

---

# **Struktur und Dynamik von Modellbiomembranen unter verschiedenen physikalischen und chemischen Bedingungen**

---

**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

**Simon Kriegler**

Dortmund, Juni 2023





Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2020 bis Juni 2023 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I (Biophysikalische Chemie) der Technischen Universität Dortmund unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Roland Winter angefertigt.

Eingereicht am 21.06.2023

Prüfungskommission:

Erstgutachter: Prof. Dr. R. Winter

Zweitgutachter: Prof. Dr. C. Czeslik

# DANKSAGUNG

---

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihre Unterstützung zur Erstellung dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Zuerst gilt mein herzlichster Dank Herrn **Prof. Dr. Roland Winter** durch welchen mir die Möglichkeit gegeben wurde, diese Arbeit zu erstellen. Die dabei immerwährende Unterstützung sowie die hilfreichen Diskussionen haben einen großen Teil zu dieser Arbeit beigetragen.

Für die Übernahme des Amtes als Zweitgutachter bedanke ich mich bei **Prof. Dr. Claus Czeslik**.

Weiterhin danke ich **Prof. Dr. Glorius, Dr. Tiffany Paulisch, Tristan Wegner** und **Marco Pierau** von der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster sowie **Prof. Dr. Cockell** und **Stewart Gault** von der University of Edinburgh für die erfolgreichen Kooperationen der gemeinsamen Forschungsprojekte.

Des Weiteren danke ich **allen ehemaligen Mitarbeitern** des Lehrstuhls Physikalische Chemie I für die gute Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders bedanke ich mich bei meinem ehemaligen Bürokollegen und Mitarbeitern **Dr. Robert Dec** und **Dr. Marius Herzog** sowie **Dr. Michel W. Jaworek** für die hilfreichen Denkanstöße und nicht-wissenschaftlichen Gespräche während meiner Promotion.

Nicht zuletzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner **Familie** und meinen **Freunden** für ihre uneingeschränkte Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit. **Meinen Eltern** danke ich besonders, da nur durch ihre Motivation und ihr stets gebotener Rückhalt diese Arbeit erst ermöglicht wurde. Aufgrund dessen widme ich ihnen diese Arbeit.



# Publikationen

---

Einige in dieser Arbeit präsentierten Forschungsergebnisse wurden wie folgt publiziert:

- S. Kriegler, M. Herzog, R. Oliva, S. Gault, C. S. Cockell, R. Winter, Structural responses of model biomembranes to Mars-relevant salts, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2021**, *23*, 14212-14223.
- S. Kriegler, T. O. Paulisch, T. Wegner, F. Glorius, R. Winter, Bipolar Imidazolium-Based Lipid Analogues for Artificial Archaeosomes, *Langmuir* **2021**, *37*, 11996-12006.
- J.-M. Knop, S. Mukherjee, M. W. Jaworek, S. Kriegler, M. Manisegaran, Z. Fetahaj, L. Ostermeier, R. Oliva, S. Gault, C. S. Cockell, R. Winter, Life in Multi-Extreme Environments: Brines, Osmotic and Hydrostatic Pressure - A Physicochemical View, *Chem. Rev.* **2022**, *123*, 73-104.
- S. Kriegler, R. Oliva, M. W. Jaworek, R. Winter, High pressure treatment promotes the deteriorating effect of cationic antimicrobial peptides on bacterial membranes, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2023**, *25*, 11185-11191.

Weitere Veröffentlichungen, die während dieser Arbeit entstanden sind:

- R. Oliva, S. Mukherjee, L. Ostermeier, L. A. Pazurek, S. Kriegler, V. Bader, D. Prumbaum, S. Raunser, K. F. Winkelhofer, J. Tatzelt, R. Winter, Remodeling of the Fibrillation Pathway of  $\alpha$ -Synuclein by Interaction with Antimicrobial Peptide LL-III, *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 11845-11851.
- S. Goel, R. Oliva, S. Jeganathan, V. Bader, L. J. Krause, S. Kriegler, I. D. Stender, C. W. Christine, K. Nakamura, J.-E. Hoffmann, R. Winter, J. Tatzelt, K. F. Winkelhofer, Linear ubiquitination induces NEMO phase separation to activate NF- $\kappa$ B signalling, *Life Sci. Alliance*. **2023**, *6*, e202201607.

