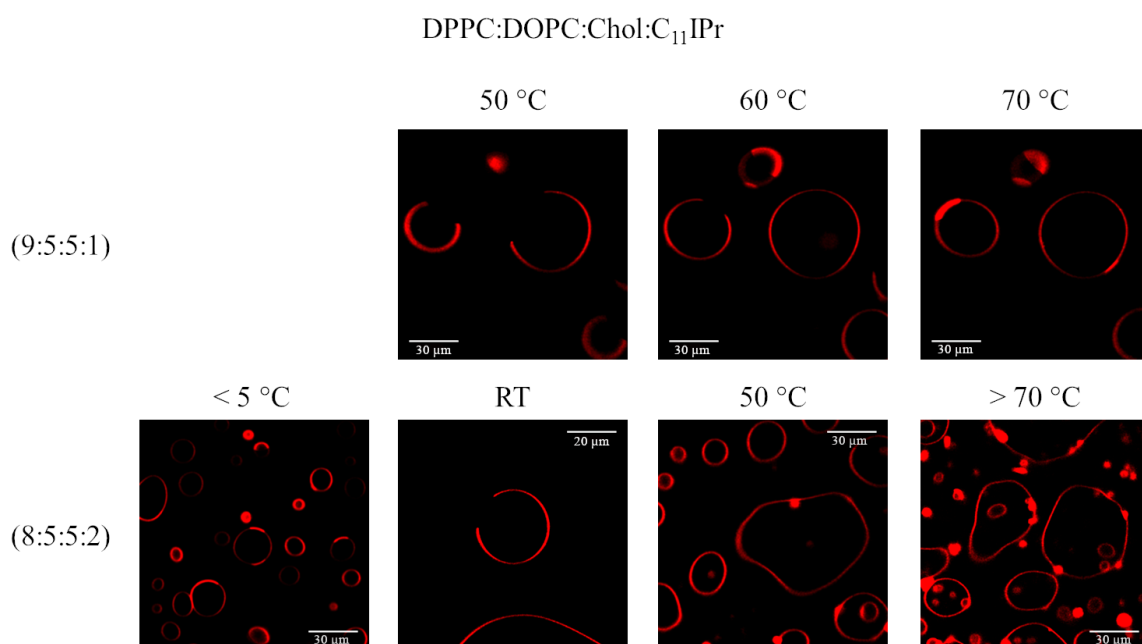


Abb. 6-12: Temperaturabhängigkeit: Neutrales Drei-Komponenten-System mit C_{11}IPr

Repräsentative konfokale Fluoreszenzmikroskopie Querschnittsaufnahmen des Einflusses von C_{11}IPr und auf das thermotrope Phasenseparationsverhalten der neutralen Drei-Komponenten-Membran bei verschiedenen molaren Anteilen des C_{11}IPr .

Der Einbau des C_{11}IPr Salzes in die anionische Fünf-Komponenten-Membran in einem Verhältnis von 44:5:20:5:25:1 DPPC:DPPG:DOPC:DOPG:Chol.: C_{11}IPr zeigt, äquivalent zur Untersuchung der Mischung mit von 1 mol% C_{11}IME in dieses Membransystem, keine signifikanten Änderungen gegenüber der Vesikel der reinen Membran, wie in Abb. 6-13 E) zu sehen ist. Der Maßstabsbalken repräsentiert hier 20 μm .

Abb. 6-13 F) hingegen zeigt für die im Anteil des C_{11}IPr auf 5 mol% erhöhte 40:5:20:5:25:5 DPPC:DPPG:DOPC:DOPG:Chol.: C_{11}IPr -Lipidmischung einen teilweise

deutlich erhöhten Vesikeldurchmesser und signifikante Verformungen in einigen Vesikeln hohen Durchmessers. Der Maßstabsbalken repräsentiert hier 30 μm . Zudem können kleine, abgetrennte Partikel beobachtet werden, welche an die Membranen angelagert sowie frei vorliegen. Die Phasenseparation ist vergleichbar mit der 5 mol% C_{11}IME -Mischung lediglich bei Temperaturen unter 7 $^{\circ}\text{C}$ zu beobachten, wie in Abb. 6-15 zu sehen ist.

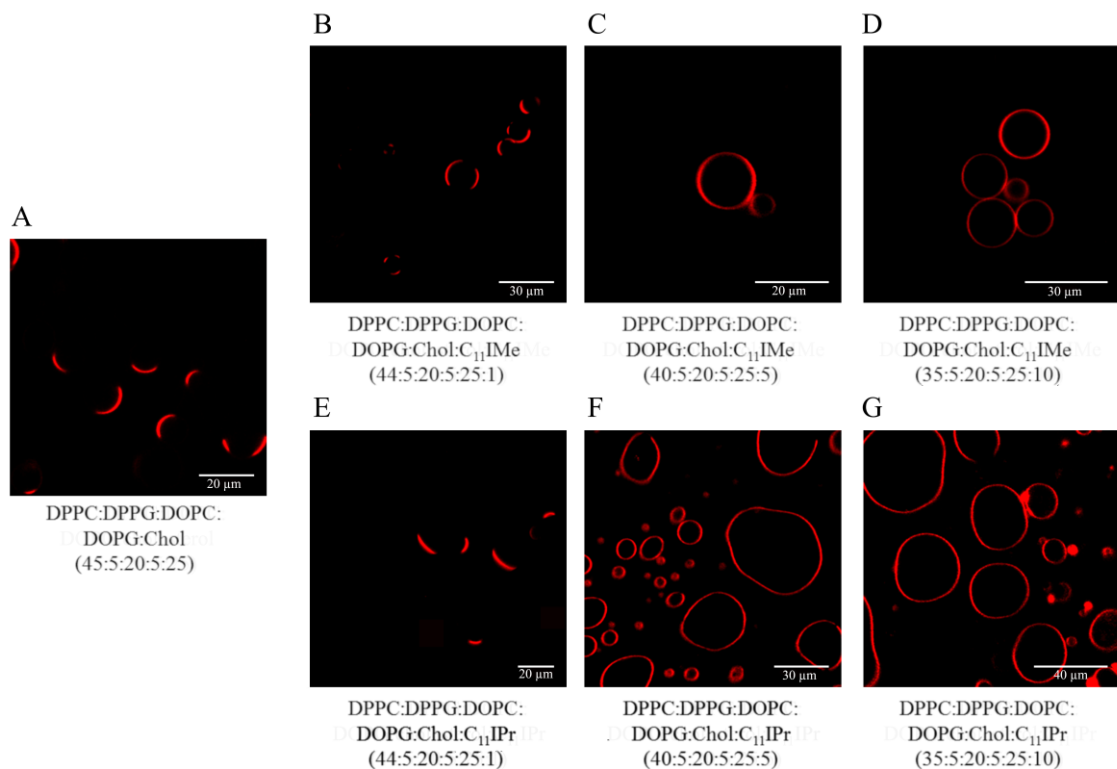


Abb. 6-13: Fluoreszenzmikroskopie: C_{11}IME & C_{11}IPr im anionischen Fünf-Komponenten-System⁸

Repräsentative konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Querschnittsaufnahmen des Einflusses von C_{11}IME und C_{11}IPr auf die Struktur der anionischen Fünf-Komponenten-*raft*-Membran, in reiner Form bestehend aus 45:5:20:5:25 DPPC:DPPG:DOPC:DOPG:Cholesterin.

Weitere Erhöhung des Anteils des Imidazoliumsalzes auf 10 mol% in einer 35:5:20:5:25:10 DPPC:DPPG:DOPC:DOPG:Chol.: C_{11}IPr -Mischung führt, wie in Teilabbildung G) gezeigt, zur Ausbildung sehr großer, deformierter unilamellarer Vesikel neben kleineren Strukturen, die möglicherweise gemischte Mizellstrukturen darstellen. Der Maßstabsbalken repräsentiert hier 40 μm , was den drastischen Anstieg des Durchmessers der gebildeten Vesikel gegenüber der reinen Membran in Teilabbildung A) belegt, in

⁸ Aufnahmen A-D im Rahmen der Bachelorarbeit erstellt von D. Brandis.

welchem der Maßstabsbalken lediglich 20 μm repräsentiert. Wie in Abb. 6-15 gezeigt, ist für diesen Fall keine signifikante Phasenseparation der Membran selbst bei Temperaturen unter 5 $^{\circ}\text{C}$ zu beobachten.

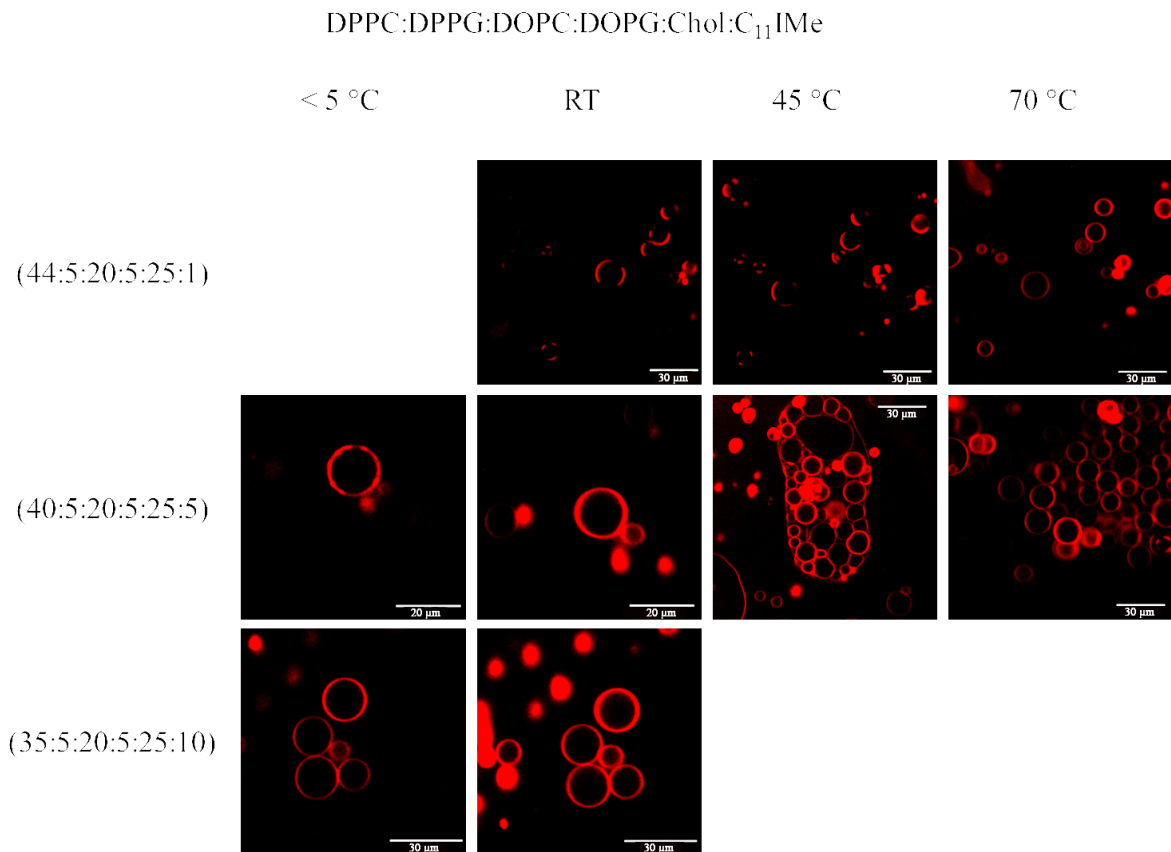


Abb. 6-14: Temperaturabhängigkeit des anionischen Fünf-Komponenten-Systems mit C₁₁IME⁹

Repräsentative konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Querschnittsaufnahmen des Einflusses von C₁₁IME und auf das thermotrope Phasenseparationsverhalten der anionischen Fünf-Komponenten-*raft*-Membran bei verschiedenen molaren Anteilen des C₁₁IME.

⁹ Aufnahmen bei 1 mol% und 10 mol% C₁₁IME im Rahmen der Bachelorarbeit erstellt von D. Brandis

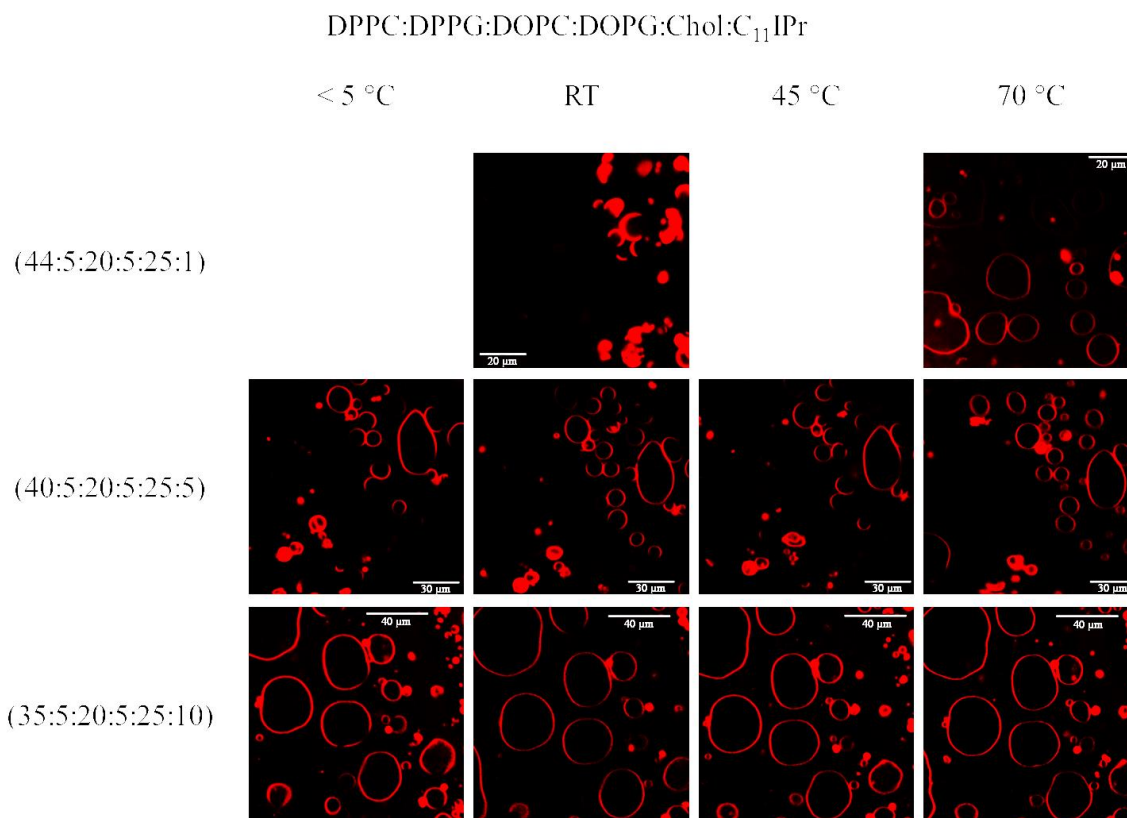


Abb. 6-15: Temperaturabhängigkeit des anionischen Fünf-Komponenten-System mit C₁₁IPr¹⁰

Repräsentative konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Querschnittsaufnahmen des Einflusses von C₁₁IPr und auf das thermotrope Phasenseparationsverhalten der anionischen Fünf-Komponenten-*raft*-Membran bei verschiedenen molaren Anteilen des C₁₁IPr.

6.3.7 Fluoreszenzmikroskopie Transfektionsmolekül (TM)

Auf Basis der vorangegangenen Ergebnisse wurde der Einfluss des Transfektionsmoleküls auf die strukturellen Eigenschaften der neutralen sowie der anionischen Lipidmembranen untersucht, um Informationen über dieses speziell entworfene Molekül bezüglich seines Fusions- und möglichen Transfektionspotentials zu erhalten. Präparation und Einbau in die entsprechenden Modellmembranen erfolgte äquivalent zur oben beschriebenen Präparation der Proben der Imidazoliumsalzderivate. Abb. 6-16 zeigt den Effekt des Transfektionsmoleküls auf die Vesikel der neutralen Drei-Komponenten-Membran mit steigender Temperatur. Eine Phasenseparation ist bis zu einer Temperatur von 50 °C zu beobachten, während das reine System in Abwesenheit des TM erst bei einer Temperatur von 75 °C in der gesamten Membran in die fluide Phase übergeht. Darüber hinaus lässt

¹⁰ Aufnahmen bei 5 mol% C₁₁IPr im Rahmen der Bachelorarbeit erstellt von D. Brandis

sich eine deutliche Aggregation der Vesikel beobachten, was auf eine Kopplung der Lipidgrenzflächen über das inserierte Transfektionsmolekül hindeutet.

Der Effekt des TM auf die anionische Fünf-Komponenten-*raft*-Membran zeigt sich jedoch in deutlich ausgeprägterer Form. Wie in Abb. 6-17 deutlich zu sehen ist, tendieren die anionischen Vesikel als Resultat des Einbaus des TM stark zur Aggregation. Phasenseparation ist nur noch bei Temperaturen unterhalb von 20 °C und ausschließlich an den Kontaktflächen der aggregierten Vesikel zu beobachten. Ein Temperaturanstieg auf 65 °C resultiert in einer allgemein fluiden Phase dieser Kontaktflächen.

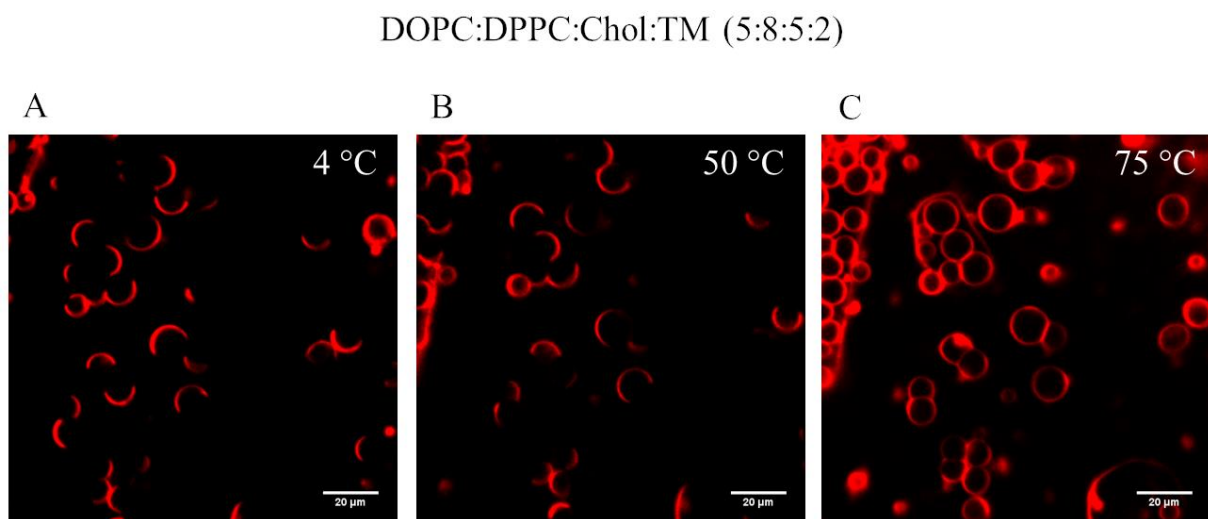


Abb. 6-16: Fluoreszenzmikroskopie: TM in Drei-Komponenten-Membran

Repräsentative konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Querschnittsaufnahmen des Einflusses des TM auf die Struktur der Drei-Komponenten-Vesikel als Funktion steigender Temperatur. Phasenkoexistenz kann bis zu einer Temperatur von 50 °C beobachtet werden, oberhalb derer die gesamte Membran in der fluiden Phase vorliegt. Die Maßstabsbalken repräsentieren 20 µm.

Ein Vergleich dieser Querschnittsaufnahmen mit den Ergebnissen der reinen Fünf-Komponenten-Vesikel (Abb. 6-13 A)) zeigt einen deutlich akkumulierenden Effekt des eingebauten Transfektionsmoleküls. Dies ist vermutlich auf die Anordnung der anionischen Lipide und des Transfektionsmoleküls an den Kontaktflächen zurückzuführen, dessen Struktur und Lipidanordnung in der schematischen Darstellung in Abb. 6-17 gezeigt wird.

Das Fusionspotential, und somit die Möglichkeit das TM gegebenenfalls zur Transfektion heranziehen zu können, wurde mittels eines fluoreszenzmikroskopiebasierten Fusionsassays untersucht. Hierzu wurde ein Zwei-Komponenten-System, bestehend aus 1:1 DPPC:DOPE, als Trägersystem für das Transfektionsmolekül erstellt, da DOPE als Hilfs-lipid nachweislich förderliche Einflüsse auf die Bildung kationischer Lipoplexe sowie deren Fusion mit anderen Vesikeln besitzt. ^[22,28,29,160] Diese Vesikel wurden mittels des Fluorophors NBD-DHPE markiert, was als grüne Fluoreszenz in den Mikroskopiebildern zu erkennen ist. Als Zielvesikel wurden zur Nachahmung einer natürlichen Membran Vesikel der heterogenen Fünf-Komponenten-Membran ausgewählt, welche mit dem Fluorophor *N*-Rh-DHPE resultierend in roter Fluoreszenz in den Mikroskopiebildern markiert wurde. Zur Präparation dieser Systeme wurden die oben beschriebenen Präparationstechniken der PVA-gestützten Vesikelformation sowie der Elektroformation genutzt. Um weitergehende Informationen über die Qualität und Störungsfreiheit in Bezug auf Porenbildung und Leckagen während der etwaigen Vesikelfusion zu erhalten, wurde dem Umgebungspuffer während oder nach der Präparation der immobilisierten Vesikel in der Elektroformation der Fluorophor Atto-647 hinzugefügt.

Die Ergebnisse dieses Assays sind in Abb. 6-18 gezeigt. Die Mikroskopieaufnahmen in Reihe A) zeigen die grün markierten 1:1 DPPC:DOPE-Vesikel in Abwesenheit des Transfektionsmoleküls, welche in diesem Experiment durch die Elektroformation immobilisiert sind. Die rot markierten Vesikel bestehen aus der anionischen Fünf-Komponenten-*raft*-Membran, welche auf PVA präpariert und im Anschluss an die Elektroformation zu den immobilisierten Vesikeln in den Umgebungspuffer zugegeben wurden. Hierbei konnten keinerlei Interaktionen der beiden Vesikelspezies beobachtet werden. Auch nach 3 h Inkubationszeit lassen sich keine Aggregationen oder ähnliche Vorgänge wie Fluorophor-Vermischungen nachweisen, die auf eine Fusion oder auf Lipidaustauschprozesse zwischen den beiden Lipidspezies hinweisen. Inversion der Präparation durch Herstellung der anionischen Membran durch Elektroformation und PVA gestützter Präparation des DPPC:DOPE-Systems liefert die gleichen Resultate.

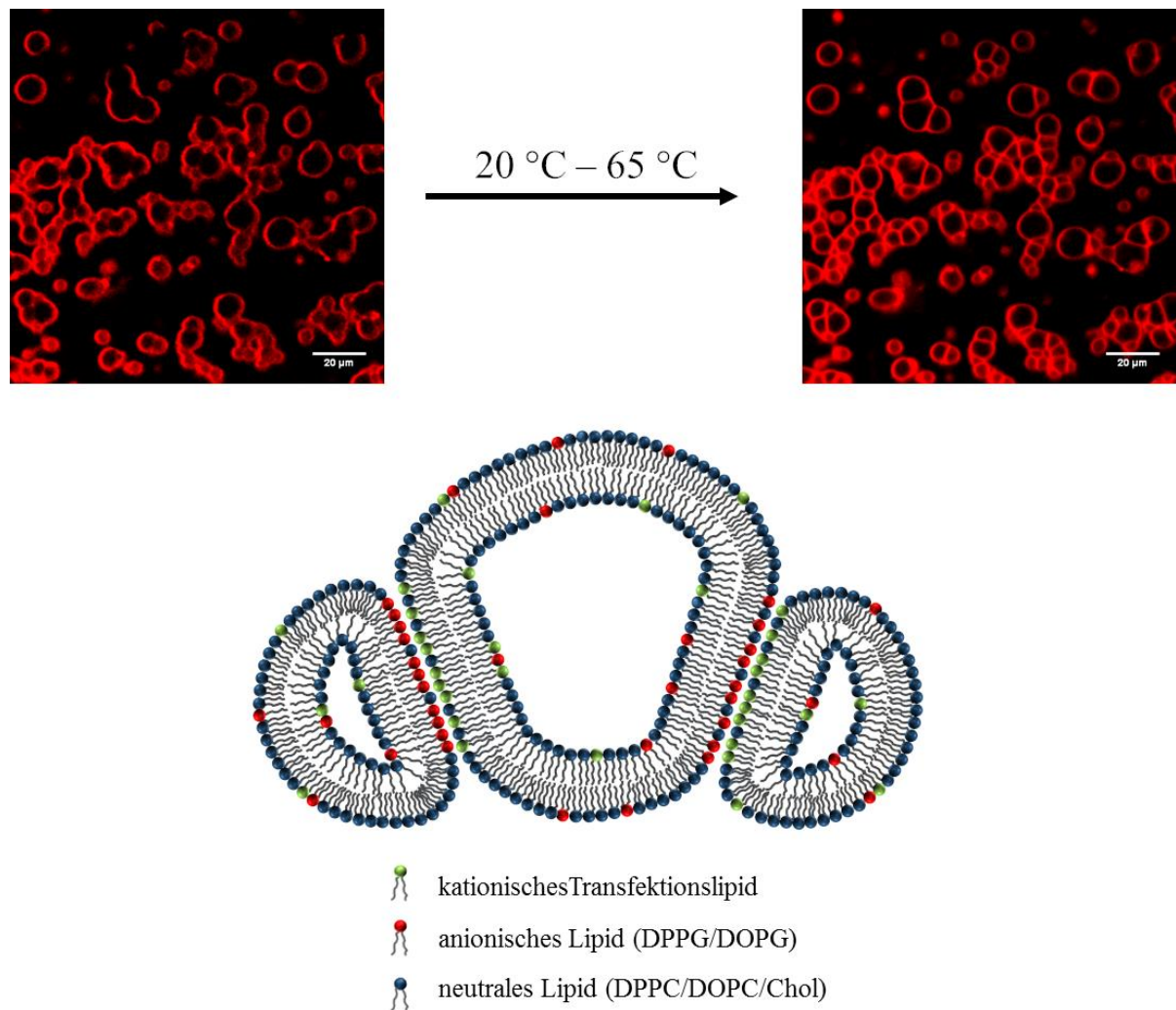


Abb. 6-17: Fluoreszenzmikroskopie: TM in der Fünf-Komponenten-Membran (Schematische Darstellung)

Repräsentative konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Querschnittsaufnahme der heterogenen Fünf-Komponenten-Vesikel mit eingebautem TM bei steigender Temperatur. Es zeigt sich eine deutliche Akkumulation der Vesikel. Phasenseparation ist nur an den Kontaktflächen der zusammengelagerten Vesikel zu beobachten. Der Übergang von der $l_o + l_d$ zur gesamt fluiden Phase dieser Bereiche tritt bei circa 65 °C auf. Der Maßstabsbalken repräsentiert 20 µm. Die schematische Darstellung im unteren Teil der Abbildung zeigt den vermuteten Mechanismus der Lipidanordnung an den Kontaktstellen der Aggregatstrukturen.

Schematische Darstellung adaptiert nach einem Entwurf von M. Herzog.

Reihe B) der Abb. 6-18 zeigt die Resultate in Anwesenheit von 10 mol% TM im DPPC:DOPE-System. In der Überlagerung der separat aufgenommenen Kanäle lässt sich eine eindeutige Fluorophorkoexistenz innerhalb eines Vesikels beobachten. Dies ist ein klarer Beweis für die Fusion zwischen dem grün markierten Trägersystem mit eingebautem TM mit dem rot markierten, anionischen Zielsystem. Das resultierende Liposom

zeigt eine deutliche $l_0 + l_d$ -Phasenkoexistenz bei Raumtemperatur. Darüber hinaus ist während der Fusion kein extern vorliegendes Atto-647 in das Vesikel eingetreten, was auf eine leckagefreie Fusion ohne Porenbildung hindeutet.

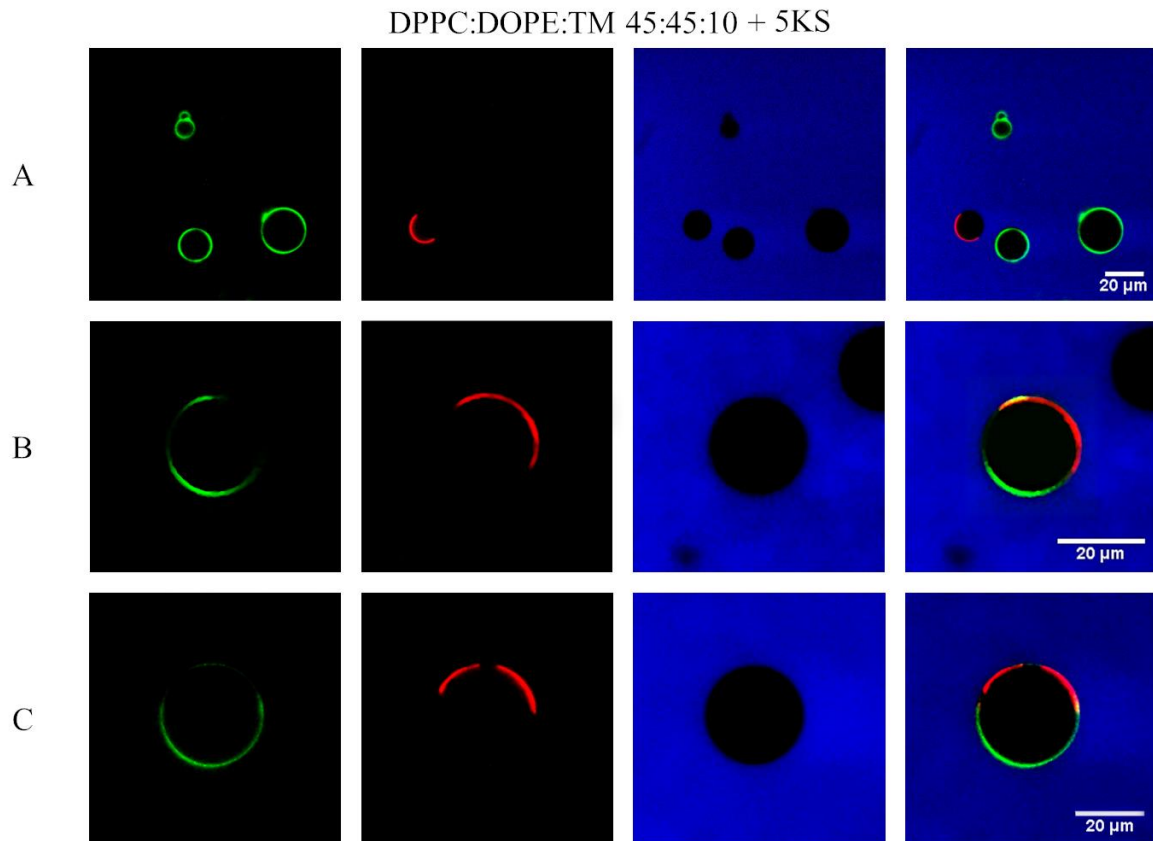


Abb. 6-18: Fluoreszenzmikroskopie: Fusionsassay TM

Konfokale Mikroskopie-Querschnittsaufnahmen der Vesikelfusionsexperimente. Die grün markierten riesigen unilamellaren Vesikel in A) bestehen aus 1:1 DPPC:DOPE ohne TM und sind in den gezeigten Aufnahmen immobilisiert. Rote Fluoreszenz zeigt Vesikel der anionischen *raft*-Membran, welche zum Umgebungspuffer der immobilisierten Vesikel hinzugegeben wurden. In B) markiert die grüne Fluoreszenz das DPPC:DOPE-System mit eingebauten TM eines molaren Anteils von 10 mol%. Auch hier liegen diese Vesikel immobilisiert vor. Rote Fluoreszenz repräsentiert die anionischen *raft*-Membran-Vesikel welche ebenfalls zum Umgebungspuffer hinzugegeben wurden. C) Fluoreszenzmarkierung äquivalent zu B). Mischung beider Vesikelspezies erfolgte frei im Puffer ohne immobilisierte Vesikel. Der Maßstabsbalken repräsentiert jeweils 20 μm .

Reihe C) zeigt eine Vesikelfusion nach Mischung der grün markierten 10 mol% TM beinhaltenden DPPC:DOPE:TM Mischung mit rot markierten Fünf-Komponenten-Membran-Vesikeln nach Präparation beider Vesikelspezies durch PVA gestützte Präparation. Die Mischung der Vesikel im flüssigen Medium erfolgte ohne Immobilisierung einer

der Spezies. Die resultierende Überlagerung der separat aufgenommenen Kanäle zeigt deutlich eine stattgefundene, leakagefreie Fusion beider Vesikelspezies durch ausgeprägte Fluorophorkoexistenz innerhalb der Membran des gezeigten Vesikels ohne Eindringen des außen vorliegenden Fluorophors.

Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass das neu entworfene TM, welches in dieser Arbeit untersucht wurde, dazu in der Lage ist, effektiv Vesikelfusion zu induzieren und bietet somit das Potential als mögliches Additiv zur Transfektion.

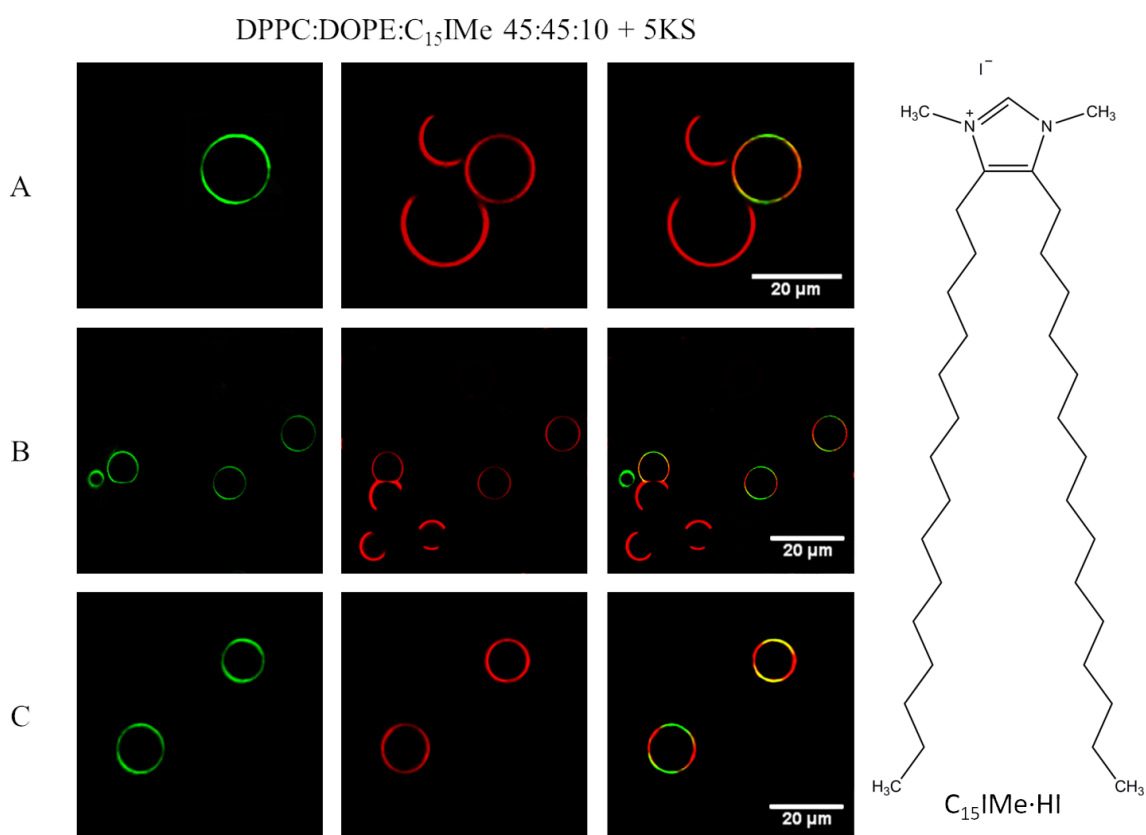


Abb. 6-19: Fluoreszenzmikroskopie: Fusionsassay C₁₅Ime

Konfokale Mikroskopie-Querschnittsaufnahmen der C₁₅Ime Vesikelfusionsexperimente sowie Struktur des eingesetzten C₁₅Ime·HI. Die grün markierten, riesigen unilamellaren Vesikel bestehen aus 1:1 DPPC:DOPE mit 10 mol% C₁₅Ime und sind in den gezeigten Aufnahmen immobilisiert. Rote Fluoreszenz zeigt Vesikel der anionischen *raft*-Membran, welche zum Umgebungspuffer der immobilisierten Vesikel hinzugegeben wurden. Der Maßstabsbalken repräsentiert jeweils 20 μm.

Um die Relevanz der Molekülstruktur des TM in Bezug auf den Anker an der 2-Position des Imidazoliumringes mit endständiger, zweiter positiver Ladung zu verifizieren, wurde eine weitere, zur TM-Fusionsuntersuchung in Präparation sowie Methodik äquivalente

Untersuchung zum Fusionspotential eines weiteren, strukturell ähnlichen Imidazoliumsalzes durchgeführt. Hierzu wurde das bereits in der Literatur ^[143,145,146] charakterisierte C₁₅IMe (1,3-dimethyl-4,5-dipentadecylimidazoliumiodid) zur Studie herangezogen. Dieses weist, verglichen mit dem TM, die gleiche Struktur abzüglich des 2-ständigen Ankers mit der zweiten positiven Ladung auf (siehe Abb. 6-19). Wie in Abb. 6-19 A) – C) zu sehen ist, zeigt sich auch unter Verwendung dieses Imidazoliumsalzes ohne zweite positive Ladung nach Mischung der separat präparierten Vesikel nach kurzer Zeit eine ausgeprägte Mischung der Fluorophore. Dies belegt äquivalent zu den TM-Untersuchungen die Fusion der gemischten Vesikel, und deutet auf ein allgemeines Fusionspotential solcher lipidartiger Imidazoliumsalze entsprechender Kettenlänge hin. Die zusätzliche Ladung des TM ist strukturell zur Fusionsinduktion offenbar nicht unbedingt notwendig, da eine Clusterbildung der Fremdmoleküle, wie im Falle des C₁₁IMe sowie des C₁₁IPr gezeigt, innerhalb der Membran sehr wahrscheinlich ist, wodurch auch in monovalenter Ausführung eine hohe örtliche positive Ladungsdichte erreicht wird.

6.3.8 Rasterkraftmikroskopie C₁₁IMe, C₁₁IPr, TM

Um die Interaktionen der Imidazoliumsalzderivate und des Transfektionsmoleküls mit den Modellmembranen auf der Sub-mikrometer-Skala betrachten zu können, wurden Aufnahmen mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie an diesen Systemen durchgeführt. Zur Vermeidung von unnatürlichen Veränderungen am System durch spezielle Präparationen der Proben durch Bedampfen oder Ähnlichem wurden die Mikroskopiebilder mit Hilfe einer Flüssigkeitszelle unter vollständiger Hydratation der Membran aufgenommen. Zu diesem Zweck wurden Doppelschichten der neutralen Drei-Komponenten- sowie der anionischen Fünf-Komponenten-Membran auf atomar planaren Mica-Oberflächen in Abwesenheit sowie unter Zugabe von 10 mol% C₁₁IMe sowie C₁₁IPr oder dem TM hergestellt.