# Kurzfassung

---

Plasmamembranen umgeben Zellen und deren Organellen, weshalb sie in praktisch jedem Lebewesen vorkommen und wichtige biologische Funktionen übernehmen. Dabei fungieren sie als spezifische Barriere, die die Diffusion von Stoffen in und aus der Zelle regulieren. Biomembranen reagieren empfindlich auf Temperatur- und Druckänderungen sowie auf die Anwesenheit bestimmter Cosolventien. Die Eigenschaften von Membranen hängen auch von ihrer Lipidkomposition ab, sodass durch die Manipulation ihrer Zusammensetzung oder durch Veränderungen der äußeren Einflüsse die Funktionen dieser zellulären Bestandteile verändert werden können. Diese Arbeit beschäftigt sich im Wesentlichen mit den Auswirkungen verschiedener Substanzen auf Modellbiomembranen in Abhängigkeit des Drucks und der Temperatur.

In jüngster Vergangenheit wurde die Existenz von hohen Konzentrationen bestimmter Magnesiumsalze in unterirdischen Seen des Planeten Mars angenommen. Da das Vorhandensein von flüssigem Wasser essentiell für die Entstehung von Leben ist, wurde hier der Effekt dieser Salze unter Hochdruck auf Phospholipidmembranen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das Kation der Salze die Membranen weniger beeinflussen, während anionische Perchlorate die Vesikel deutlich destabilisieren. In Bakterien vorkommende ungesättigte Lipide überstehen diese Einflüsse, sodass prokaryotische Zellmembranen in den Salzlaken unterhalb des Südpols der Marsoberfläche überdauern könnten.

Mittlerweile konnten diverse Spezies sowohl in der Tiefsee als auch in Seen mit hohen Konzentrationen an Osmolyten gefunden werden. Infolgedessen müssen diese Organismen mehrere Adaptionen im Laufe der Evolution durchlaufen haben, um solche hohen hydrostatischen und osmotischen Drücke zu tolerieren. Zur Untersuchung dieser Anpassungen wurden komplexe Modellbiomembranen den entsprechenden Bedingungen ausgesetzt. Dabei reagieren Membranen auf die Erhöhung des hydrostatischen Drucks mit der Bildung von geordneten Lipidphasen zur Verringerung des Volumens. In hypotonischen Lösungen regulieren Lipiddoppelschichten über oszillierende Phasenseparationen mit kurzfristiger Porenbildung die Konzentrationsdifferenz zwischen intra- und extravesikulärem Raum, während sie in hypertonen Medien mithilfe von Änderungen der Vesikeltopologie überdauern.



Antimikrobielle Peptide stellen eine neuartige Art von Antibiotika dar, gegen welche pathogene Keime noch keine Resistenzen entwickelten. Eine weitere Möglichkeit, verderbliche Lebensmittel länger haltbar zu machen, liegt in der Anwendung von Hochdruck zum Abtöten mikrobieller Keime. In dieser Arbeit wurde eine Kombination dieser Maßnahmen auf die Struktur einer bakteriellen Modellmembran untersucht. Das Peptid (P)GKY20 nimmt unter Druck eine helikale Konformation an, welche mit den Lipidkopfgruppen der Membran wechselwirkt. Dies führt zu einer verringerten Hydratation der Lipiddoppelschicht aufgrund der Aggregation des Peptids. Somit unterstützt die Hochdruckbehandlung die antimikrobielle Wirkung des Peptids auf bakterielle Membransysteme.

Lysosomen sind Zellorganellen in Eukaryoten, die gealterte oder defekte Biopolymere innerhalb der Zelle verdauen. Da manche Tumorvarianten diesen Prozess verwenden, um sich der körpereigenen Immunantwort zu entziehen, ist die Inhibierung von Lysosomen ein wichtiges Ziel in der Arzneimittelforschung. Es wurden pseudo-Naturstoffe verwendet, deren Eigenschaft durch lysosomale Membranen zu diffundieren mithilfe eines komplexen Modellmembransystems bestätigt wurde. Aufgrund ihrer leicht basischen Struktur können sie den sauren pH-Wert im Inneren des Zellorganells anheben, sodass die Aktivität der verdauenden Enzyme drastisch sinkt und somit die Funktion des Lysosoms beeinträchtigt wird.