Wie in Abb. 6-20 A) gezeigt, weist die reine Membran des Drei-Komponenten-Lipidsystems eine deutliche Phasenseparation in scharf abgetrennte Domänen auf. Hierbei entsprechen die hellen Bereiche der flüssig-geordneten l_o-, und die dunklen Bereiche der flüssig-ungeordneten l_d-, also der fluiden, Phase. Die Höhendifferenz von etwa 1,6 nm zwischen den Domänen entspricht der aus der Literatur erwarteten Höhendifferenz. ^[94,110,118]

Ergebnisse und Diskussion

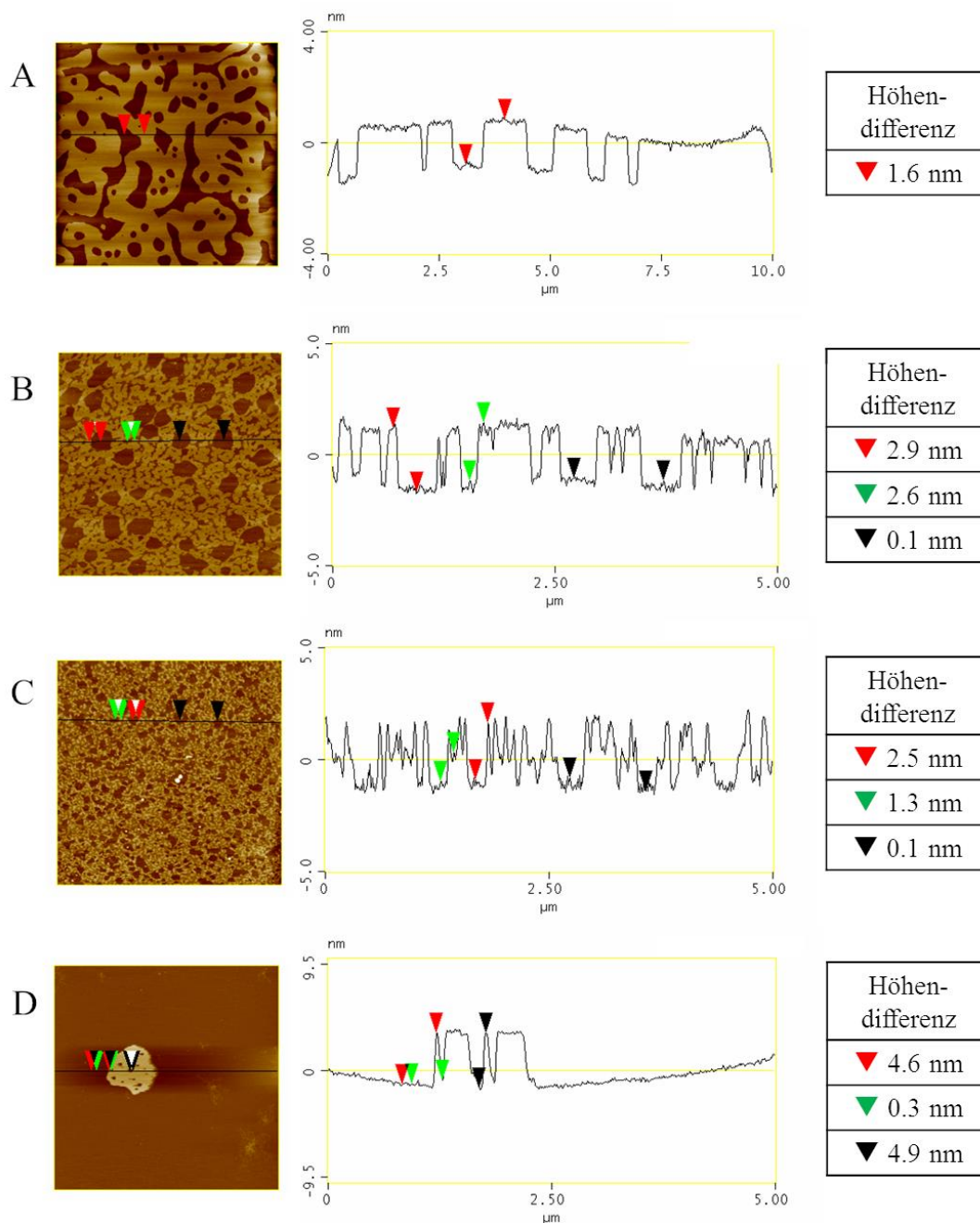


Abb. 6-20: AFM Aufnahmen: C₁₁IME, C₁₁IPr in der neutralen Drei-Komponenten-Membran

Repräsentative AFM Aufnahmen der hydratisierten Membran in Abwesenheit und in Anwesenheit der Imidazoliumsalzderivate. A) zeigt die reine, neutrale Drei-Komponenten-Membran. B) zeigt das Drei-Komponenten-System mit eingebauten 10 mol% C₁₁IME. Die Messung wurde direkt nach der Präparation durchgeführt. In C) ist das Drei-Komponenten-System mit 10 mol% C₁₁IME 90 min nach der Präparation zu sehen und in D) ist das Drei-Komponenten-System mit 10 mol% C₁₁IPr abgebildet. Die Abbildungen zeigen in A) eine Größe von 10 x 10 µm sowie 5 x 5 µm in den Abbildungen B) bis D).

Der Einbau von 10 mol% C₁₁IME in die Membran zeigt bei Betrachtung der Membrandicke und der Höhendifferenzen sowie der Topographie der entstehenden Phasen direkt

nach der Präparation in Teilabbildung B) eine drastische Verringerung der Domänengrößen und eine deutlich feinere Verteilung der flüssig-ungeordneten l_d -Domänen. Dies ist auf eine Verringerung der Linienspannung der Domänengrenzen durch Einbau des $C_{11}IMe$ an diesen Störstellen zur Verringerung des hydrophoben *mismatches* zurückzuführen.

Die Höhendifferenz zwischen den Phasen ist mit 2,6 bis 2,9 nm etwa 1 nm gegenüber der reinen Membran erhöht. Wird die Probe 90 Minuten nach Ihrer Präparation inkubiert und vermessen, ist in der Drei-Komponenten-Membran mit eingebauten $C_{11}IMe$ Imidazoliumsalz, wie in Teilabbildung C) zu sehen, eine noch feinere Verteilung der fluiden Phase zu erkennen. Darüber hinaus zeigen sich hier drei unterschiedliche Membranebenen. Die erste Ebene erhebt sich etwa 2,5 nm aus der flüssig-ungeordneten Ebene, entsprechend der Höhendifferenz, die bei Messung direkt nach der Präparation zu beobachten ist. Die zweite Ebene erreicht eine Höhendifferenz zur Basis von nur etwa 1,3 nm, was auf eine eigenständige laterale Struktur aus separierten $C_{11}IMe$ -Clustern geringerer Höhe hinweist.

Der Einbau des $C_{11}IPr$ in die neutrale Drei-Komponenten-Membran zeigt eine starke Akkumulation des Salzes zu großen Clustern in der Membran. Abb. 6-20 D) zeigt repräsentativ ein stark aggregiertes $C_{11}IPr$ -Cluster in der Membran mit einer Höhendifferenz zur Membranbasis von bis zu 4,5 nm.

Versuche, die kationischen Imidazoliumsalzderivate in die anionische Fünf-Komponenten-Membran einzubauen und als einzelne Doppelschicht auf der atomar planaren Mica-Schicht zu präparieren, schlugen fehl. Die Anwesenheit des $C_{11}IMe$ und des $C_{11}IPr$ hinderte die Membran an der Ausbildung einer stabilen Doppelschicht auf der Mica-Oberfläche. Dieses Verhalten deckt sich mit den Ergebnissen der Zeta-Potential-Messungen, in welchen eine Aggregation der Probe des anionischen Systems ohne die Ausbildung stabiler, unilamellarer Vesikel beobachtet wurde.

Die Resultate der Untersuchung der Interaktion des Transfektionsmoleküls mittels der Rasterkraftmikroskopie sind in Abb. 6-21 abgebildet. Die reine, anionische Fünf-Komponenten-*raft*-Membran ist in Teilabbildung A) zu sehen. Die Höhendifferenz der Domänen beträgt etwa 1,5 nm, was in guter Übereinstimmung mit der Literatur und der Höhendifferenz der Domänen der oben vorgestellten, neutralen Drei-Komponenten-Membran steht. ^[94,110,118] Die Bilder zeigen eine Fläche von 5 x 5 μm . Einbau des Trans-

Zusammenfassung

fektionsmoleküls in die Lipidmischung mit einem Anteil von 10 mol% führt zur Ausbildung mehrerer kleinerer, fluider l_d -Domänen. Die Höhenunterschiede zu den Domänen verringern sich hierbei nur geringfügig auf etwa 1,2 nm. Dies zeigt, dass der Einbau des Transfektionsmoleküls in eine naturähnliche, anionische Fünf-Komponenten-raft-Membran zu keinen drastischen Verschlechterungen der lateralen Organisation innerhalb der Membran führt, wie es im Fall des $C_{11}IMe$ und des $C_{11}IPr$ zu beobachten war.

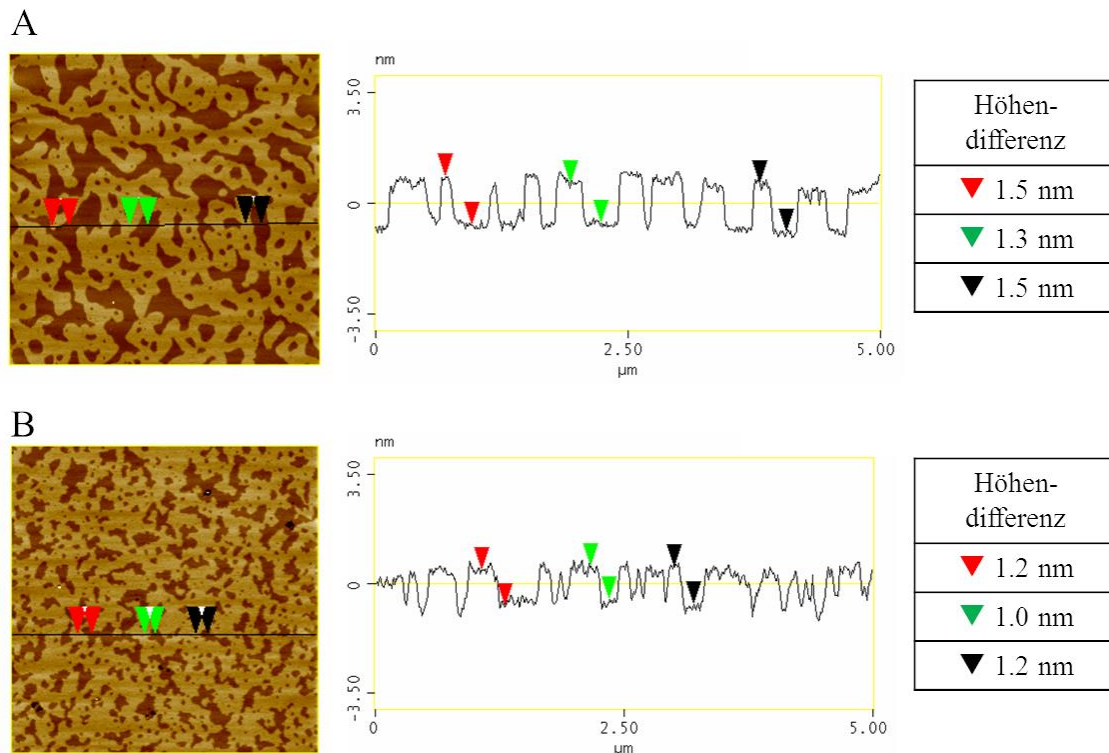


Abb. 6-21: AFM Aufnahmen: TM in der anionischen Fünf-Komponenten-Membran

Repräsentative Rasterkraftmikroskopieaufnahmen der vollständig hydratisierten Fünf-Komponenten-raft-Membran mit und ohne eingebautes Transfektionsmolekül. A) zeigt die reine, anionische Fünf-Komponenten Membran, während B) die Membran unter Anwesenheit von 10 mol% TM abbildet. Die Bilder zeigen eine Fläche von 5 x 5 μm .

6.4 Zusammenfassung

In der in diesem Kapitel vorgestellten Untersuchung konnte der Einfluss der durch die Gruppe von Prof. Dr. Glorius synthetisierten, alkylierten Imidazoliumsalze über die bereits bekannten Untersuchungen hinaus erweitert, sowie die potentielle Anwendung dieser in Gentransfer wie auch Wirkstofftransport analysiert werden.

Aufgrund ihrer hohen Stabilität, großen Variabilität sowie verhältnismäßig einfachen Synthese, sind Imidazoliumsalze in den vergangenen Jahren in den Fokus der Materialwissenschaften sowie von biologischen Anwendungen gerückt. Seit 2015 wurden Imidazoliumsalze, welche im Rückgrat mit langen Alkylketten versehen wurden, als Lipidanaloga etabliert. Diese zeigen, dem Einbau in Phospholipidmembranen folgend, in Abhängigkeit ihrer Struktur verschiedene Auswirkungen. ^[142,143,161]

Es wurden zwei neuartige imidazoliumbasierte Lipide, das C₁₁IPr mit einer sterisch hochanspruchsvollen Kopfgruppe, sowie das C₁₁IME mit einer sterisch weniger anspruchsvollen dimethylierten Kopfgruppe, und ein speziell für Transfektion und Fusionsinduktion neu entworfenes Molekül untersucht. Das C₁₁IPr wurde hierbei mit dem C₁₁IME in Membransystemen verschiedener Komplexität untersucht und verglichen. Begonnen wurden die Untersuchungen an einem simplen Ein-Komponenten-Membransystem, bestehend aus reinem DPPC. Die Komplexität der Membranen wurde anschließend über ein heterogenes, neutrales Drei-Komponenten-System, bestehend aus DPPC:DOPC:Chol. (2:1:1), bis hin zu einem 10 % anionischen, heterogenen DPPC:DOPC:DPPG:DOPG:Chol. (45:5:20:5:25) Fünf-Komponenten-System gesteigert, welches in physiologischer Konzentration der anionischen Lipide und in physiologischem Verhalten als *raft*-Membran natürlichen Plasmamembranen ähnelt. ^[149,150] Die Mehrkomponentensysteme mit eingelagertem Cholesterin weisen bei Raumtemperatur Phasenkoexistenzgebiete *raft*-artiger, flüssig-geordneter (l_o) sowie flüssig-ungeordneter (l_a) Phasen auf. ^[151,152] Für die Untersuchung des Transfektionspotentials des TM wurde eine DPPC:DOPE (1:1) Lipidmischung als Trägersystem für das TM gewählt, da DOPE als neutrales Lipid mit einer kleinen Ethanolamin-Kopfgruppe negative Krümmungen in der Membran induziert, welche im Zuge der Ausbildung nichtlamellarer Phasen für die Induktion von Membranfusion förderlich ist. ^[157]

Es konnte gezeigt werden, dass der Effekt auf das thermotrope Phasenverhalten der untersuchten, neutralen Membran in Abhängigkeit der Konzentration und der Kopfgruppengröße der imidazoliumbasierten Lipide die Phasenübergangstemperatur der Membranen verringert. Der Einfluss der größeren Kopfgruppe auf diese Verringerung zeigt sich als deutlich ausgeprägter als im Falle der kleineren dimethylierten Kopfgruppe, was konsistent mit den vorangegangenen Studien ist. ^[142] Zudem zeigt sich eine Unterdrückung des Vorphasenüberganges in der Membran aufgrund der Ausbildung von Phasenkoexistenz-

Zusammenfassung

gebieten bei bereits geringer Dotierung der Membran mit den Imidazoliumsalzen. Weiterhin wurde gezeigt, dass die laterale Ordnung der neutralen, sowie der anionischen Membranen durch den Einbau der Salze sowohl in der Gel- als auch in der fluiden Phase beeinflusst wird, wobei eine deutlichere Störung und Verringerung der Ordnung erneut für das Molekül mit der größeren Kopfgruppe zu beobachten ist. Dies, in Kombination mit der Erkenntnis der Ausbildung von Phasenkoexistenzgebieten, deutet auf eine Clusterbildung der Imidazoliumsalze in der Membran hin, welche durch AFM-Aufnahmen bestätigt wurden.

Das Oberflächenpotential der Lipidmembranen wird durch den Einbau beider Imidazoliumsalze signifikant erhöht, was nicht nur auf einen effektiven Einbau der Salze in die Membran hindeutet, sondern darüber hinaus zeigt, dass sogar eine Ladungsumkehr in anionischen Membranen induziert werden kann. Hierdurch ergeben sich Möglichkeiten für Wirkstofftransport sowie Gentransfer durch beispielsweise lipidgestützte Transfektion negativ geladener DNS. Der Einbau der lipidartigen Imidazoliumsalze in die Modellmembran zeigt im Falle des sterisch anspruchsvollen C₁₁IPr eine geringere Effizienz als die des C₁₁IME. Dies steht ebenfalls in guter Übereinstimmung mit vorangegangenen Untersuchungen variierender Kopfgröße und Kettenlänge der Imidazoliumsalze. ^[143,144]

Der Einbau der artifiziellen Lipide in die Vesikel zeigt einen ausgeprägten Einfluss auf das Phasenseparationsverhalten sowie die Morphologie der Modellmembranen heterogener Zusammensetzung. Hier zeigen sich eine drastische Senkung der Phasenseparations-temperatur sowie eine Veränderung der Größe und Form der neutralen wie auch der anionischen Vesikel. Der Einbau des C₁₁IME in ein neutrales, heterogenes Modellsystem führt bei einer Konzentration von 10 mol% des Moleküls in der Membran zum Ausbleiben des Phasenübergangs dieser Vesikel, sowie zur elliptischen Verformung dieser aufgrund von Störstellen in der Membran. Die gleiche Konzentration des C₁₁IPr senkt den Phasenübergang des Drei-Komponenten-Systems auf etwa 5 °C und führt durch die noch drastischere Störung der Membranordnung zu verformten, sehr großen Vesikeln sowie parallel vorliegenden, potentiell gemischt mizellaren Strukturen. Im anionischen Fünf-Komponenten-System zeigt sich mit steigender Konzentration des C₁₁IME sowie des C₁₁IPr eine Vergrößerung der Vesikel sowie ein Verschieben der Übergangstemperatur zu niedrigeren Temperaturen bis zu ihrem Verschwinden bei 10 mol% C₁₁IME oder C₁₁IPr.

Die Untersuchung der Phasenkoexistenz innerhalb der neutralen Drei-Komponenten-Membran auf der Mikrometerskala zeigt die Ausbildung segregierter Bereiche der Imidazoliumsalzderivate durch deren Zusammenlagerung. Im Falle des C₁₁IMe zeigt sich im Vergleich zur reinen Membran im Höhenprofil eine weitere Höhenstufe zwischen der l_d- und der l_o-Phase durch die segregierten C₁₁IMe Cluster. Das C₁₁IPr zeichnet sich durch definierte Cluster von bis zu 5 nm Höhe aus.

Das zur Transfektionsinduktion entworfene Molekül zeigt in den neutralen Membransystemen keinen signifikanten Einfluss auf deren laterale Ordnung. Lediglich in der fluiden Phase des anionischen *raft*-Systems zeigt sich eine geringfügige Erhöhung der lateralen Ordnung bei 10 mol% des Moleküls in der Membran. Der Einbau dieses Moleküls in anionische Membransysteme zeigt jedoch eine signifikant erhöhte Zahl an aggregierten Vesikeln, was auf eine Sortierung der Lipide neben den kationischen Imidazoliumsalzderivaten in der Membran an den Kontaktflächen der Vesikel hindeutet. Auf der Mikroebene zeigt sich als Resultat des Einbaus des Transfektionsmoleküls die Ausbildung von marginal kleineren l_d-Domänen in der Membran. Es konnte abschließend in einem fluoreszenzbasierten Assay deutlich gezeigt werden, dass die Verwendung des zur Fusionsinduktion entworfene TM-Moleküls in einem Trägersystem, bestehend aus DPPC:DOPE mit 10 mol% des kationischen TM, bei Zugabe zu einem anionischen Zielsystem zu einer erhöhten Zahl an fusionierten Vesikeln führt (siehe schematische Darstellung des Assays und dessen Resultate in Abb. 6-22).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das strukturell ähnliche Imidazoliumsalz C₁₅IMe mit lediglich einer positiven Ladung und ohne Anker in 2-Position des Imidazoliumringes ebenfalls zur Fusionsinduktion verwendet werden kann. Dies deutet auf ein generelles Fusionsinduktionspotential der lipidartigen Imidazoliumsalze als ganze Molekülklasse hin, wodurch eine große Variabilität an möglichen lipidartigen Imidazoliumsalzen zur Anpassung an diverse Membransysteme zur Verfügung steht. Basierend auf diesen Ergebnissen sind in zukünftigen Experimenten hinsichtlich des Wirkstofftransports sowie Gentransfektion weitere Experimente zur Optimierung ihrer Eigenschaften denkbar.

Zusammenfassung

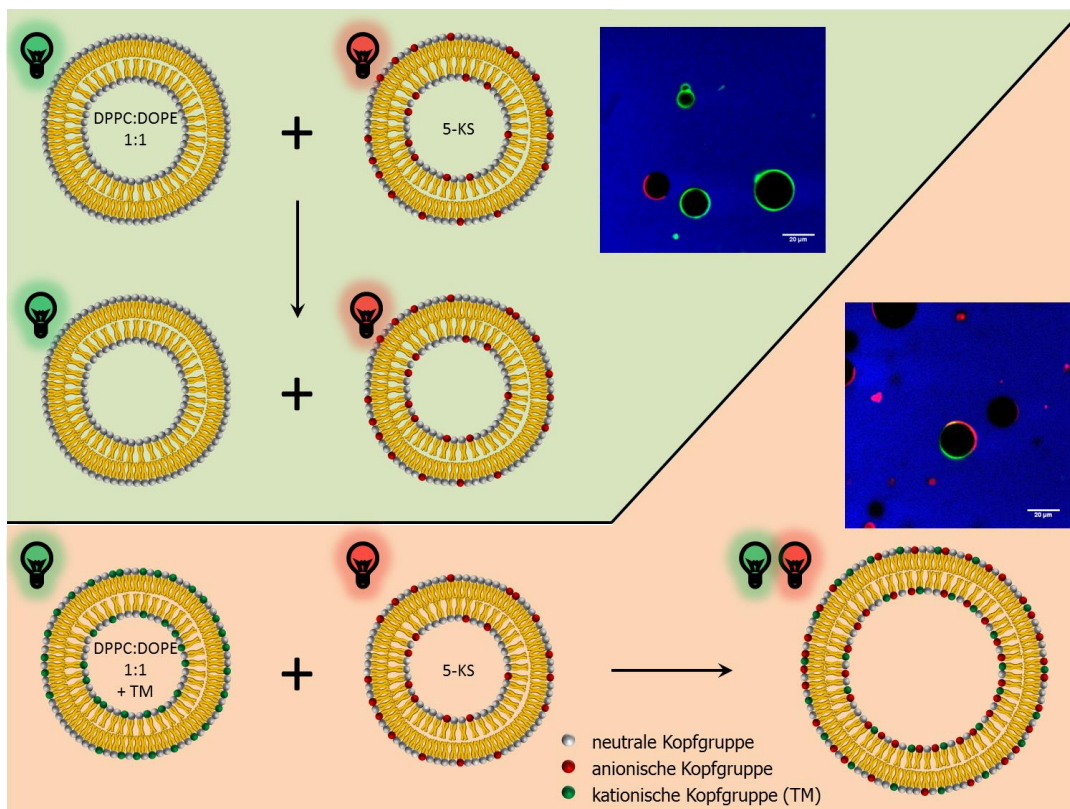


Abb. 6-22: Schematische Darstellung der Resultate der Fusionsexperimente

Schematische Darstellung der Resultate der Fusionsexperimente des Fünf-Komponenten-Systems mit dem Transfektionssystem ohne das Transfektionsmolekül (oben), und mit dem Transfektionssystem mit eingebautem Transfektionsmolekül (unten). Oben: Keine Anzeichen für Vesikelfusion durch Fluorophorvermischung. Unten: Klare Anzeichen für Fusion durch Fluorophorvermischung, hervorgerufen durch das Transfektionsmolekül (TM).

In nachgestellten Wirksamkeitsstudien konnte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerke des Instituts für Medizinische Biochemie der Universität Münster das Transfektionspotential des TM bereits positiv, jedoch in geringer Effizienz, an biologischen Zellen nachgewiesen werden.

7 EINFLUSS DES WÄSSRIGEN ZWEI-PHASEN-SYSTEMS PEG/DEXTRAN AUF MODELLMEMBRANEN

7.1 Einleitung

Riesige, unilamellare Vesikel stellen für die biophysikalische Forschung an Membranen und deren Eigenschaften die idealen, weil simplen und dennoch in ihrem Verhalten sehr naturähnlichen Modellsysteme dar. Aus diesen Gründen werden diese Systeme häufig zur Konstruktion biomimetischer Zellmodelle sowie der Untersuchung dieser genutzt. ^[47,156,162–165] Natürliche Membranen sind im Gegensatz zu den für die meisten Membranstudien verwendeten Systeme jedoch nicht nur einer verdünnten, wässrigen Lösung ausgesetzt. Vielmehr stehen sie einer Vielzahl von Interaktionen mit diversen Makromolekülen wie Proteinen, Nukleinsäuren oder Polysacchariden auf der zytosolischen Seite der Membran gegenüber. Dies führt zu einer makromolekularen Kondensation innerhalb dieser Modellzelle mit hieraus resultierender Phasenseparation durch hydrophobe Effekte und Effekte durch ausgeschlossene Volumina bei Proteinlösungen. ^[47,54,166–168] Diese Mikrokompartimentierung innerhalb des Zytosols natürlicher Zellen steht im Verdacht, für verschiedene Funktionen der Zellen von großer Bedeutung zu sein. ^[50,53] Um solche in der Natur auftretenden Prozesse für biophysikalische Untersuchungen an noch naturähnlicheren Zellmodellen nachzuahmen, kann diese makromolekular kondensierte Umgebung zu einem gewissen Grad durch ein flüssiges Zwei-Phasen-System, bestehend aus wässrigen Polymerlösungen, nachgeahmt werden. ^[32,47] Eines der Systeme, welches zur Nachahmung makromolekular kondensierter und phasenseparierter Zustände in Vesikeln verwendet wird, besteht aus einer Mischung aus Polyethylenglycol (PEG) und Dextran. Dieses System vollführt bei definierten Konzentrationen beider Komponenten eine Phasenseparation, welche bereits in vielen Studien abhängig von diversen Faktoren untersucht wurde. ^[32,47–51,54,55,169] In dieser Arbeit wird ebenfalls die Polymer-Polymer-Mischung aus PEG/Dextran als Mittel makromolekularer Verdichtung verwendet, deren Separation in der Aggregation und daraus folgender sterischer Exklusion begründet liegt. ^[37,38] Die Separation in flüssig-flüssig Mischungen können jedoch trotz vieler Be-

Einleitung

mühungen nicht vollends theoretisch beschrieben werden. Stattdessen basieren viele genutzte Modelle auf der Kombination verschiedener Theorien, welche bereits eine große Bandbreite an Vorhersagen ermöglichen. ^[41-46]

Neben der, unter anderem von KEATING et al., untersuchten Temperatur- und Osmolytabhängigkeit riesiger unilamellarer Vesikel unter Einfluss des Zwei-Phasen-Systems, ist insbesondere der Einfluss einer weiteren physikalischen Größe von Bedeutung, die bislang in diesem Zusammenhang außerhalb des Fokus lag: der Druck. Die Funktionsweise zellulärer Bestandteile unter extremen Konditionen, wie beispielsweise hohem Druck, ist in den letzten Jahren immer weiter in den Fokus biophysikalischer Untersuchungen gerückt. Dies liegt daran, dass ein Großteil der Organismen und generell der Biomasse der globalen Biosphäre in marinen Regionen in Tiefen von über 1000 m und somit resultierenden Drücken von mehr als 100 bar bis hin zu 1000 bar am tiefsten Punkt des Meeres verortet ist. ^[165,170] Da die Tiefsee und der Erdmantel als Geburtsstätte des Lebens angesehen werden können, sind Untersuchungen unter hohem Druck von enormer Relevanz für das Verständnis der Funktion biologischer Zellen und deren Bestandteilen unter diesen extremen Bedingungen. ^[171,172]

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine Charakterisierung des barotropen Phasenverhaltens einer 10 % anionischen, Fünf-Komponenten-*raft*-Membran mittels Hochdruck-Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt. Diese ähnelt in physiologischer Konzentration der anionischen Lipide und in physiologischem Verhalten als *raft*-Membran natürlichen Plasmamembranen. ^[149,150]

Hierzu wurden GUVs hergestellt, in denen durch die Zugabe eines oder mehrerer Fluorophore die Unterscheidung der flüssig-geordneten (l_o) von der flüssig-ungeordneten (l_d) Phase möglich ist. ^[151,152] Die Domänen verschiedener Zusammensetzung und Fluidität stehen in der Diskussion, von hoher Relevanz für membranverbundene Prozesse wie Signaltransport, Exo- sowie Endocytose wie auch die Aufnahme von Viren zu sein. ^[152-155] Die Charakterisierung wurde bei einer Temperatur von 40 °C in einem Druckbereich zwischen 1 bar und 800 bar in einer speziellen Hochdruck-Fluoreszenzmikroskopiekammer durchgeführt. ^[10]

Dieser Charakterisierung folgend wurde zunächst das thermotrope Phasenverhalten des Systems nach Präparation der Vesikel in 11,5/8 gew% PEG/Dextran untersucht, wobei

besonderes Augenmerk auf das Strukturverhalten der Vesikel als Resultat der Phasenseparation des PEG/Dextran-Systems gelegt wurde. Zu diesem Zweck wurde die Membran der Vesikel mit zwei Fluorophoren versehen, welche die I_d -Phase unabhängig von der I_o -Phase markiert. Darüber hinaus wurde das Zwei-Phasen-System mit dem an das Glycin Max Lektin (SBA) konjugierten Fluorophor Atto-647 versetzt, welcher sich primär in der Dextran-Phase anlagert. ^[49,50,55] Somit ist eine Separation der beiden wässrigen Phasen neben der Separation der Membranphasen möglich.

7.2 Material und Methoden

7.2.1 Material

Tab. 7-1: Chemikalien PEG/Dextran-Studie

Für die in diesem Kapitel untersuchten Proben verwendete Chemikalien sowie zur Präparation der Proben genutzte Lipide und deren Bezugsquellen.

Chemikalien und Lipide	Bezugsquelle
DPPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DOPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DOPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DOPE	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Cholesterin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
<i>N</i> -Rh-DHPE	Invitrogen (Carlsbad, California, USA)
NBD-DHPE	Invitrogen (Carlsbad, California, USA)
SBA-Atto-647	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
Polyethylenglycol (4,6 kDa)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dextran (10 kDa)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Chloroform	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
HEPES	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
NaCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

7.2.2 Präparation der Proben

Die in dieser Studie untersuchten GUVs der Zusammensetzung 20:5:45:5:25 mol% DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Chol. wurden durch Mischung von 10 mg mL⁻¹ Stammlösungen der reinen Lipidkomponenten in Chloroform hergestellt. Zusätzlich wurden der Mischung auf 100 µL 1,5 µL N-Rh-DHPE, sowie 1,5 µL NBD DHPE entsprechend jeweils 0,1 mol% zur Markierung der l_d- neben der l_o-Phase zugegeben. Zur Herstellung der Vesikel wurde die Methode der Polyvinylalkohol (PVA)-unterstützten Präparation gewählt. Die detaillierte Präparation der riesigen unilamellaren Vesikel erfolgte entsprechend der Präparationsvorschrift aus Kapitel 5.2.2 sowie 6.2.7 und der Literatur ^[156,158,159] Hierbei wurde eine zweistündige Inkubationszeit des hydratisierten Lipidfilmes bei einer Temperatur von 75 °C genutzt.

Die Präparation des PEG/Dextran-Systems erfolgte durch Feststoffeinwaage von Dextran (10 kDa) sowie Polyethylenglycol (PEG, 4,6 kDa) und anschließendem Lösen in 10 mM HBS Puffer (10 mM HEPES + 100mM NaCl) bei einem pH-Wert von 7,8. Zudem wurden dem System 1,5 µL des Alexa-647 konjugierten Lectin SBA Proteins pro 100 µL zur Markierung der dextranreichen Phase zugegeben. Anschließend wird das so präparierte System mittels eines Temperierbades auf sein thermotropes Übergangsverhalten überprüft und, gegebenenfalls, durch Zugabe von Puffer oder zuvor präparierter PEG- oder Dextran-Stammlösungen auf einen Phasenübergang in dem gewünschten Temperaturbereich von 40 - 45 °C eingestellt.

Die Zugabe des Zwei-Phasen-Systems zu den auf PVA präparierten Lipidschichten erfolgte nach Vorheizen der Lipidschicht auf eine Temperatur oberhalb der Phasenübergangstemperatur des Zwei-Phasen-Systems sowie des Lipidsystem. Auf diese Weise kann das Zwei-Phasen-System als einphasige Lösung zugegeben werden, ohne durch den Temperaturunterschied im Probengefäß direkt zu separieren. ^[54] Nach zweistündiger Inkubationszeit der Proben bei 75 °C wurden diese zum Abkühlen und Separieren des Zwei-Phasen-Systems aus den Probenkammern entfernt und in Eppendorf -Vials überführt. An der nach der Separation der Phasen entstehenden Phasengrenze konnten die für die Untersuchung herangezogenen GUVs abpipettiert, und mit dem doppelten Volumen aus der überstehenden, PEG-reichen Phase verdünnt werden. Somit lag final eine PEG-reiche Lösung mit Vesikeln mit separiert voneinander vorliegenden PEG- sowie dextranreichen Kompartimenten in ihrem inneren vor. Die Verdünnung dieser Lösung mit PEG-

reicher Phase bietet den Vorteil der Verringerung der Zahl der Streuzentren durch Mikrokompartimente des Zwei-Phasen-Systems. Hierdurch kann eine bessere Aufnahmequalität des der Mikroskopiebilder erreicht werden. Zudem verringert sich durch die Verdünnung mit PEG-reicher Phase die Hintergrundfluoreszenzintensität der vorliegenden SBA-Alexa-647 Fluorophore in der Dextran-Phase.

7.2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die präsentierten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden an dem anionischen, heterogenen Fünf-Komponenten-System, bestehend aus 20:5:45:5:25 mol% DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Chol. durchgeführt. Diese wurden, wie oben beschrieben, durch Fluorophore markiert und zu riesigen unilamellaren Vesikeln präpariert. Die Temperaturabhängigkeit der Mikroskopiemessungen wurde durch Temperierung der zur Messung verwendeten Hochdruckzelle durch einen externen Kälte-Umwälzthermostat der Firma Julabo, Seelbach, Deutschland realisiert. Detaillierte Beschreibungen der verwendeten Hochdruckzelle sind der Arbeit von BROOKS et al. sowie der Dissertation von N. ERWIN zu entnehmen. ^[10,67]

Die Untersuchung der Phasenseparation in der Membran sowie im PEG/Dextran-System erfolgte mit dem konfokalen Laser scanning Mikroskop Biorad MRC 1024 des Herstellers Zeiss, Deutschland, welches an ein invertiertes Nikon Eclipse TE-300 DV Mikroskop, Nikon, Tokyo, Japan, gekoppelt ist. Die Hochdruckcharakterisierung der Fünf-Komponenten-Vesikel erfolgte mittels der CCD Kamera Andor iXon Ultra, Acal BFi der Firma Andor, Deutschland, unter Verwendung einer Quecksilberdampfampe Hg 100W der Firma Nikon, Tokyo, Japan. Fluoreszenzanregung erfolgte bei Wellenlängen von 488 nm, 561 nm sowie 648 nm durch einen kombinierten L4Cc-CSB-130 Laser der Firma Oxxius Simply Light, Lannion, Frankreich. Im Falle der Aufnahmen mit der CCD Kamera wurden der Quecksilberdampfampe dem Mikroskop zugehörige Anregungsfilter oben genannter Wellenlängen nachgeschaltet. Die Verarbeitung der mit dem Laser scanning Mikroskop aufgenommenen Bilder erfolgte durch die Software LaserSharp2000 der Firma Zeiss, Deutschland. Die Verarbeitung der durch die CCD Kamera erstellten Bilder erfolgte über die Software NIS Elements BR V. 4.50.00 der Firma Nikon, Tokyo, Japan.

Die Aufnahmen wurden mittels des Objektivs des Typs LU Plan ELWD 50x/0,55 B, OFN 25 mit einer Arbeitsweite von 10,1 mm, Nikon, Tokyo, Japan, sowie des CFI T Plan Epi SLWD 100x NA/WD 0.60/10.0mm, Nikon, Tokyo, Japan, aufgenommen. Für alle Modellmembransysteme und Temperaturen wurden repräsentative Aufnahmen der auftretenden Effekte an mehreren Stellen jeder Probe und für mehrere separat voneinander präparierte Proben aufgenommen.

7.3 *Ergebnisse und Diskussion*

Nachfolgend werden die in diesem Forschungsprojekt bislang erhaltenen, unveröffentlichten Erkenntnisse und Messergebnisse präsentiert. Die Untersuchungen zu dieser Studie erfolgten unter Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie entsprechend der jeweiligen Beschreibung bei Normaldruck oder unter Hochdruck.

7.3.1 *Fluoreszenzmikroskopie*

Zur Untersuchung des Phasenseparationsverhaltens des verwendeten Modellmembransystems bei Druckapplikation bis zu 1000 bar wurden Vesikel des reinen 20:5:45:5:25 mol% DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Chol.-Gemisches charakterisiert. Diese sollen als Standard im Vergleich mit Vesikeln des gleichen Fünf-Komponenten-Systems in einer PEG/Dextran angereicherten Umgebung dienen. Hierzu wurden die Vesikel wie oben beschrieben in einem 10 mM HEPES-Puffer mit 100 mM NaCl präpariert und in die Hochdruckzelle überführt. Entsprechend des in Abb. 7-1 schematisch dargestellten *p-t*-Diagramms wurde nach Einstellen der Temperatur des Systems ein Druckprofil appliziert. Die Aufnahmen A) bis H) in Abb. 7-1 zeigen den Verlauf des Phasenüberganges von der fluiden- in die Gel-Phase einzelner Bereiche während sowie nach der Druckapplikation. Die Aufnahmen zeigen exemplarisch in den Teilabbildungen A) bis C) das Überschreiten des Phasenübergangsdruckes, in den Teilabbildungen C) bis F) die Phase der Druckkonstanz im System sowie in den Abbildungen F) bis H) das Unterschreiten des Phasenübergangsdruckes. Die Phase der Druckkonstanz zeigt deutliche Dynamik in den entstandenen Domänen inklusive der Zusammenlagerung mehrerer rigider Domänen. Diese bilden sich zur Verringerung der Zahl der hydrophoben *mismatches* aus, und äußern sich als nicht fluoreszente, dunkle Bereiche in der Membran.

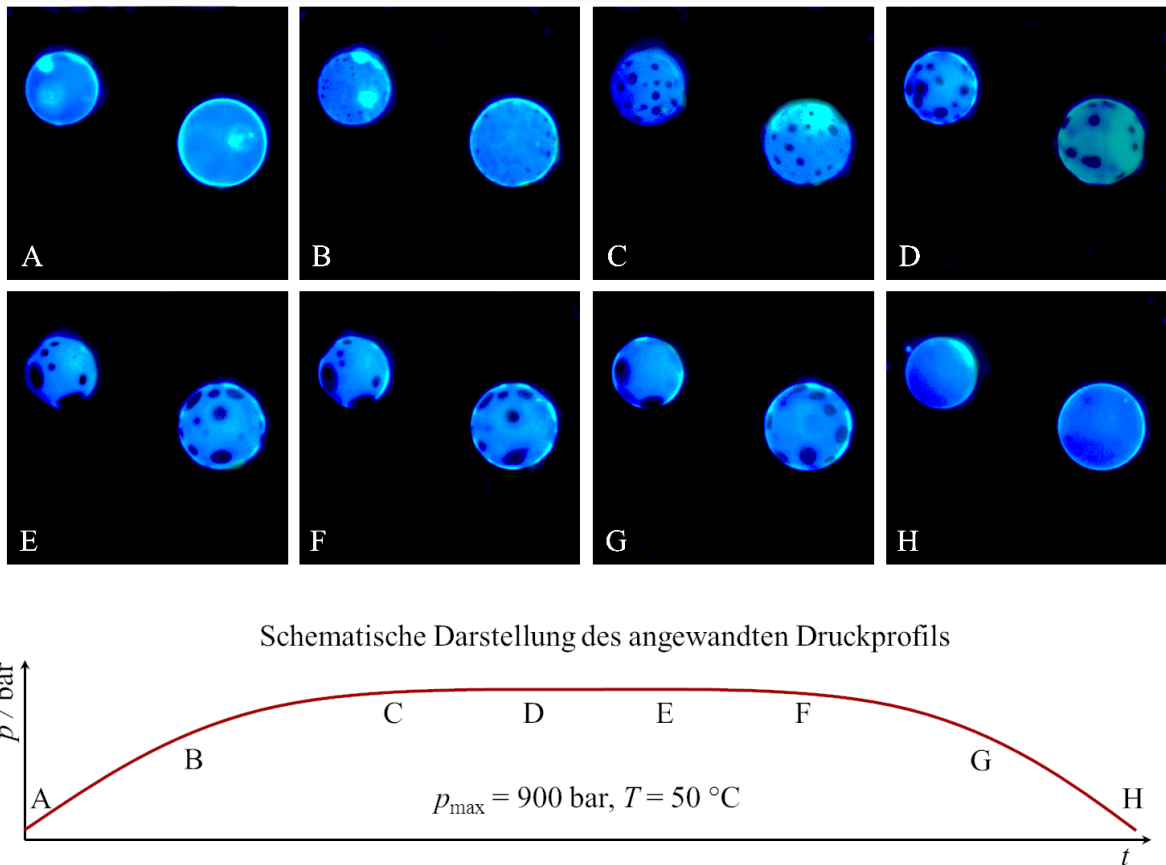


Abb. 7-1: Schematische Darstellung der barotropen Phasenseparation im 5KS

Exemplarische Darstellung eines druckinduzierten Phasenseparationsvorganges in einer Membran des anionischen Fünf-Komponenten-Systems. Das schematisch dargestellte Druckprofil zeigt die Phase des Druckaufbaus, die Phase der Druckkonstanz sowie die Phase des Druckabfalls im System mit den zugehörigen morphologischen Änderungen in der Modellmembran. In den betrachteten Vesikeln wurde die fluide Phase mittels N-Rh-DHPE markiert. Die graustufigen Aufnahmen wurden eingefärbt, um die fluiden Domänen deutlich hervorzuheben.