Zuletzt befasst sich diese Arbeit mit dem Einbau von künstlichen Lipiden auf Imidazolbasis in verschiedene Phospholipidmembransysteme zur gezielten Manipulation derer Eigenschaften. Während langkettige und ungesättigte Derivate die Membranfluidität senken, wird sie durch die Interkalation von Imidazolen mit gesättigten Kohlenwasserstoffketten erhöht. Eine weitere Verbindung weist deutliche strukturelle Ähnlichkeiten mit Cholesterin auf, sodass sie wie der Naturstoff in Modellmembranen geordnete Domänen bildet. Aufgrund der Variabilität ihrer Struktur kann die fluoreszierende Cholesterin-ähnliche Verbindung eingesetzt werden, um von diesem Sterol abhängige zelluläre Prozesse *in vivo* zu identifizieren.

# Abstract

---

Plasma membranes surround cells and their organelles, which is why they are found in nearly every organism and are responsible for important biological functions. In fact, they act as specific barriers that regulate the diffusion of substances into and out of the cell. Biomembranes are sensitive to changes in temperature and pressure, as well as to the presence of certain cosolvents. The properties of membranes also depend on their lipid composition, so that manipulating the content of different lipids or changing external influences can adjust the functions of these cellular components. This work is mainly concerned with the effects of different substances on model biomembranes as a function of pressure and temperature.

In recent years, high concentrations of certain magnesium salts have been found in subterranean lakes on the planet Mars. Since the presence of liquid water is essential for the origin of life, the effect of these salts under high pressure on phospholipid membranes was investigated. It was shown that the cation of the salts had less influence on membranes while perchlorates significantly destabilised lipid vesicles. Unsaturated lipids found in bacteria withstand these conditions, supporting the hypothesis that prokaryotic cell membranes may survive in the martian brines.

Meanwhile various species have been found both in deep sea and in lakes with high concentrations of osmolytes. Consequently, these organisms must have undergone several adaptations to tolerate the high hydrostatic and osmotic pressures. To investigate these changes, complex model membranes were exposed to the corresponding conditions. Membranes respond to increasing hydrostatic pressure by forming ordered lipid phases to reduce their volume. In hypotonic solutions, lipid bilayers regulate the concentration difference between the intra- and extraventricular space via oscillating phase separations with short-term pore formation, while they survive in hypertonic media with the help of changes in vesicle topology.

Antimicrobial peptides are a new type of antibiotic to which microbial pathogens have not yet developed resistance. Another way to extend the shelf life of perishable foods is to use high pressure to inhibit microbial germs. In this work, a combination of these methods was used on the structure of a bacterial model membrane to explore structural changes. The peptide (P)GKY20 assumes a helical conformation under pressure, which interacts with the lipid head groups of the membrane. This leads to reduced hydration of the lipid bilayer due to aggregation

of the peptide. Thus, the high-pressure treatment promotes the antimicrobial effect of the peptide on bacterial membrane systems.

Lysosomes are cell organelles in eukaryotes that digest aged or defective biopolymers within the cell. Since some tumour variants use this process to evade the body's immune response, inhibiting lysosomes is an important target in drug discovery. Pseudo-natural products have been used whose ability to diffuse across lysosomal membranes has been confirmed by analysing this process in a complex model membrane system. Due to their slightly basic structure, they can raise the acidic pH inside the cell organelle, therefore decreasing the activity of the digesting enzymes drastically and impairing the function of the lysosome.

Finally, this work includes the incorporation of imidazole-based artificial lipids into various phospholipid membrane systems to specifically manipulate their properties. While long-chain and unsaturated derivatives decrease membrane fluidity, intercalation of imidazoles with saturated hydrocarbon chains increases it. Another compound shows clear structural similarities with cholesterol as well as forming lipid rafts like the natural substance in model membranes. This cholesterol analogue could be used to explore the dynamic visualization of cholesterol-dependent cellular pathways in life cells.