Die Charakterisierung des anionischen, Fünf-Komponenten-*raft*-Systems erfolgte bei konstanter Temperatur durch wiederholte Applikation der Schritte A) bis F) der in Abb. 7-1 dargestellten Druckprofilschritte. Hierbei erfolgte die Druckerhöhung in 100 bar Schritten bis auf einen Maximaldruck von 900 bar. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit des Phasenübergangsdruckes und einer apparaturbedingten Obergrenze des hydrostatischen Druckes von circa 1000 bar wurde eine detaillierte Charakterisierung des Lipidsystems bei Temperaturen von 40 °C sowie 45 °C durchgeführt. Bei diesen Parametern ist

in diesem Membrantyp ein Gel-zu-flüssig Phasenübergang innerhalb des apparativ möglichen Druckbereiches zu erwarten. ^[94]

Die an dieser Stelle durchgeführte Betrachtung der Phasenseparation einzelner Membranen dient ausdrücklich nicht der genauen Bestimmung des Phasenübergangsdruckes. Durch die hohe Komplexität des Lipidsystems führen bereits infinitesimale Unterschiede in der Zusammensetzung einzelner Vesikel zu signifikanten Abweichungen vom mittleren Phasenübergangsdruck der Gesamtheit des Systems.

Abb. 7-2 und Abb. 7-3 zeigen beispielhafte Aufnahmen der oben beschriebenen Charakterisierung der *raft*-Membran bei 40 °C sowie bei 45 °C (weitere Beispielhafte Aufnahmen bei diesen Temperaturen sind in Abb. 10-6 und Abb. 10-7 zu sehen). Hier wird deutlich, dass der Phasenübergangsdruck der komplexen Membran bei Betrachtung einzelner Vesikel signifikant variiert. So zeigt sich der Beginn der Phasenseparation des *raft*-Systems bei 40 °C in Abb. 7-2 zwischen 500 bar und 600 bar, in dem in Beispiel aus Abb. 10-6 jedoch zwischen 400 bar und 500 bar. Deutlich ausgeprägter zeigt sich dieser Unterschied in den dargestellten Beispielaufnahmen bei 45 °C aus Abb. 7-3 und Abb. 10-7, in denen der Beginn der Phasenseparation trotz der höheren Temperatur bereits zwischen 100 bar und 200 bar beziehungsweise zwischen 300 bar und 400 bar einsetzt.

Die Koaleszenz der rigiden, dunklen Domänen in den dargestellten Bildern erfolgt, wie in Abb. 7-1 gezeigt, als Funktion der Zeit und nicht als Funktion des weiter ansteigenden Druckes. Eine solche Koaleszenz kleiner Domänen in größere phasenseparierte Bereiche ist aufgrund der Reduktion der Oberflächenenergie, genauer der Grenzlinienenergie, der Domänengrenzen zu erwarten. Die Erhöhung des Druckes über den Phasenübergangsdruck der einzelnen betrachteten Vesikel aus Abb. 7-2 und Abb. 7-3 hinaus erfolgte zur Beobachtung der Form und der Struktur der separierten Vesikel. Diese zeigen in dem betrachteten Bereich bis etwa 800 bar jedoch keine signifikante Änderung der Morphologie.

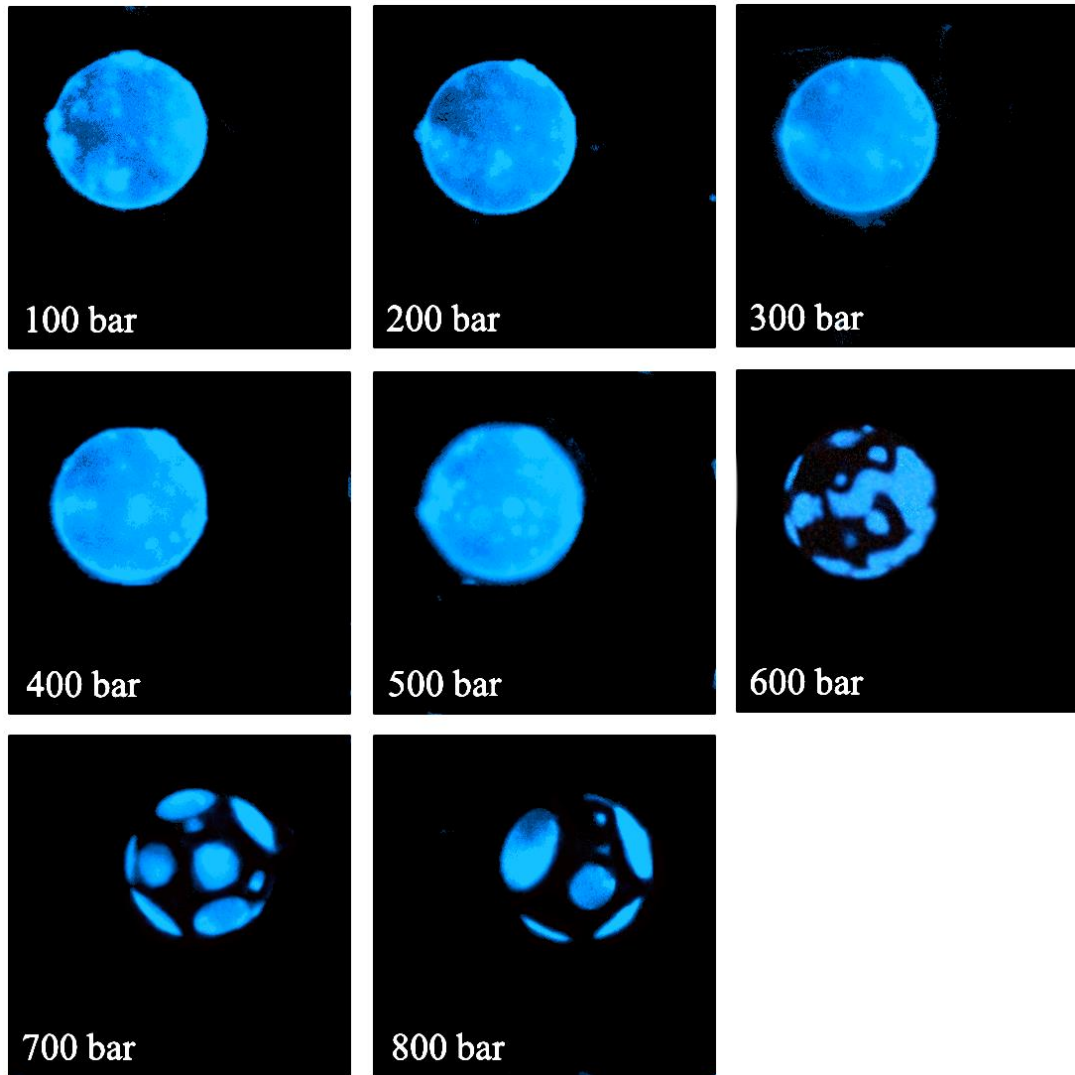


Abb. 7-2: Druckabhängiges Phasenverhalten des 5KS bei $T = 40\text{ °C}$ ¹¹

Beispielhafte Aufnahmen des barotropen Phasenseparationsverhaltens des Fünf-Komponenten-*raft*-Systems in 10 mM HEPES bei einer Temperatur von $T = 40\text{ °C}$. Blau: Fluide Domänen, markiert durch N-Rh-DHPE, eingefärbte Graustufenaufnahme.

¹¹ Aufnahmen im Rahmen des gemeinsamen Projektes erstellt von M. Manisegaran.

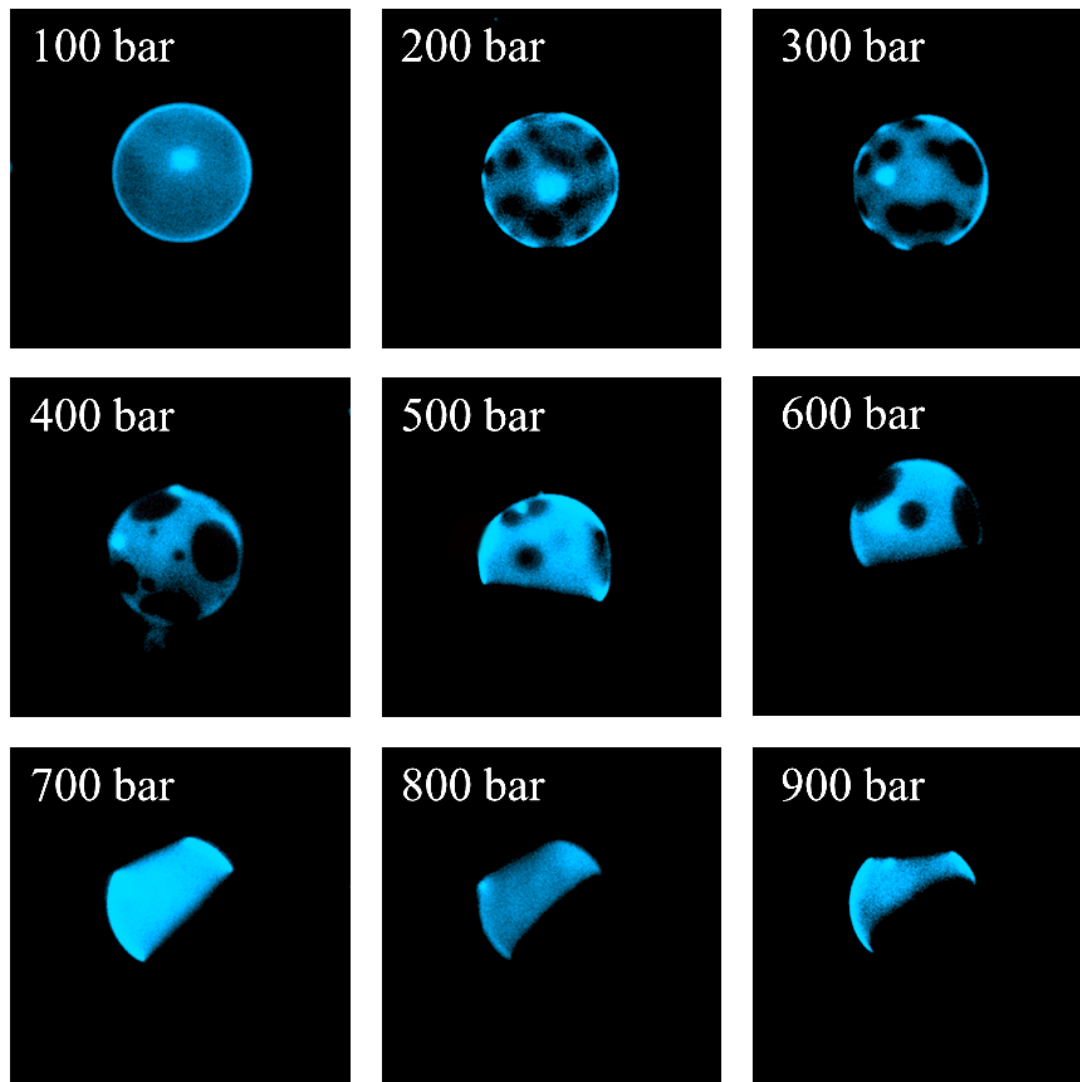


Abb. 7-3: Druckabhängiges Phasenverhalten des 5KS bei $T = 45\text{ °C}$ ¹²

Beispielhafte Aufnahmen des barotropen Phasenseparationsverhaltens des Fünf-Komponenten-*raft*-Systems in 10 mM HEPES bei einer Temperatur von $T = 45\text{ °C}$. Blau: Fluide Domänen, markiert durch N-Rh-DHPE, eingefärbte Graustufenaufnahme.

Die Präparation der Vesikel des heterogenen Fünf-Komponenten-Lipid-Systems erfolgte wie oben beschrieben in dem wässrigen 11,5/8 w% PEG/Dextran Zwei-Phasen-System. Die Verdünnung des Umgebungsmediums mit PEG-reicher Phase erfolgte abweichend zur oben genannten Präparationsvorschrift nach direkter Überführung aus der Präparationszelle in die Messzelle. Dies hat zur Folge, dass die mit dem ATPS gefüllten Vesikel von einer PEG/Dextran Lösung umgeben sind, welche im Mittel eine geringere Dextran-Konzentration als das Innere der Vesikel, jedoch nach Separation des Zwei-Phasen-

¹² Aufnahmen im Rahmen des gemeinsamen Projektes erstellt von M. Manisegar.

Systems Bereiche erhöhter Dextran Konzentration aufweist. Aus diesem Grund schwankt die Intensität der SBA-Alexa-647-Fluoreszenz innerhalb der Probe in Abhängigkeit des betrachteten Bereiches. Hohe Fluoreszenzintensität des SBA-Alexa-647-Fluorophors zeigt somit das Vorliegen des Vesikels in einer dextranreichen Umgebung an. Die so präparierten Vesikel wurden auf eine Temperatur unterhalb der Phasenseparationstemperatur des Zwei-Phasen-Systems abgekühlt und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

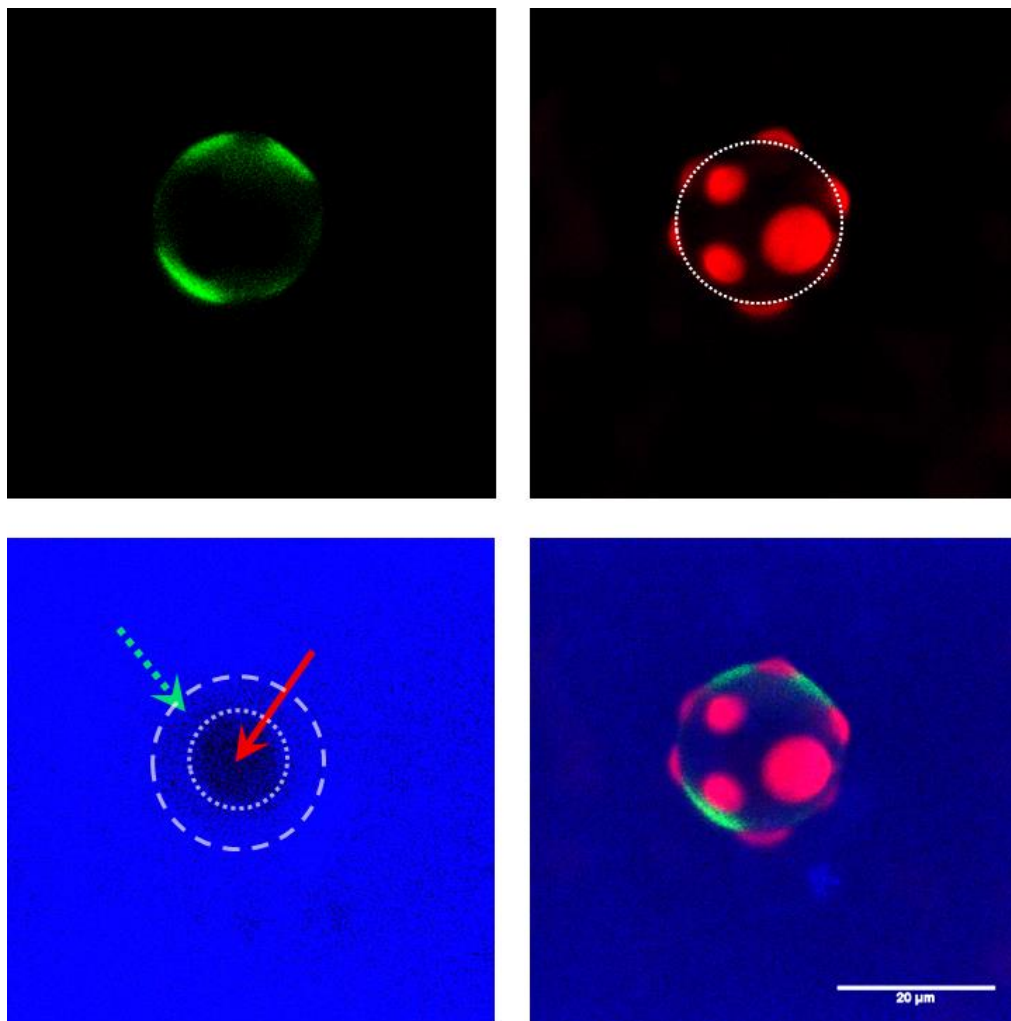


Abb. 7-4: Effekte der PEG/Dextran-Phasenseparation in 5KS Vesikeln in dextranreicher Umgebung

Effekt der Phasenseparation des wässrigen Zwei-Phasen-Systems PEG/Dextran in Vesikeln des heterogenen Fünf-Komponenten-Systems. Grüne Fluoreszenz zeigt jeweils die l_o -Phase, rot die l_d -Phase und blaue Fluoreszenz die durch das SBA-Alexa-647 markierte dextranreiche Phase des Zwei-Phasen-Systems. Die gestichelte weiße Linie visualisiert im l_d -Phase markierten Bild oben rechts die erhöhte Membrankrümmung der l_d -Domänen an. Der grüne, gestrichelte Pfeil markiert unten links die dextranreiche Phase innerhalb des gezeigten Vesikels, wohingegen der rote, durchgehende Pfeil die PEG-reiche Phase innerhalb der vesikulären Struktur anzeigt. Die weißen Linien verdeutlichen die Abgrenzungen des Vesikels gegen die Umgebung sowie der intern separierten Bereiche. Der Maßstabsbalken repräsentiert 20 μm .

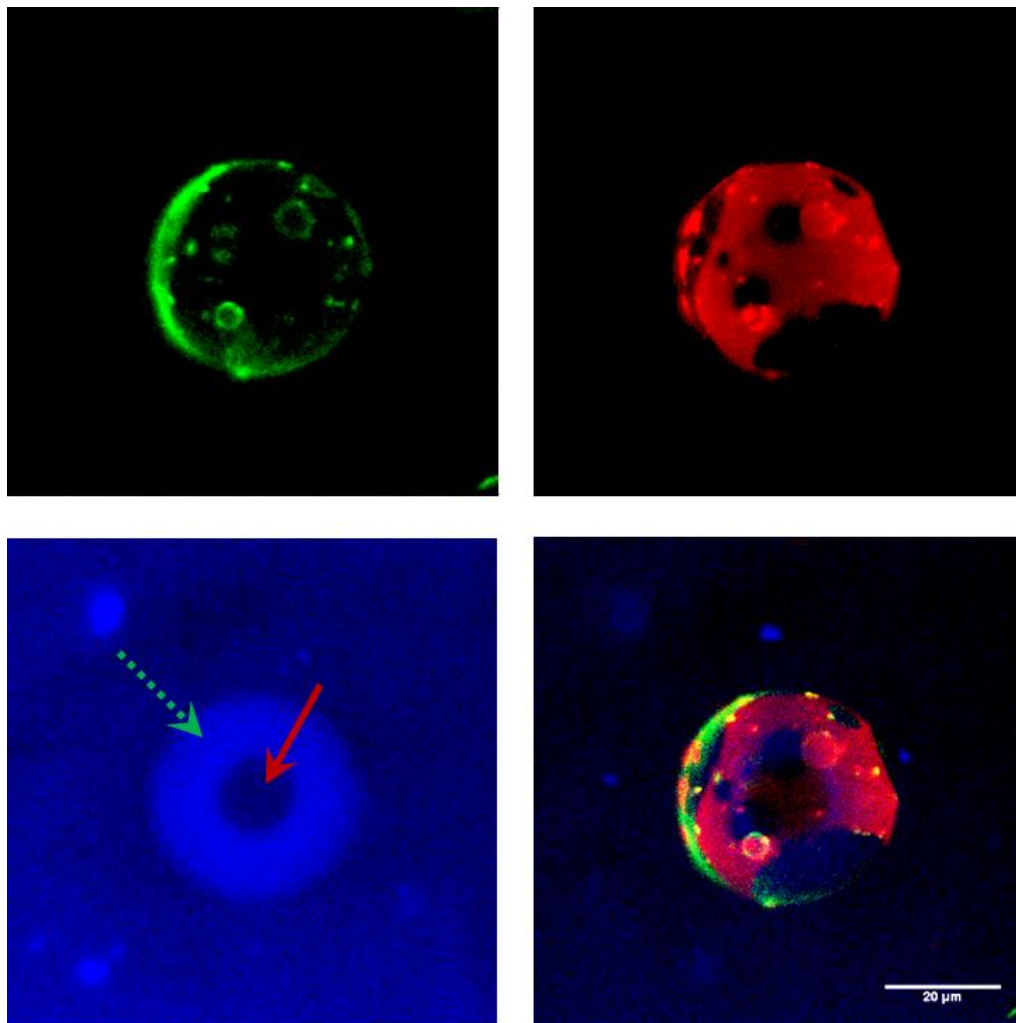


Abb. 7-5: Effekte der PEG/Dextran-Phasenseparation in 5KS Vesikeln in dextranarmer Umgebung

Effekt der Phasenseparation des wässrigen Zwei-Phasen-Systems PEG/Dextran in Vesikeln des heterogenen Fünf-Komponenten-Systems. Grüne Fluoreszenz zeigt jeweils die l_o -Phase, rot die l_d -Phase und blaue Fluoreszenz die durch das SBA-Alexa-647 markierte dextranreiche Phase des Zwei-Phasen-Systems. Der grüne, gestrichelte Pfeil markiert die dextranreiche Phase innerhalb des gezeigten Vesikels, wohingegen der rote, durchgehende Pfeil die PEG-reiche Phase innerhalb der vesikulären Struktur anzeigt. In diesem Fall tritt keine Ausstülpung der l_d -Phase auf. Der Maßstabsbalken repräsentiert 20 μm .