# Inhaltsverzeichnis

---

<b>Publikationen</b> .....	<b>I</b>
<b>Kurzfassung</b> .....	<b>II</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>IV</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>X</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>XII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>- 1 -</b>
1.1 Plasmamembranen.....	- 1 -
1.2 Lipide innerhalb der Plasmamembran.....	- 2 -
1.3 Aggregations- und Phasenverhalten von Lipiden.....	- 3 -
<b>Zielsetzung</b> .....	<b>- 8 -</b>
<b>Einfluss verschiedener Marssalze auf die Struktur von Modellbiomembranen</b> .....	<b>- 11 -</b>
3.1 Einleitung.....	- 11 -
3.2 Materialien und Methoden.....	- 12 -
3.2.1 Materialien.....	- 12 -
3.2.2 Probenpräparation.....	- 13 -
3.2.3 Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC).....	- 14 -
3.2.4 Fluoreszenzspektroskopie.....	- 14 -
3.2.5 Röntgenkleinwinkelstreuung.....	- 15 -
3.2.6 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie.....	- 15 -
3.3 Ergebnisse und Diskussion.....	- 16 -
3.3.1 Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC).....	- 16 -
3.3.2 Fluoreszenzspektroskopie.....	- 18 -
3.3.3 Röntgenkleinwinkelstreuung.....	- 22 -
3.3.4 Fluoreszenzmikroskopie.....	- 25 -
3.4 Zusammenfassung.....	- 28 -

<b>Leben unter extremen Bedingungen in Hinblick auf Biomembransysteme .....</b>	<b>- 31 -</b>
4.1 Einleitung.....	- 31 -
4.2 Materialien und Methoden .....	- 32 -
4.2.1 Materialien.....	- 32 -
4.2.2 Probenpräparation .....	- 33 -
4.2.3 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie.....	- 33 -
4.3 Ergebnisse und Diskussion .....	- 33 -
4.3.1 Hydrostatischer Druck.....	- 33 -
4.3.2 Osmotischer Druck.....	- 35 -
4.4 Zusammenfassung.....	- 39 -
<b>Einfluss eines antimikrobiellen Peptids auf bakterielle Membranen unter Hochdruck .....</b>	<b>- 41 -</b>
5.1 Einleitung.....	- 41 -
5.2 Materialien und Methoden .....	- 43 -
5.2.1 Materialien.....	- 43 -
5.2.2 Probenpräparation .....	- 43 -
5.2.3 FOURIER-Transform Infrarot (FT-IR)-Spektroskopie .....	- 43 -
5.2.4 Cirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie.....	- 45 -
5.2.5 Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC).....	- 45 -
5.2.7 Fluoreszenzspektroskopie.....	- 45 -
5.2.8 Fluoreszenzmikroskopie.....	- 45 -
5.3 Ergebnisse und Diskussion .....	- 46 -
5.3.1 Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC).....	- 46 -
5.3.2 FT-IR-Spektroskopie an Lipiden.....	- 47 -
5.3.3 Fluoreszenzspektroskopie.....	- 50 -
5.3.4 Fluoreszenzmikroskopie.....	- 52 -
5.3.5 Konformationsanalyse des Peptids mittels CD- und FT-IR-Spektroskopie.....	- 52 -
5.4 Zusammenfassung.....	- 55 -
<b>Wirkung von Inducin auf lysosomale Modellmembranen .....</b>	<b>- 56 -</b>
6.1 Einleitung.....	- 56 -
6.2 Materialien und Methoden .....	- 59 -
6.2.1 Materialien.....	- 59 -
6.2.2 Probenpräparation .....	- 59 -
6.2.3 Fluoreszenzspektroskopie.....	- 60 -
6.2.4 Fluoreszenzmikroskopie.....	- 60 -

6.3 Ergebnisse und Diskussion .....	- 60 -
6.3.1 Fluoreszenzspektroskopie.....	- 60 -
6.3.2 Fluoreszenzmikroskopie.....	- 63 -
6.4 Zusammenfassung.....	- 67 -
<b>Einfluss von lipidierten Imidazolen auf Lipidmodellmembranen .....</b>	<b>- 68 -</b>
7.1 Einleitung.....	- 68 -
7.2 Materialien und Methoden .....	- 71 -
7.2.1 Materialien.....	- 71 -
7.2.2 Probenpräparation .....	- 71 -
7.2.3 Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC).....	- 71 -
7.2.4 Fluoreszenzspektroskopie.....	- 72 -
7.2.5 Fluoreszenzmikroskopie.....	- 72 -
7.2.6 Rasterkraftmikroskopie (AFM).....	- 72 -
7.3 Ergebnisse und Diskussion .....	- 73 -
7.3.1 Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC).....	- 73 -
7.3.2 Fluoreszenzspektroskopie.....	- 74 -
7.3.3 Fluoreszenz- & Rasterkraftmikroskopie (AFM) .....	- 76 -
7.4 Zusammenfassung.....	- 79 -
<b>Fazit .....</b>	<b>- 81 -</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>- 84 -</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>- 90 -</b>
Weitere Abbildungen.....	- 90 -

# Abkürzungsverzeichnis

---

## Methoden:

- AFM *Atomic Force Microscopy* (dt. Rasterkraftmikroskopie)
- CD *Cirkulardichroismus* (-Spektroskopie)
- DLS *dynamische Lichtstreuung*
- DSC *Differential Scanning Calorimetry* (dt. Dynamische Differenzscanningkalorimetrie)
- FT-IR *FOURIER-Transform-Infrarot* (-Spektroskopie)
- MD *molecular dynamics* (dt. Molekulardynamik (-Simulationen))
- SAXS *Small Angle X-Ray Scattering* (dt. RÖNTGEN-Kleinwinkelstreuung)

## Chemikalien:

- BImC10 2,2'-(decane-1,10-diyl)bis(1,3-dimethyl-1H-imidazol-3-ium)
- BImN10 1,1'-(decane-1,10-diyl)bis(3-methyl-1H-imidazol-3-ium)
- BImN16 1,1'-(tetradecane-1,14-diyl)bis(3-methyl-1H-imidazol-3-ium)
- BImN32 1,1'-((4E,14E,24E)-triaconta-4,14,24-triene-1,30-diyl)bis(3-methyl-1H-imidazol-3-ium)
- BMP Bis(monoacylglycero)phosphat
- C15 4,5-dipentadecyl-1H-imidazol
- C15M 1,3-dimethyl-4,5-dipentadecyl-1H-imidazol-3-ium
- C15Carboxy 3-(1,3-dimethyl-4,5-dipentadecyl-1H-imidazol-3-ium-2-yl)propanoat
- C17 4,5-di((8Z,11Z)-heptadeca-8,11-dien-1-yl)-1H-imidazol
- C17M 4,5-di((8Z,11Z)-heptadeca-8,11-dien-1-yl)-1,3-dimethyl-1H-imidazol-3-ium
- DOPC 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin
- DOPE 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin
- DOPG 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (Natriumsalz)
- DPPC 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin
- DPPG 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (Natriumsalz)
- HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
- ITO Indium-Zinn-Oxid
- NBD-DHPE Nitrobenzoxadiazoldihexadecanolyphosphatidylethanolamin
- NHC *N*-heterocyclische Carbene
- *N*-Rh-DHPE *N*-Rhodamin-Dihexadecanolyphosphatidylethanolamin



- PVA Polyvinylalkohol
- POPC 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin
- POPE 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin
- POPG 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-rac- glycerol) (Natriumsalz)
- POPI 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoinositol (Ammoniumsalz)

Weitere verwendete Abkürzungen:

- ADE *area difference elasticity*
- cAMP *cationic antimicrobial peptide* (dt. kationisches antimikrobielles Peptid)
- *c* Stoffmengenkonzentration
- *E* Energie
- EFSA europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit
- FSD *FOURIER-self-deconvolution* (dt. FOURIER-Dekonvolution)
- GP Generalisierte Polarisierung
- GUV *giant unilamellar vesicle* (dt. riesige unilamellare Vesikel)
- *H* Enthalpie
- *I* Intensität
- $l_d$  liquid-disordered (dt. flüssig-ungeordnet)
- $l_o$  liquid-ordered (dt. flüssig-geordnet)
- LUV large unilamellar vesicle (dt. große unilamellare Vesikel)
- MLV multilamellare Vesikel
- *p* Druck
- *Q* Streuvektorbetrag
- *r* Radius
- $R_G$  hydrodynamischer Radius (Gyrationsradius)
- *S* Entropie
- $s_o$  *solid-ordered* (dt. fest-geordnet)
- SUV *small unilamellar vesicle* (dt. kleine unilamellare Vesikel)
- *t* Zeit
- *T* Temperatur
- $T_m$  *melting temperature* (dt. Schmelztemperatur)
- *V* Volumen
- $\theta$  Streuwinkel
- $\lambda$  Wellenlänge

# Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1.1.: Darstellung der Struktur von verschiedenen Phospholipiden und bestimmten Kopfgruppen.....	2 -
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Strukturen, welche aus Lipiddoppelschichten gebildet werden können. ....	4 -
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der temperatur- und druckabhängigen Phasen einer Lipiddoppelschicht in wässrigem Medium. ....	5 -
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung von <i>rafts</i> innerhalb einer Lipidmembran am Beispiel einer Aufnahme eines markierten Vesikels unterm Fluoreszenzmikroskop. ....	7 -
Abbildung 3.1: DSC-Thermogramme von DPPC-Vesikeln in Anwesenheit von a) $Mg(ClO_4)_2$ , b) $NaClO_4$ , c) $MgSO_4$ und d) $Na_2SO_4$ in verschiedenen Konzentrationen. ....	17 -
Abbildung 3.2: Temperaturabhängige <i>GP</i> -Werte von DPPC Vesikeln unter Zugabe von 0,5 M $MgSO_4$ , $Na_2SO_4$ und $NaClO_4$ . ....	19 -
Abbildung 3.3: Druckabhängige <i>GP</i> -Werte von DPPC-Vesikeln bei 20 und 45 °C in Puffer und unter Zugabe von 1 M $MgSO_4$ . ....	20 -
Abbildung 3.4: Temperaturabhängigkeit der Anisotropie von DPH in DPPC-Vesikeln in Puffer (schwarz) und unter Zugabe von 0,25 M (grün) und 0,5 M $Mg(ClO_4)_2$ (rot). ....	21 -
Abbildung 3.5: Temperaturabhängige RöntgenstreuKurven multilamellarer Vesikel aus a) 20 Gewichtsprozent DPPC, b) 20 Gewichtsprozent DPPC + 0,5 M $MgSO_4$ , c) 10 Gewichtsprozent DPPC + 0,5 M $Mg(ClO_4)_2$ und d) 20 Gewichts-prozent DPPC + 0,5 M $Mg(ClO_4)_2$ . ....	23 -
Abbildung 3.6: Gitterkonstanten <i>d</i> von DPPC-Vesikeln in Puffer (schwarz) und unter Zugabe von 0,5 M $MgSO_4$ (rot) in Abhängigkeit der Temperatur.....	24 -
Abbildung 3.7: RöntgenstreuKurve von 20 Gewichtsprozent DOPC und DOPE:DOPG in einem molaren Verhältnis von 70:30 bei 20 °C in Puffer und in Anwesenheit von 0,5 M $MgSO_4$ und $Mg(ClO_4)_2$ . ....	25 -
Abbildung 3.8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GUVs bestehend aus DPPC (links) und DOPC (rechts) vor (oben) und nach (unten) der Zugabe von 0,5 M $MgSO_4$ und $Mg(ClO_4)_2$ bei 20 °C. ....	26 -

Abbildung 3.9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GUVs bestehend aus DPPC:DPPG:DOPC:DOPG:Cholesterin (45:5:20:5:25) vor (oben) und nach (unten) der Zugabe von 0,5 M MgSO <sub>4</sub> und Mg(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> bei 20 °C.....	- 27 -
Abbildung 4.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines GUVs aus POPC:SM:Cholesterin (1:1:1) markiert mit 0,5 mol% <i>N</i> -Rh-DHPE a) unter verschiedenen hydrostatischen Drücken und b) auf einer Zeitskala bis zu 5 Minuten unter 800 bar bei 50 °C. ....	- 34 -
Abbildung 4.2: Zeitabhängige fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines GUVs aus POPC:SM:Cholesterin (1:1:1) markiert mit 0,5 mol% <i>N</i> -Rh-DHPE, welches in einer Saccharose-Lösung (1 M) präpariert und dann in reines Wasser gegeben wurde. ....	- 36 -
Abbildung 4.3: Zeitabhängige fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von GUVs aus a) POPC:SM:Cholesterin (1:1:1) oder b) DPPC:DPPG:DOPC:DOPG:Cholesterin (45:5:20:5:25) markiert mit 0,5 mol% <i>N</i> -Rh-DHPE, welche in einer a) MgSO <sub>4</sub> - (0,5 M) oder b) TMAO-Lösung (5 M) präpariert und dann in reines Wasser gegeben wurden.....	- 37 -
Abbildung 4.4: Zeitabhängige fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von GUVs aus POPC:SM:Cholesterin (1:1:1) markiert mit 0,5 mol% <i>N</i> -Rh-DHPE, welche in Wasser präpariert und nachfolgend in eine Saccharose-Lösung (1 M) gegeben wurden.....	- 39 -
Abbildung 5.1: DSC-Thermogramme von POPE:POPG (80:20) Vesikeln in Abwesenheit (schwarz) und Gegenwart des Peptids GK Y20 in einem Verhältnis von 50:1 nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten (rot) und 24 Stunden (blau).....	- 46 -
Abbildung 5.2: Druckabhängige Wellenzahlen der Maxima der verschiedenen CH <sub>2</sub> -Streckschwingungen des Lipidsystems DOPE:DOPG (80:20) in An- und Abwesenheit des Peptids GK Y20 in einem molaren Verhältnis von 50:1.....	- 47 -
Abbildung 5.3: Druckabhängiges FT-IR Spektrum der Carbonyl-Streckschwingung von Vesikeln aus a) DOPE:PG (80:20) und b) unter dem Einfluss von (P)GK Y20 bei einem Lipid zu Peptid Verhältnis von 50:1 bei 25 °C sowie die resultierenden Peakflächen der unhydratisierten und hydratisierten Gruppen c) der reinen Membran und d) nach Zugabe des Peptids. ....	- 49 -
Abbildung 5.4: Schematische Abbildung der Lipidkopfgruppeninteraktion zwischen DOPG und DOPE in Abhängigkeit des Drucks.....	- 50 -
Abbildung 5.5: Druckabhängiger <i>GP</i> -Wert von Laurdan in DOPE:DOPG (80:20) Liposomen unter Zugabe verschiedener Konzentrationen (P)GK Y20 bei 20 °C. ....	- 51 -
Abbildung 5.6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von GUVs bestehend aus DOPE:DOPG (80:20) markiert mit <i>N</i> -Rhodamin-DHPE unter 1 bar (links, Mitte) und 1 kbar	