Die Aufnahmen in Abb. 7-4 sowie Abb. 7-5 zeigen exemplarisch die entstandenen Strukturen. Grüne Fluoreszenz markiert hierbei die flüssig-geordnetere l_o -Phase durch den Fluorophor NBD-DHPE, rot die flüssig-ungeordnete l_d -Phase, die durch den Fluorophor *N*-Rh-DHPE markiert ist. Die blaue Fluoreszenz wird durch den an das Glycin Max Lectin (SBA) konjugierten Fluorophor Atto-647 in der dextranreichen Phase hervorgerufen. ^[55] Es kann eine Separation der Phasen des wässrigen Zwei-Phasen-Systems innerhalb der Vesikel beobachtet werden, welche sich durch klar definierte Bereiche höherer und niedriger SBA-Atto-647- und somit Dextran-Konzentration zeigt. Die roten, durchgezogenen

Pfeile des in Abb. 7-4 sowie Abb. 7-5 dargestellten Atto-647 Kanals (blau) markieren die intravesikulären, PEG-reichen Areale nach der Phasenseparation des Systems. Die grünen Pfeile hingegen markieren die durch die höhere SBA-Atto-647-Konzentration markierten, dextranreichen Areale innerhalb des Vesikels.

Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit dem unter anderem von KEATING et al. beobachteten Separationsverhalten dieses Systems in Vesikeln weniger komplexer Membranen. Dort wurde eine intravesikuläre Benetzung der Vesikel-Innenseite bis hin zur Ausknospung der separierten Phasen und resultierender Ausbildung aggregierter, multivesikulärer Strukturen beschrieben. [47,49,55] Die in Abb. 7-4 sowie Abb. 7-5 gezeigten Aufnahmen belegen anhand der erhöhten SBA-Alex-Fluoreszenz in Kontakt mit der Innenseite der Membran eine interne Benetzung dieser mit der dextranreichen Phase. Dies resultiert wahrscheinlich aus unspezifischen Interaktionen des Polymers mit den zum Teil anionischen Kopfgruppen der Lipide, und steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen an homogenen Membransystemen. [47,48,54,173] Im Falle heterogener Membranen ist bekannt, dass die dextranreiche Phase im Vorfeld der Abschnürung kleinerer Vesikel bevorzugt die l_d -Phase der Membran benetzt. [55,174] Dies resultiert voraussichtlich aus einer Kombination von unspezifischen Wechselwirkungen der Polymere mit den Membranlipiden, sowie der höheren Fluidität und der damit einhergehenden Flexibilität dieser Phase. [174] Die l_d -Phase toleriert eine Umschließung des, zu meist, kleineren Volumens an dextranreicher Phase und der damit einhergehenden hohen Membrankrümmung eher als die rigidere l_o -Phase. [174] Da die dextranreiche Phase in den hier beschriebenen Beobachtungen die gesamte Innenseite der Membran, bestehend aus hauptsächlich geordnet vorliegenden l_o -Lipiden, benetzt, steht dies zunächst konträr zu dieser Beobachtung. In Abhängigkeit des Molekulargewichtes des verwendeten Dextrans konnte jedoch bereits bei der in dieser Studie verwendeten Dextranmasse von 10 kDa die Benetzung der innenliegenden Membran mit der dextranreichen Phase beobachtet werden. [49]

Die in Abb. 7-4 gezeigten, durch *N*-Rh-DHPE in rot dargestellten l_d -Domänen zeigen eine deutlich erhöhte Krümmung gegenüber der umgebenden l_o -Membran sowie eine sehr geringe laterale Dynamik auf der Vesikeloberfläche. Dieses Vesikel liegt, verdeutlicht durch die hohe Fluoreszenzintensität des SBA-Atto-647 im blauen Fluoreszenzkanal, in einem Bereich höherer Dextran-Konzentration auf der Außenseite des Vesikels vor. Ein direkter Vergleich mit dem in Abb. 7-5 gezeigten Vesikel zeigt hier eine extravasikulär

geringere Dextran-Konzentration. Das Fehlen ausgestülpter l_d -Phasen an diesem Vesikel legt nahe, dass die Ausknospung der dextranreichen Kompartimente innerhalb des Vesikels durch das Vorliegen höherer Dextran-Konzentrationen auf der Außenseite des Vesikels begünstigt wird. Diese Ausstülpungen lassen sich durch eine Deflation der Vesikel durch osmotische Prozesse entlang dieses Konzentrationsunterschiedes, sowie aus der daraus entstehenden Überschussfläche der Membran erklären. ^[173,174] Durch die Ausbildung der beschriebenen Ausknospungen reduziert sich die hohe Grenzflächenenergie der flüssig-flüssig Grenzflächen des Zwei-Phasen-Systems innerhalb des Vesikels, wodurch der energetisch günstigere, quasisphärische Vesikelhauptkörper zurückbleibt. ^[174] Das Ausblieben der Ausstülpungen am Vesikel in Abb. 7-5 stützt diesen Schluss in Ermangelung der notwendigen, osmotisch begründeten Deflation. Weitere repräsentative Aufnahmen dieses Prozesses sind in Abb. 7-7 dargestellt. Hier zeigen sich deutliche Ausknospungen und die aus der Kompensation dieser Überschussfläche der Membran resultierenden quasisphärischen Vesikelhauptkörper.

Eine detaillierte Analyse der Intensitätsverteilung des dextranmarkierenden Fluorophors innerhalb der in Abb. 7-4 sowie Abb. 7-5 gezeigten Vesikel ist in Abb. 7-6 dargestellt. Die gelben Rechtecke in den Fluoreszenzbildern aus Abb. 7-6 zeigen die Bereiche, in denen die Fluoreszenzintensität erfasst und gemittelt wurde. Es zeigt sich in der oberen Teilabbildung deutlich eine Intensitätsstufe bei einem Distanzwert von 20 μm , welcher auf einen Abfall der SBA-Alexa 647-Konzentration beim Übergang vom dextranreichen Umgebungsmedium in das Vesikel hinweist. Innerhalb des Vesikels ist ein weiterer Intensitätsabfall bei einem Distanzwert von etwa 25 μm sichtbar, welcher die intravesikuläre Trennung zwischen PEG- und dextranreicher Phase anzeigt. Anschließend zeigt sich bei einem Distanzwert zwischen 30 μm und 40 μm ein Anstieg auf die Ausgangsintensität des Umgebungsmediums beim Übergang vom intra- in den extravasikulären Bereich. Die untere Abbildung zeigt entgegen der Auswertung der oberen Abbildung einen deutlichen Anstieg der Fluorophorkonzentration beim Übergang vom dextranarmen, extravasikulären Bereich in das Innere des Vesikels. Innerhalb des Vesikels lässt sich zwischen einem Distanzwert zwischen 50 μm und 60 μm ein deutlicher Abfall dieser Intensität beobachten, welcher die intravesikulär separierte PEG-Phase gegenüber der dextranreichen Phase markiert. Diese Phase ist, wie durch nahezu symmetrische Fluoreszenzintensitätsverteilung zu erkennen ist, vollständig von der dextranreichen Phase umschlossen. Somit ist der

Einbau und die intravesikuläre Separation des wässrigen Zwei-Phasen-Systems in die heterogenen Fünf-Komponenten-Membran-Vesikel als Resultat des Präparationsprotokolls bestätigt.

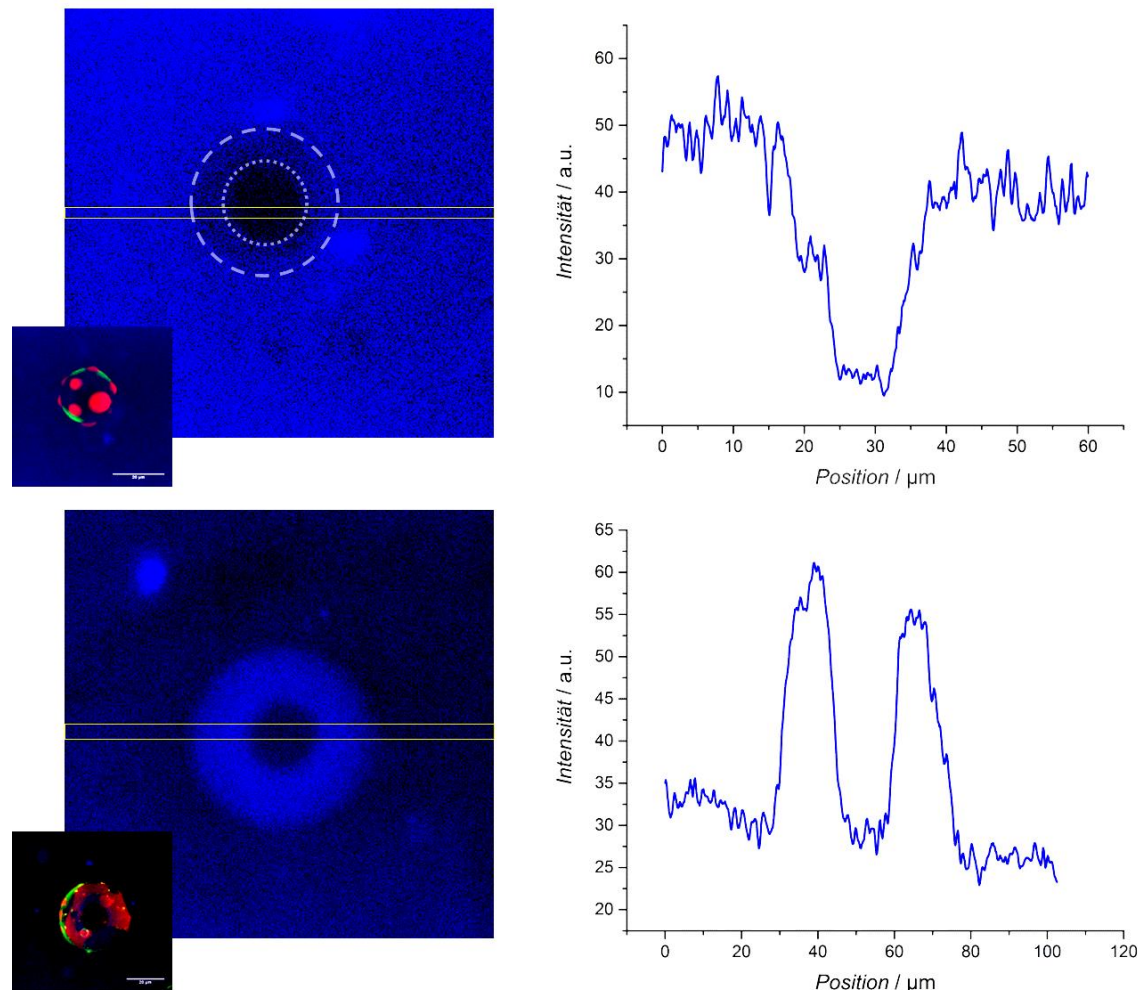


Abb. 7-6: PEG/Dextran-Verteilung innerhalb separierter Vesikel

Phasenseparation des wässrigen Zwei-Phasen-Systems PEG/Dextran in Vesikeln des heterogenen Fünf-Komponenten-Systems aus Abb. 7-4 sowie Abb. 7-5 mit detaillierter Analyse der Intensitätsverteilung des SBA-Atto-647 Fluorophores, welcher die dextranreiche Phase markiert. Die gelben Rechtecke in den Fluoreszenzbildern markieren den Bereich, in dem die Auswertung der Fluoreszenzintensität zur Darstellung der Intensitätsverteilung erfolgte. Die weißen Linien im Fluoreszenzbild der oberen Teilabbildung zeigen die Abgrenzungen der einzelnen Fluoreszenzintensitätsstufen. Oben: Vesikel in Umgebung höherer Dextran-Konzentration als im Vesikel. Unten: Vesikel in Umgebung geringerer Dextran-Konzentration als im Vesikel.

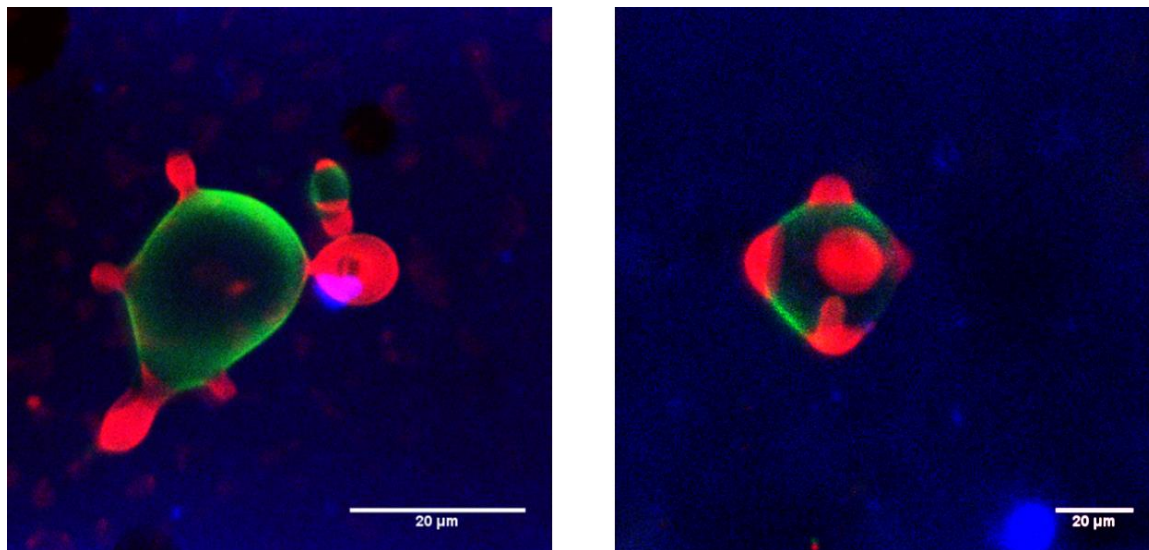


Abb. 7-7: Ausknospung der fluiden Phasen als Resultat der Phasenseparation

Beispielhafte Aufnahmen der aus der Phasenseparation des wässrigen Zwei-Phasen-Systems resultierenden Ausknospungen der l_d -Phase zur Kompensation der Membran-Überschussfläche und der Reduzierung der flüssig-flüssig Grenzflächenenergie des Zwei-Phasen-Systems.

7.4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Charakterisierung des barotropen Phasenverhaltens der betrachteten 10 % anionischen Fünf-Komponenten-*raft*-Membran mittels Hochdruck-Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt. Dieses Membransystem ähnelt in physiologischer Konzentration der anionischen Lipide und in physiologischem Verhalten als *raft*-Membran natürlichen Plasmamembranen. ^[149,150] Zum aktuellen Stand der in diesem Kapitel vorgestellten Studie konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung des hydrostatischen Druckes in Vesikeln komplexer Membranzusammensetzung Phasenübergänge von der flüssigen- in die Gel-Phase induziert. Der hierfür notwendige Phasenübergangsdruck kann bereits durch infinitesimale Änderungen in der Membranzusammensetzung große Unterschiede aufweisen.

Die Präparation der Vesikel des heterogenen *raft*-Systems im wässrigen Zwei-Phasen-System PEG/Dextran unter separierter Fluoreszenzmarkierung der l_o - neben der l_d -Phase, sowie der Markierung der dextranreichen Phase durch das Glycin Max Lectin (SBA) konjugierte Fluorophor Atto-647, zeigt den Einschluss des wässrigen Zwei-Phasen-Systems in die Vesikel. ^[55] Nach erfolgter Separation des PEG/Dextran-Systems innerhalb der Vesikel lassen sich durch Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie deutlich Bereiche höherer und niedriger Atto-647 Konzentration nachweisen, wie es bereits unter anderem

durch KEATING et al. an weniger komplexen Membransystemen gezeigt wurde. [47-50,55] Die Separation des wässrigen Zwei-Phasen-Systems führt zu einer Mikrokompartimentierung der PEG- und dextranreichen Phase innerhalb des Vesikels, sowie zur Benetzung der gesamten innenliegenden Membranseite durch die dextranreiche Phase. Bei Vorliegen des Vesikels in einer Umgebung einer, verglichen mit dem Inneren des Vesikels, höheren Dextran-Konzentration erfolgt die Ausstülpung fluider Domänen hoher Membrankrümmung in das Umgebungsmedium. Dies folgt aus der osmotisch bedingten Deflation des Vesikels in der dextranreichen Umgebung, der so entstehenden Überschussfläche der Membran und der Reduzierung der Grenzflächenenergie der flüssig-flüssig Phasengrenzen des Zwei-Phasen-Systems. [174] Dieser Prozess erfolgt unter Verbleib eines energetisch günstigeren, quasisphärischen Vesikelhauptkörpers, bestehend aus der hauptsächlich flüssig-geordneten l_o -Membran. Dieses Verhalten wurde für einfachere Membransysteme ebenfalls beobachtet. [47,49,55] Diesem Prozess vorgelagert ist wahrscheinlich eine Neusortierung der Lipidkomponenten aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen mit dem Polymer. Vorliegen eines mit dem ATPS gefüllten Vesikels in einer Umgebung mit, verglichen mit dem Inneren des Vesikels, niedrigerer Dextran-Konzentration führt zum Ausbleiben der Ausstülpungen der durch die l_d -Domänen umschlossenen Bereiche.

8 FAZIT

Nachfolgend soll eine Zusammenfassung der wesentlichen Resultate der in dieser Arbeit vorgestellten Forschungsprojekte erfolgen.

I) EINFLUSS VON Y^{3+} AUF MODELLMEMBRANEN

Ziel des Projektes war die Untersuchung des Einflusses des Y^{3+} -Ions auf das thermo- sowie barotrope Phasenverhalten und die Hydratation verschieden komplexer Lipidmembranen unterschiedlicher Ladung. Weiterhin erfolgten die Identifizierung der treibenden Kraft hinter der Interaktion mit dem trivalenten Kation sowie die Analyse des Einflusses auf die laterale Ordnung der untersuchten heterogenen Lipidmembranen.

RESULTATE

- In den untersuchten Membranen wurde ein Anstieg der Gel-zu-flüssig Phasenübergangstemperatur bei Erhöhung der Y^{3+} -Ionenkonzentration nachgewiesen. Dies belegt eine Stabilisierung der Gel-Phase gegenüber steigender Temperatur, und lässt auf einen gesteigerten, lateralen Kompressionsdruck schließen.
- Das barotrope Phasenverhalten der Membranen weist mit zunehmender Y^{3+} -Ionenkonzentration einen geringeren flüssig-zu-Gel Phasenübergangsdruck auf. Dieser Effekt ist im Falle der anionischen Membranen deutlicher ausgeprägt. Dies lässt ebenfalls auf einen gesteigerten, lateralen Kompressionsdruck in der Membran durch den Einfluss des trivalenten Ions schließen.
- Die Hydratation der Lipiddoppelschichten nimmt lediglich im Falle der anionischen, heterogenen Membran bei Steigerung der Y^{3+} -Ionenkonzentration signifikant ab.

- Die Messung des Zeta-Potentials beider Membrantypen unter Einfluss des Y^{3+} -Ions zeigt, dass die zu Grunde liegenden Prozesse über elektrostatische Interaktionen hinausgehen. Ein Anstieg des Zeta-Potentials im Falle der neutralen Membran von 0 mV auf etwa 40 mV bei einer Y^{3+} -Ionenkonzentration von 10,7 mM belegt den Einbau des Fremdions in die Kopfgruppenregion der Membran anstelle einer auf reinen COULOMB-Kräften beruhenden Adsorption. Hier wird als Mechanismus die koordinative Bindung des Ions in der Kopfgruppenregion an die Sauerstoffatome der Phosphatgruppen der Lipide vorgeschlagen.
- Die laterale Ordnung aller untersuchten Membranen wird durch den Einfluss des trivalenten Ions in der Gel-Phase kaum beeinflusst. In der fluiden Phase zeigt sich jedoch eine deutliche Erhöhung des Kettenordnungsparameters der untersuchten Membrantypen.
- Das Phasenseparationsverhalten der heterogenen, *raft*-artigen Membran wird durch die Zugabe des trivalenten Ions auch bei Konzentrationen von 17 mM Y^{3+} nicht beeinflusst und weist keine Unterschiede zur Separation in die l_o - sowie l_d -Phase der reinen Membran auf.

II) MEMBRAN-INTERAKTIONEN UND TRANSFEKTIONSVERMÖGEN IMIDAZOLIUMBASIERTER LIPIDE

In diesem Projekt wurde der Einfluss neuartiger, imidazoliumbasierter Lipide auf die biophysikalischen Eigenschaften von Modellmembranen unterschiedlicher Komplexität und Ladung untersucht. Hierzu wurde der Einfluss dieser Moleküle auf das thermotrope Phasenverhalten neutraler sowie anionischer Membranen, die laterale Ordnung der Lipidsysteme, deren Einbaueffizienz sowie ihr Einfluss auf das Phasenseparationsverhalten und die Morphologie der Vesikel untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss eines zur Induktion von Membranfusion bzw. Transfektion entworfenen Molekül auf die laterale Ordnung der verwendeten Lipidsysteme, die Morphologie der Vesikel, sowie deren Phasenseparationsverhalten und ihr Membranfusionspotential untersucht.

RESULTATE

- Der Einbau der Imidazoliumsalze in die neutrale Modellmembran zeigt, abhängig von der Konzentration und der Kopfgruppengröße der imidazoliumbasierten Lipide, eine Verringerung der Phasenübergangstemperatur. Hierbei ist der Effekt unter Einfluss des Lipids mit der größeren Kopfgruppe, C₁₁IPr, stärker ausgeprägt. Darüber hinaus erfolgt eine Unterdrückung des Phasenvorübergangs in der Membran, was auf eine Störung der Lipidpackung in der Gel-Phase beim Einbau bereits geringer Konzentrationen der Salze hindeutet.
- Die laterale Ordnung aller untersuchten Membransysteme wird durch den Einbau der Imidazoliumsalzderivate sowohl in der Gel- als auch in der fluiden Phase gestört. Hier lässt sich ein deutlicherer Störeffekt durch den Einbau des Moleküls mit der kleineren Kopfgruppe, C₁₁IMe, nachweisen. In der fluiden Phase hingegen erhöht sich die mittlere laterale Ordnung in der Membran durch Einbau des sterisch anspruchsvolleren C₁₁IPr. Dies ist durch eine Clusterbildung effizienter Packung der artifiziellen Lipide in der Membran erklärbar.
- Der Einbau der kationischen imidazoliumbasierten Lipide zeigt in der neutralen Membran eine ausgeprägtere Einbaueffizienz des C₁₁IMe im Vergleich mit dem sterisch anspruchsvolleren C₁₁IPr. Die geringere Einbaueffizienz des C₁₁IPr erklärt sich durch sterische Hinderungen durch die große Kopfgruppe sowie durch Ausbildung und Abschnürung gemischt Mizellarer Strukturen. In den anionischen Modellmembranen kann eine Einbaueffizienz des C₁₁IMe ähnlich der im neutralen System nachgewiesen werden. Der Einbau des C₁₁IPr in das anionische System führt hingegen zur spontanen Aggregation der Vesikel, was auf ein Zeta-Potential nahe Null schließen lässt.
- Der Einbau der artifiziellen Lipide in die Vesikel beeinflusst das Phasenseparationsverhalten sowie die Morphologie der Modellmembranen in hohem Maße. Die Phasenseparationstemperatur der neutralen wie auch der anionischen Modellsysteme wird durch den Einbau beider Moleküle drastisch reduziert, wobei Größe und Form der Vesikel variieren. Einbau des C₁₁IMe in das neutrale Drei-Komponenten-System führt zum Ausbleiben

des Phasenüberganges selbst bei niedrigen Temperaturen sowie zur elliptischen Verformung großer Vesikel. 10 mol% C₁₁IPr verschieben den Phasenübergang der Drei-Komponenten-Vesikel auf Temperaturen von etwa 5 °C und führen zu drastisch verformten, großen Vesikeln neben möglicherweise auch gemischt mizellaren Strukturen. Im anionischen Fünf-Komponenten-System zeigt sich mit steigender Konzentration des C₁₁IME sowie des C₁₁IPr eine Vergrößerung der Vesikel sowie ein Verschieben der Übergangstemperatur zu niedrigeren Temperaturen bis zu ihrem Verschwinden bei 10 mol% C₁₁IME oder C₁₁IPr. Auch das anionische System tendiert unter Einfluss des C₁₁IPr zur Ausbildung gemischt mizellarer, abgekapselter Strukturen.

- Die Untersuchung der Phasenkoexistenz innerhalb der neutralen Drei-Komponenten-Membran auf der Mikrometerskala zeigt die Ausbildung segregierter Bereiche der Imidazoliumsalzderivate durch deren Zusammenlagerung. Im Falle des C₁₁IME zeigt sich im Vergleich zur reinen Membran im AFM-Höhenprofil eine weitere Höhenstufe zwischen der l_d- und der l_o-Phase durch die segregierten C₁₁IME Cluster. Das C₁₁IPr zeichnet sich durch definierte Cluster von bis zu 5 nm Höhe aus. Die Präparation des anionischen Fünf-Komponenten-Systems als planare Lipiddoppelschicht zur AFM-Analyse des Einbaus der Imidazoliumsalzderivate ist aufgrund der Destabilisierung der Membran nicht möglich.
- Das zur Transfektionsinduktion entworfene Molekül in den neutralen Membransystemen hat keinen signifikanten Einfluss auf die laterale Ordnung der Lipide. Lediglich in der fluiden Phase des anionischen *raft*-Systems zeigt sich eine geringfügige Erhöhung der lateralen Ordnung bei 10 mol%-igem Einbau in die Membran.
- Durch den Einbau des Transfektionsmoleküls zeigt sich eine deutliche Steigerung der Zahl der aggregierten Vesikel. Dies deutet auf eine Sortierung der Lipide an den Kontaktflächen benachbarter, kationischer Transfektionsmoleküle in der Membran hin. Auf der Mikrometerebene zeigt sich als Resultat des Einbaus des Transfektionsmoleküls die Ausbildung geringfügig kleinerer l_d-Domänen in der Membran.

- Der Einbau des Transfektionsmoleküls in neutrale Membranen, bestehend aus DPPC und DOPE, zeigt bei Mischung dieser kationischen Vesikel mit Vesikeln des anionischen *raft*-Systems deutliches Fusionspotential. Deutlich wird die Fusion der Vesikel durch Koexistenz der in den initial getrennt voneinander vorliegenden Fluorophore.
- Der divalente Charakter sowie der Anker an der 2-Position des Imidazoliumringes sind für das Fusionspotential des Moleküls nicht ausschlaggebend, da das strukturell vereinfachte, monovalente C₁₅IMe, wahrscheinlich aufgrund deren Clusterbildung in der Membran, Bereiche hoher positiver Ladungsdichte zur Fusionsinduktion ausbildet.

III) EINFLUSS DES WÄSSRIGEN ZWEI-PHASEN-SYSTEMS PEG/DEXTRAN AUF MODELLMEMBRANEN

Ziel dieses Projektes war die Untersuchung des Einflusses des wässrigen Zwei-Phasen-Systems PEG/Dextran als Modellsystem für zytosolische, makromolekulare Kondensate auf die Morphologie und das Phasenseparationsverhalten naturmimetischer, anionischer Modellmembranen. Weiterhin wurde der Einfluss hoher hydrostatischer Drücke auf eine heterogene *raft*-Membran untersucht. Es wurde zunächst das barotrope Phasenseparationsverhalten dieser Membran charakterisiert, um in nächster Instanz mit dem Phasenverhalten der gleichen Membran unter Einfluss des wässrigen Zwei-Phasen-Systems verglichen werden zu können. Zudem wurde der Einfluss des PEG/Dextran-Systems auf die Morphologie sowie das Phasenverhalten der heterogenen *raft*-Membran untersucht.

RESULTATE

- Die Charakterisierung der anionischen *raft*-Membran bei steigendem Druck zeigt den Phasenübergang von Bereichen der Membran von der fluiden- in die Gel-Phase. Dieser wird durch die Komprimierung der Membran durch den erhöhten Druck erreicht, wodurch die verfügbare Fläche pro Lipid in der Membran sinkt und die Alkylketten hauptsächlich in eine

gauche-Konformation überführt werden. Es resultiert eine Membran mit koexistierenden l_d - und l_o -Phasen.

- Die Präparation der Vesikel des heterogenen Lipidsystems in Anwesenheit der Polymere PEG und Dextran zeigt bei fluoreszenzmikroskopischer Auswertung deutlich den Einbau des homogenen Zwei-Phasen-Systems bei Temperaturen oberhalb dessen Separationstemperatur. Weiterhin lässt sich die Separation der Polymerlösungen als Reaktion auf sinkende Temperaturen innerhalb der Vesikel wie in der Volumenphase des Zwei-Phasen-Systems zeigen.
- Die Separation des intravesikulären Zwei-Phasen-Systems führt zur Benetzung der innenliegenden Membranseite mit der dextranreichen Phase des Zwei-Phasen-Systems.
- Durch die innenseitige Benetzung der Fünf-Komponenten-Membran mit der dextranreichen Phase des Zwei-Phasen-Systems kommt es bei Vorliegen des Vesikels in dextranreicher Umgebung zur Ausstülpung fluider Domänen hoher Membrankrümmung. Diesem Prozess vorgelagert ist wahrscheinlich eine Neusortierung der Lipidkomponenten aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen mit dem Polymer. Die Ausstülpung dieser Domänen führt zu einer Reduzierung der flüssig-flüssig Grenzflächenenergie des separierten Zwei-Phasen-Systems und zu einem energetisch günstigeren, quasisphärischen Vesikelhauptkörper. Bei Vorliegen des mit dem ATPS gefüllten Vesikels in dextranarmer Umgebung kann in Ermangelung der für die Deflation der Vesikel notwendigen, osmotischen Einflüsse keine Ausstülpung von l_d -Domänen beobachtet werden.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. Lipowski, E. Sackmann, *Structure and Dynamics of Membranes*, Elsevier Science B.V., Niederlande, **1995**.
- [2] W. Dowhan, *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 199–232.
- [3] S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* **1972**, *175*, 720–731.
- [4] R. Winter, F. Noll, C. Czeslik, *Methoden Der Biophysikalischen Chemie*, Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, **2011**.
- [5] G. van Meer, A. I. P. M. de Kroon, *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 5–8.
- [6] P. R. Cullis, B. De Kruijff, *Biochim. Biophys. Acta - Reviews on Biomembranes* **1979**, *559*, 399–420.
- [7] D. Marsh, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 3884–3899.
- [8] H. Stein, S. Spindler, N. Bonakdar, C. Wang, V. Sandoghdar, *Front. Physiol.* **2017**, *8*:63.
- [9] H.-D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2002**.
- [10] Nelli Erwin, *Biophysikalische Einblicke in Die Wechselwirkungen von Lipidierten Signalproteinen mit Membranen und Regulatorproteinen*, TU Dortmund, **2018**.
- [11] M. B. Sankaram, T. E. Thompson, *Biochemistry* **1990**, *29*, 10676–10684.
- [12] J. H. Ipsen, G. Karlström, O. G. Mouritsen, H. Wennerström, M. J. Zuckermann, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *905*, 162–172.
- [13] A. Kusumi, Y. Sako, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, *8*, 566–574.
- [14] J. A. F. Op den Kamp, *Annu. Rev. Biochem.* **1979**, *48*, 47–71.
- [15] J. N. Israelachvili, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1977**, *469*, 221–225.
- [16] O. G. Mouritsen, M. Bloom, *Biophys. J.* **1984**, *46*, 141–153.
- [17] J. Hjort Ipsen, G. Karlström, O. G. Mouritsen, H. Wennerström, M. J. Zuckermann, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1987**, *905*, 162–172.
- [18] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, *387*, 569–572.
- [19] K. Simons, D. Toomre, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 31–39.
- [20] E. Sezgin, I. Levental, S. Mayor, C. Eggeling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 361–374.
- [21] G. L. Nicolson, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1838*, 1451–1466.
- [22] L. Wasungu, D. Hoekstra, *J. Control. Release* **2006**, *116*, 255–264.
- [23] 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, et al., *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 255–256.
- [24] N.-B. Woods, V. Bottero, M. Schmidt, C. von Kalle, I. M. Verma, *Nature* **2006**, *440*, 1123.

- [25] M. T. Kennedy, E. V. Pozharski, V. A. Rakhmanova, R. C. MacDonald, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1620–1633.
- [26] B. Ruozi, F. Forni, R. Battini, M. A. Vandelli, *J. Drug Target.* **2003**, *11*, 407–414.
- [27] I. Koltover, *Science* **1998**, *281*, 78–81.
- [28] X. Zhou, L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1994**, *1189*, 195–203.
- [29] R. Koynova, B. Tenchov, R. C. MacDonald, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2015**, *1*, 130–138.
- [30] Y. Xu, F. C. Szoka, *Biochemistry* **1996**, *35*, 5616–5623.
- [31] A. Coonrod, F.-Q. Li, M. Horwitz, *Gene Ther.* **1997**, *4*, 1313–1321.
- [32] M. Iqbal, Y. Tao, S. Xie, Y. Zhu, D. Chen, X. Wang, L. Huang, D. Peng, A. Sattar, M. A. B. Shabbir, et al., *Biol. Proced. Online* **2016**, *18*, 18.
- [33] M. van Berlo, K. Ch. A. M. Luyben, L. A. M. van der Wielen, *J. chromatogr., B, Biomed.* **1998**, *711*, 61–68.
- [34] A. L. Grilo, M. R. Aires-Barros, A. M. Azevedo, *Sep. Purif. Rev.* **2016**, *45*, 68–80.
- [35] R. Hatti-Kaul, in *Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols: Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, **2000**, 1–10.
- [36] P. Å. Albertsson, *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *5*, 351–358.
- [37] J. A. Asenjo, B. A. Andrews, *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 8826–8835.
- [38] E. L. V. Harris, S. Angal, *Protein Purification Methods*, IRL Press At Oxford University Press, Oxford, **1989**.
- [39] M. T. Zafarani-Moattar, S. Hamzehzadeh, S. Nasiri, *Biotechnol. Prog.* **2012**, *28*, 146–156.
- [40] 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. Biot.* **2008**, *83*, 143–157.
- [41] B. Perez, L. P. Malpiedi, G. Tubío, B. Nerli, P. de Alcântara Pessôa Filho, *J. Chem. Thermodyn.* **2013**, *56*, 136–143.
- [42] Y.-T. Wu, D.-Q. Lin, Z.-Q. Zhu, *Fluid Phase Equilib.* **1998**, *147*, 25–43.
- [43] A. D. Diamond, J. T. Hsu, *J. Chromatogr. A* **1990**, *513*, 137–143.
- [44] J. N. Baskir, T. A. Hatton, U. W. Suter, *Macromolecules* **1987**, *20*, 1300–1311.
- [45] A. D. Diamond, J. T. Hsu, *Biotechnol. Bioeng.* **1989**, *34*, 1000–1014.
- [46] M. A. Eiteman, J. L. Gainer, in *Chromatographic and Membrane Processes in Biotechnology*, Springer Niederlande, Dordrecht, **1991**, 323–333.
- [47] R. Dimova, R. Lipowsky, *Adv. Mater. Interfaces* **2017**, *4*, 1600451.
- [48] Y. Liu, R. Lipowsky, R. Dimova, *Front. Chem.* **2019**, *7*:213.
- [49] M. S. Long, A.-S. Cans, C. D. Keating, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 756–762.
- [50] M. S. Long, C. D. Jones, M. R. Helfrich, L. K. Mangeney-Slavin, C. D. Keating, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 5920–5925.
- [51] G. Johansson, H. Walter, *Int. Rev. Cytol Suppl.* **1999**, 33–60.
- [52] B. Y. Zaslavsky, *Aqueous Two-Phase Partitioning: Physical Chemistry and Bio-analytical Applications*, CRC Press, New York, **1994**.
- [53] H. Walter, D. E. Brooks, *FEBS Lett.* **1995**, *361*, 135–139.

- [54] M. R. Helfrich, L. K. Mangeney-Slavin, M. S. Long, K. Y. Djoko, C. D. Keating, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13374–13375.
- [55] M. Andes-Koback, C. D. Keating, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9545–9555.
- [56] P. W. Atkins, J. D. Paula, *Physikalische Chemie*, John Wiley & Sons, Weinheim, **2013**.
- [57] C. Czeslik, H. Seemann, R. Winter, *Basiswissen Physikalische Chemie*, Vieweg + Teubner, Wiesbaden, **2010**.
- [58] O. Reis, *Hochdruck-FTIR-Untersuchungen an supramolekularen Lipidaggregaten und Modellmembransystemen*, Shaker, Aachen, **1997**.
- [59] W. F. Hemminger, H. K. Cammenga, *Methoden der Thermischen Analyse*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **1989**.
- [60] G. Höhne, W. F. Hemminger, H.-J. Flammersheim, *Differential Scanning Calorimetry*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2003**.
- [61] S. A. Sanchez, M. A. Tricerri, G. Gunther, E. Gratton, *Laurdan Generalized Polarization: From Cuvette to Microscope*, FORMATEX, Badajoz, Spanien, **2007**.
- [62] T. Wilson, *J. Microsc.* **2011**, *244*, 113–121.
- [63] T. Q. Luong, S. Kapoor, R. Winter, *Chemphyschem* **2015**, *16*, 3555–3571.
- [64] D. H. Bartlett, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1595*, 367–381.
- [65] R. Winter, C. Jeworrek, *Soft Matter* **2009**, *5*, 3157–3173.
- [66] R. Winter, D. Lopes, S. Grudzielanek, K. Vogtt, *J. Non-Equil. Thermody.* **2007**, *32*, 41–97.
- [67] N. L. C. McCarthy, O. Ces, R. V. Law, J. M. Seddon, N. J. Brooks, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 8675–8678.
- [68] K. Lüders, R. O. Pohl, R. W. Pohl, E. Sieker, Eds., *Elektrizitätslehre und Optik*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2010**.
- [69] J. Stetefeld, S. A. McKenna, T. R. Patel, *Biophys. Rev.* **2016**, *8*, 409–427.
- [70] A. M. Baró, R. G. Reifengerger, *Atomic Force Microscopy in Liquid*, Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2012**.
- [71] H. Binder, O. Zschörnig, *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *115*, 39–61.
- [72] H. Hauser, G. G. Shipley, *Biochemistry*, **1984** *23*, 34–41.
- [73] S. Ohki, H. Ohshima, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1985**, *812*, 147–154.
- [74] J. Wilschut, N. Duezguenes, D. Papahadjopoulos, *Biochemistry* **1981**, *20*, 3126–3133.
- [75] D. L. Jones, L. V. Kochian, *FEBS Lett.* **1997**, *400*, 51–57.
- [76] A. D. Petelska, M. Naumowicz, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2017**, *22*, 1187–1195.
- [77] A. D. Petelska, Z. A. Figaszewski, *J. Membr. Biol.* **2013**, *246*, 467–471.
- [78] D. Uhríková, N. Kučerka, J. Teixeira, V. Gordeliy, P. Balgavý, *Chem. Phys. Lipids* **2008**, *155*, 80–89.
- [79] G. Cevc, T. M. Allen, S. L. Neidleman, *Phospholipids Handbook*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, **1993**.
- [80] H. K. Wayment-Steele, Y. Jing, M. J. Swann, L. E. Johnson, B. Agnarsson, S. Svedhem, M. S. Johal, A. Kunze, *Langmuir* **2016**, *32*, 1771–1781.

- [81] K. Jacobson, D. Papahadjopoulos, *Biochemistry* **1975**, *14*, 152–161.
- [82] D. J. Swaine, *Trace Elements in Coal*, Butterworths, London, **1990**.
- [83] James W. Murray, *Global Biogeochemical Cycles*, Academic Press, London, **1992**.
- [84] E. M. Adams, C. B. Casper, H. C. Allen, *J. Colloid Interf. Sci.* **2016**, *478*, 353–364.
- [85] E. M. Adams, D. Verreault, T. Jayarathne, R. E. Cochran, E. A. Stone, H. C. Allen, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 32345–32357.
- [86] J. R. Kallini, A. Gabr, R. Salem, R. J. Lewandowski, *Adv. Ther.* **2016**, *33*, 699–714.
- [87] F. Rösch, H. Herzog, C. Plag, B. Neumaier, U. Braun, H. W. Müller-Gärtner, G. Stöcklin, *Eur. J. Nucl. Med.* **1996**, *23*, 958–966.
- [88] J. J. R. Frausto da Silva, R. J. P. Williams, *The Biological Chemistry of the Elements*, Oxford University Press, Canada, **2001**.
- [89] J. Reuben, *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, Elsevier, **1979**, 515–552.
- [90] A. Melcrová, S. Pokorna, S. Pullanchery, M. Kohagen, P. Jurkiewicz, M. Hof, P. Jungwirth, P. S. Cremer, L. Cwiklik, *Sci. Rep.* **2016**, *6*:38035.
- [91] J. OLIVARD, *Arch. Biochem. Biophys.* **1960**, *88*, 382–383.
- [92] T. Tanaka, Y. Tamba, S. M. Masum, Y. Yamashita, M. Yamazaki, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **2002**, *1564*, 173–182.
- [93] R. Leberman, A. K. Soper, *Nature* **1995**, *378*, 364–366.
- [94] S. Kapoor, A. Werkmüller, C. Denter, Y. Zhai, J. Markgraf, K. Weise, N. Opitz, R. Winter, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **2011**, *1808*, 1187–1195.
- [95] A. J. García-Sáez, S. Chiantia, P. Schwille, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 33537–33544.
- [96] S. L. Veatch, S. L. Keller, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3074–3083.
- [97] H. Träuble, H. Eibl, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1974**, *71*, 214–219.
- [98] X. Han, Y. Tong, W. Huang, E. Wang, *J. of Electroanal. Chem.* **2002**, *523*, 136–141.
- [99] C. K. Haluska, K. A. Riske, V. Marchi-Artzner, J.-M. Lehn, R. Lipowsky, R. Dimova, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 15841–15846.
- [100] K. Bacia, P. Schwille, T. Kurzchalia, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 3272–3277.
- [101] H. A. Lucero, P. W. Robbins, *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *426*, 208–224.
- [102] O. Reis, R. Winter, T. W. Zerda, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes* **1996**, *1279*, 5–16.
- [103] R. Winter, C. Czeslik, *Z. Kristallogr.* **2000**, *215*, 454–474.
- [104] R. F. M. de Almeida, A. Fedorov, M. Prieto, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 2406–2416.
- [105] S. L. Veatch, S. L. Keller, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 268101.
- [106] G. B. Díaz, A. M. Cortizo, M. E. García, J. J. Gagliardino, *Lipids* **1988**, *23*, 1125–1128.