(rechts) sowie unter dem Einfluss von (P)GKY20 (Mitte, rechts) in einem Lipid zu Peptid Verhältnis von 50:1. ....	- 52 -
Abbildung 5.7: CD-Spektrum des Peptids GKY20 in Puffer (schwarz) und in Anwesenheit von DOPE:DOPG Vesikeln bei einem Lipid zu Peptid Verhältnis von 50:1 (rot). ....	- 53 -
Abbildung 5.8: FT-IR-Analyse der Amid I' Bande des Peptids GKY20 bei Abwesenheit (a) und c)) und Anwesenheit (b) und d)) von DOPE:DOPG (80:20) Vesikeln bei einem Lipid zu Peptid Verhältnis von 50:1. ....	- 54 -
Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Autophagie. ....	- 56 -
Abbildung 6.2: Strukturformeln der Naturstoffe Sinomenin und Indol sowie die verschiedenen getesteten Verbindungen. ....	- 58 -
Abbildung 6.3: <i>GP</i> -Werte von Laurdan in unilamellaren Vesikeln aus POPC:POPG in Abhängigkeit der Substanzkonzentration bei a) pH 5 und b) pH 7,4 sowie Anisotropiewerte von DPH in diesen Vesikeln in Abhängigkeit der Substanzkonzentration bei c) pH 5 und d) pH 7,4 bei 25 °C. ....	- 61 -
Abbildung 6.4: <i>GP</i> -Werte von Laurdan in unilamellaren Vesikeln aus POPC:Cholesterin:SM:POPE:POPI:BMP in Abhängigkeit der Substanzkonzentration bei a) pH 5 und b) pH 7,4 bei 25 °C. ....	- 62 -
Abbildung 6.5: Anisotropiewerte von DPH in unilamellaren Vesikeln aus POPC:Cholesterin:SM:POPE:POPI:BMP in Abhängigkeit der Substanzkonzentration bei a) pH 5 und b) pH 7,4 bei 25 °C. ....	- 63 -
Abbildung 6.6: Fluoreszenzmikroskopiebilder von POPC:POPG (85:15) Vesikeln bei pH 7,4 vor (a) und nach Zugabe der Substanzen 2a (b) und 2b (c) nach bestimmten Zeitpunkten bei 25 °C. ....	- 64 -
Abbildung 6.7: Fluoreszenzmikroskopiebilder von POPC:POPG (85:15) Vesikeln bei pH 7,4 vor und nach Zugabe der Substanzen (a) 1a (b) 1b und (c) Siramesin nach bestimmten Zeitpunkten bei 25 °C. ....	- 65 -
Abbildung 6.8: Fluoreszenzmikroskopiebilder von Vesikeln aus POPC:Cholesterin:SM:POPE:POPI:BMP bei pH 7,4 nach bestimmten Zeitpunkten bei 25 °C. ....	- 66 -
Abbildung 7.1: Strukturformeln von a) DPPC und h) Cholesterin sowie der auf Imidazol basierenden künstlichen Lipide b) C15Carboxy, c) C15, d) C15M, e) C15M-NBD, f) C17, g) C17M, i) Imidazolcholesterin und j) Imidazolcholesterinmethyl-NBD. ....	- 70 -