- [107] G. B. Ansell, J. N. Hawthorne, R. M. C. Dawson, *Form and Function of Phospholipids*, Elsevier Scientific Pub. Co., Amsterdam, Niederlande, **1973**.
- [108] M. I. Angelova, S. Soléau, Ph. Méléard, F. Faucon, P. Bothorel, *Trends in Colloid and Interface Science VI*, Steinkopff, **1992**, 127–131.
- [109] S. Janosch, C. Nicolini, B. Ludolph, C. Peters, M. Völkert, T. L. Hazlet, E. Gratton, H. Waldmann, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7496–7503.
- [110] K. Weise, G. Triola, L. Brunsveld, H. Waldmann, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1557–1564.
- [111] M. Pühse, C. Jeworrek, R. Winter, *Chem. Phys. Lipids* **2008**, *152*, 57–63.
- [112] M. Caffrey, *Lipid Thermotropic Phase Transition Database (LIPIDAT). User's Guide Version 1.0*, U.S. Dept. Of Commerce, National Institute Of Standards And Technology, Standard Reference Data Program, Gaithersburg, MD, **1993**.
- [113] A. A. Paladini, G. Weber, *Rev. Sci. Instrum.* **1981**, *52*, 419–427.
- [114] E. Chibowski, A. Szcześ, *Adsorption* **2016**, *22*, 755–765.
- [115] D. Papahadjopoulos, S. Nir, N. Düzgünes, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1990**, *22*, 157–179.
- [116] R. P. Rand, B. Kachar, T. S. Reese, *Biophys. J.* **1985**, *47*, 483–489.
- [117] Z. T. Graber, Z. Shi, T. Baumgart, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, *19*, 15285–15295.
- [118] H. A. Rinia, M. M. E. Snel, J. P. J. M. van der Eerden, B. de Kruijff, *FEBS Lett.* **2001**, *501*, 92–96.
- [119] I. Reviakine, A. Simon, A. Brisson, *Langmuir* **2000**, *16*, 1473–1477.
- [120] S. Ohnishi, T. Ito, *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1973**, *51*, 132–138.
- [121] D. M. Haverstick, M. Glaser, *Cell Biol.* **1987**, *84*, 4475–4479.
- [122] C. G. Sinn, M. Antonietti, R. Dimova, *Colloid. Surface. A* **2006**, *282*, 410–419.
- [123] R. D. Shannon, C. T. Prewitt, *Acta Crystallogr. B* **1969**, *25*, 925–946.
- [124] Z. D. Schultz, I. M. Pazos, F. K. McNeil-Watson, E. N. Lewis, I. W. Levin, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 9932–9941.
- [125] M. N. Hopkinson, C. Richter, M. Schedler, F. Glorius, *Nature* **2014**, *510*, 485–496.
- [126] C. Richter, K. Schaepe, F. Glorius, B. J. Ravoo, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3204–3207.
- [127] F. E. Hahn, M. C. Jahnke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3122–3172.
- [128] T. Dröge, F. Glorius, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6940–6952.
- [129] D. J. Nelson, S. P. Nolan, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6723–6753.
- [130] G. C. Fortman, S. P. Nolan, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5151–5169.
- [131] A. J. Arduengo, R. L. Harlow, M. Kline, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 361–363.
- [132] S. N. Riduan, Y. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 9055–9070.
- [133] C. M. Mahalakshmi, M. Karthick, M. Shanmugam, V. Chidambaranathan, *Der Pharma Chem.*, **2015**, *7*, 14–19.
- [134] C. Samori, D. Malferrari, P. Valbonesi, A. Montecavalli, F. Moretti, P. Galletti, G. Sartor, E. Tagliavini, E. Fabbri, A. Pasteris, *Ecotoxicol.* **2010**, *73*, 1456–1464.
- [135] K. Rawat, H. B. Bohidar, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 11065–11074.

- [136] E. B. Anderson, T. E. Long, *Polymer* **2010**, *51*, 2447–2454.
- [137] 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.
- [138] J. Pernak, K. Sobaszekiewicz, I. Mirska, *Green Chem.* **2003**, *5*, 52–56.
- [139] A. Cornellias, L. Perez, F. Comelles, I. Ribosa, A. Manresa, M. T. Garcia, *J. Colloid Interf. Sci.* **2011**, *355*, 164–171.
- [140] M. Tischer, G. Pradel, K. Ohlsen, U. Holzgrabe, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 22–31.
- [141] D. Demberelnyamba, K.-S. Kim, S. Choi, S.-Y. Park, H. Lee, C.-J. Kim, I.-D. Yoo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *12*, 853–857.
- [142] 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.
- [143] 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.
- [144] D. Wang, C. Richter, A. Rühling, S. Hüwel, F. Glorius, H.-J. Galla, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *467*, 1033–1038.
- [145] P. Drücker, A. Rühling, D. Grill, D. Wang, A. Draeger, V. Gerke, F. Glorius, H.-J. Galla, *Langmuir* **2017**, *33*, 1333–1342.
- [146] 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.
- [147] A. Benedetto, *Biophys Rev* **2017**, *9*, 309–320.
- [148] K. S. Egorova, E. G. Gordeev, V. P. Ananikov, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7132–7189.
- [149] G. B. Díaz, A. M. Cortizo, M. E. García, J. J. Gagliardino, *Lipids* **1988**, *23*, 1125–1128.
- [150] G. B. Ansell, J. N. Hawthorne, R. M. C. Dawson, *Form and Function of Phospholipids*, Amsterdam ; New York : Elsevier Scientific Pub. Co, **1973**.
- [151] S. L. Veatch, S. L. Keller, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3074–3083.
- [152] K. Bacia, P. Schwille, T. Kurzchalia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 3272–3277.
- [153] K. Simons, E. Ikonen, *Nature*, **1997**, *387*, 596–572.
- [154] H. A. Lucero, P. W. Robbins, *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *426*, 208–224.
- [155] 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.
- [156] S. Bornemann, M. Herzog, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 5730–5743.
- [157] D. C. Litzinger, L. Huang, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1113*, 201–227.
- [158] M. Herzog, L. Li, H.-J. Galla, R. Winter, *Colloids Surf. B* **2019**, *173*, 327–334.
- [159] M. Herzog, M. Dwivedi, R. K. Harishchandra, A. Bilstein, H.-J. Galla, R. Winter, *Colloids Surf. B* **2019**, *178*, 404–411.
- [160] S. D. Patil, D. G. Rhodes, D. J. Burgess, *AAPS J.* **2004**, *6*, 13–22.
- [161] D. Wang, C. Richter, A. Rühling, S. Hüwel, F. Glorius, H.-J. Galla, *Biochem. Biophys. Res. Co.* **2015**, *467*, 1033–1038.
- [162] F. M. Menger, K. D. Gabrielson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 2091–2106.

- [163] F. M. Menger, M. I. Angelova, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 789–797.
- [164] T. Oberholzer, P. L. Luisi, *J. Biol. Phys.* **2002**, 733–744.
- [165] M. Manisegaran, S. Bornemann, I. Kiesel, R. Winter, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 18533–18540.
- [166] S. B. Zimmerman, L. D. Murphy, *FEBS Lett.* **1996**, *390*, 245–248.
- [167] H. O. Johansson, D. E. Brooks, C. A. Haynes, *Int. Rev. Cytol.* **2000**, *192*, 155–170.
- [168] S. Cinar, H. Cinar, H. S. Chan, R. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 7347–7354.
- [169] L. M. Dominak, C. D. Keating, *Langmuir* **2007**, *23*, 7148–7154.
- [170] P. H. Yancey, *J. Exp. Biol.* **2005**, *208*, 2819–2830.
- [171] I. Daniel, P. Oger, R. Winter, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 858–875.
- [172] F. Meersman, I. Daniel, D. H. Bartlett, R. Winter, R. Hazael, P. F. McMillan, *Rev. Mineral. Geochem.* **2013**, *75*, 607–648.
- [173] R. Dimova, R. Lipowsky, *Soft Matter* **2012**, *8*, 6409–6415.
- [174] A.-S. Cans, M. Andes-Koback, C. D. Keating, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7400–7406.

10 ANHANG

10.1 Weitere Abbildungen

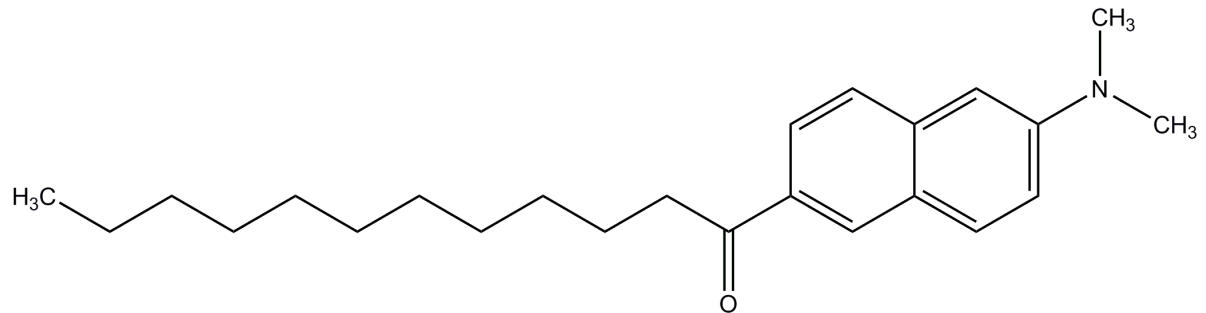


Abb. 10-1: Struktur des verwendeten Fluorophors *Laurdan*

1-(6-(Dimethylamino)-2-naphthyl)-1-dodecanon

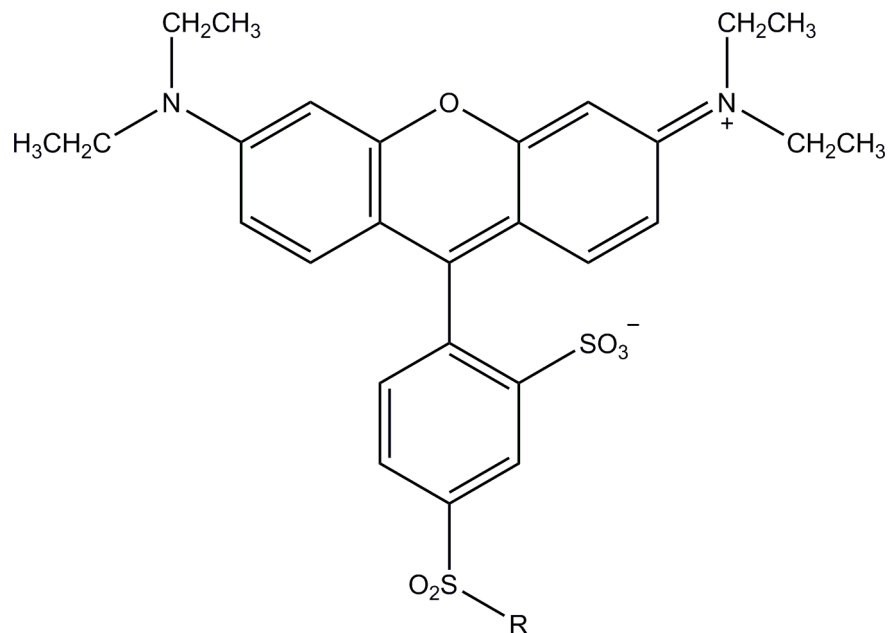


Abb. 10-2: Struktur des verwendeten Fluorophors *Rhodamin*

N-(Lissamin rhodamin B sulfonyl)-R

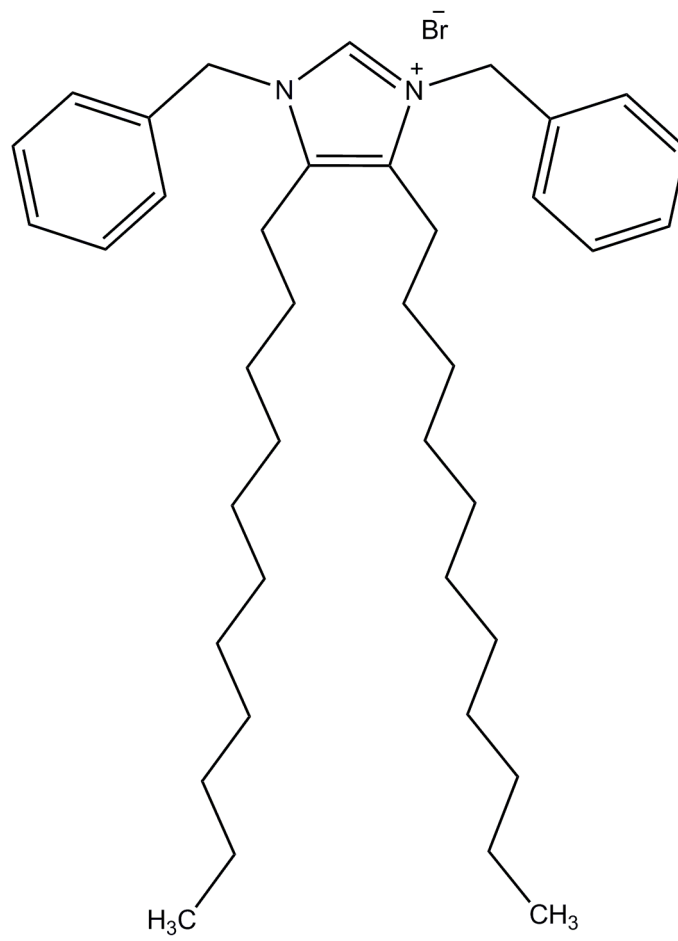


Abb. 10-5: Struktur des C₁₁IBn·HBr

1,3-dibenzyl-4,5-diundecylimidazoliumbromid

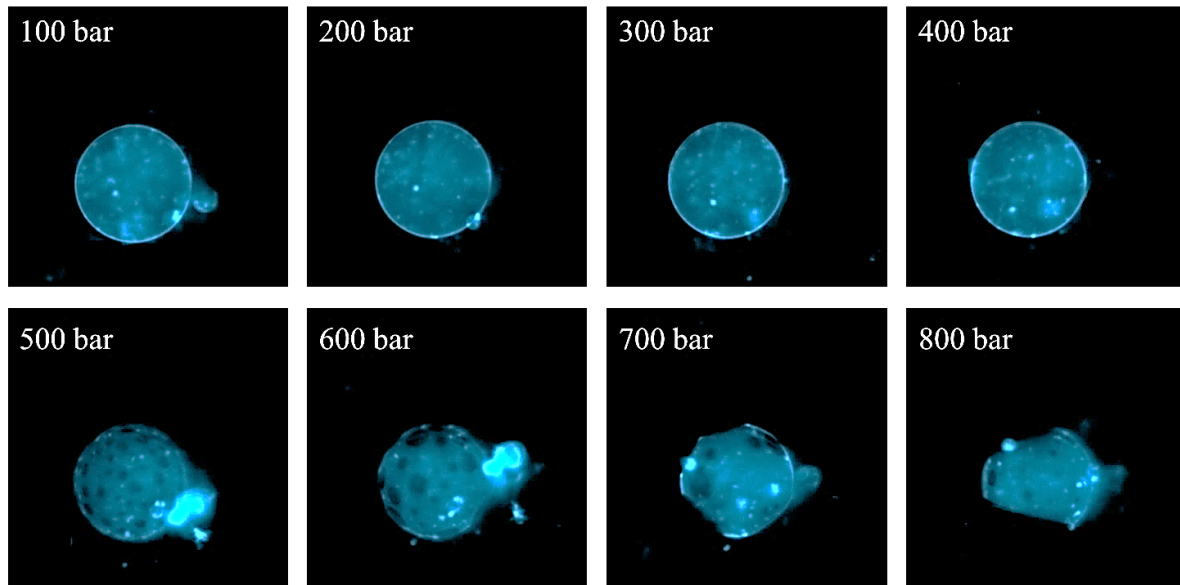


Abb. 10-6: Barotropes Phasenverhalten des 5KS bei $T = 40$ °C Beispiel B)¹³

Zweite beispielhafte Aufnahmen des barotropen Phasenseparationsverhaltens des Fünf-Komponenten-*raft*-Systems in 10 mM HEPES bei einer Temperatur von $T = 40$ °C. Blau: Fluide Domänen, markiert durch N-Rh-DHPE, eingefärbte Graustufenaufnahme.

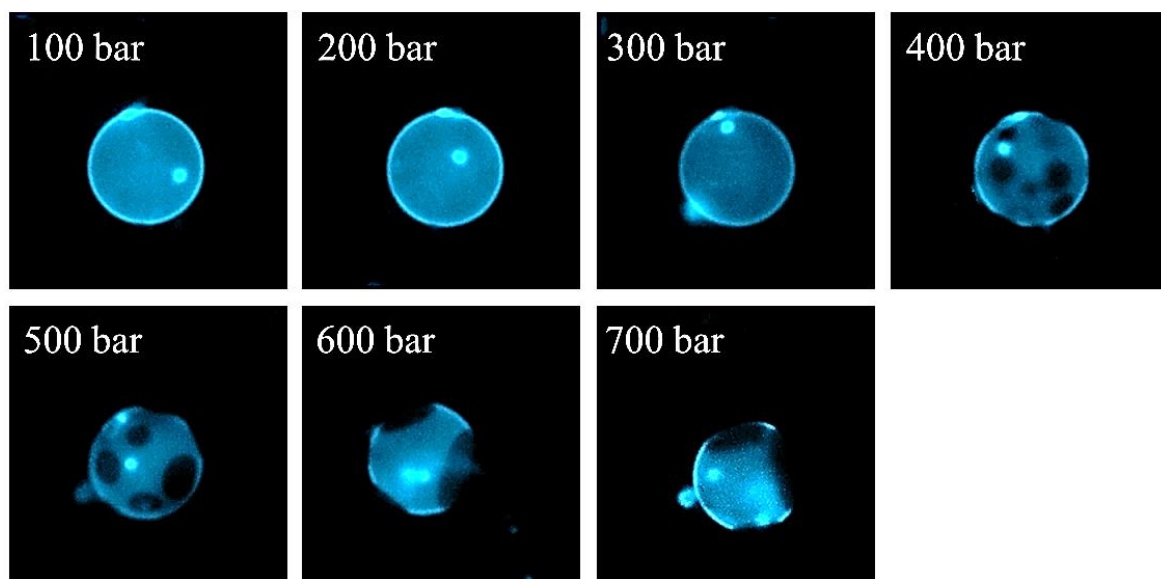


Abb. 10-7: Barotropes Phasenverhalten des 5KS bei $T = 45$ °C Beispiel B)¹⁴

Zweite beispielhafte Aufnahmen des barotropen Phasenseparationsverhaltens des Fünf-Komponenten-*raft*-Systems in 10 mM HEPES bei einer Temperatur von $T = 45$ °C. Blau: Fluide Domänen, markiert durch N-Rh-DHPE, eingefärbte Graustufenaufnahme.

¹³ Aufnahmen im Rahmen des gemeinsamen Projektes erstellt durch M. Manisegaran.

¹⁴ Aufnahmen im Rahmen des gemeinsamen Projektes erstellt durch M. Manisegaran.

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Bornemann, Steffen

147988

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.

Dortmund,
Ort, Datum (Place, date)

Unterschrift (Signature)

Titel der Dissertation (Title of the thesis):

Lipid-Modellmembranen unter dem Einfluss hochvalenter Kationen, lipidierter Imidazoliumsalze und Zwei-Phasen-Systemen.

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.

Dortmund,
Ort, Datum (Place, date)

Unterschrift (Signature)