Abbildung 7.2: DSC-Thermogramme von Vesikeln aus a) DPPC, b) DMPC und c) DPPC + 10 Molprozent Cholesterin in An- und Abwesenheit von 10 Molprozent der eingebauten Imidazolderivate.....- 73 -

Abbildung 7.3: *GP*-Werte von Vesikeln aus a) DPPC, b) DMPC und e) DPPC + 10 Molprozent Cholesterin und Anisotropiewerte von Vesikeln aus c) DPPC, d) DMPC und f) DPPC + 10 Molprozent Cholesterin in der Ab- und Anwesenheit von 10 Molprozent der eingebauten Imidazolderivate in Abhängigkeit der Temperatur. ....- 75 -

Abbildung 7.4: Fluoreszenzmikroskopiebilder des 3-Komponentensystems bestehend aus a) DPPC:DOPC:Cholesterin, b) DPPC:DOPC:Imidazolcholesterin und c) DPPC:DOPC:Imidazolcholesterinmethyl-NBD (2:1:1) markiert mit 0,1 mol% *N*-Rh-DHPE (rot) bei 25 °C.....- 77 -

Abbildung 7.5: AFM-Aufnahme eines 3-Komponentensystems bestehend aus a) DPPC:DOPC:Cholesterin und b) DPPC:DOPC:Imidazolcholesterin (2:1:1) inklusive der passenden Höhenanalyse der Membran. ....- 78 -

Abbildung 7.6: Fluoreszenzmikroskopiebilder a) eines 4-Komponentensystems bestehend aus DPPC:DOPC:Cholesterin:C15M-NBD (40:25:25:10 mol%) bei 25 °C und b), c) eines 3-Komponentensystems bestehend aus POPE:POPG:C15M-NBD (70:20:10 mol%) markiert mit 0,1 mol% *N*-Rh-DHPE (rot) bei 10 °C.....- 79 -

# Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 3.1: Bezugsquellen der Chemikalien für die Untersuchung von Marssalzen auf Biomembranen. ....	- 12 -
Tabelle 4.1: Bezugsquellen der Chemikalien für die Untersuchung Biomembranen unter von extremen Bedingungen.....	- 32 -
Tabelle 5.1: Bezugsquellen der Chemikalien für die Untersuchung eines antimikrobiellen Peptids auf Biomembranen. ....	- 43 -
Tabelle 6.1: Bezugsquellen der Chemikalien für die Untersuchung von Inducin auf Biomembranen. ....	- 59 -
Tabelle 7.1: Bezugsquellen der Chemikalien für die Untersuchung von lipidierten Imidazolen auf Biomembranen. ....	- 71 -

## Einleitung

---

Das Forschungsgebiet der biophysikalischen Chemie umfasst die Bereiche der Biochemie, der physikalischen Chemie und der Biophysik und ist somit in der Lage, interdisziplinäre Probleme zu lösen. Dabei werden essentielle Biopolymere unter verschiedenen Bedingungen mithilfe von physikalischen sowie chemischen Messmethoden untersucht und deren Ergebnisse sowohl unter physikalisch-chemischen als auch biologischen Gesichtspunkten interpretiert.

Diese Form der Grundlagenforschung behandelt im Wesentlichen das Studium von biologisch relevanten Makromolekülen wie Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden sowie deren Wechselwirkungen. Dazu werden biologische Modellsysteme verwendet, welche wesentlich einfacher aufgebaut sind als beispielsweise lebende Zellen, um detaillierte Informationen über die spezifischen Biomoleküle zu erhalten. Diese Arbeit befasst sich mit der Erforschung von Modellbiomembranen zur Simulation von unterschiedlichen Zellmembranen und deren Organellen unter verschiedenen Einflüssen und physikalischen Bedingungen.

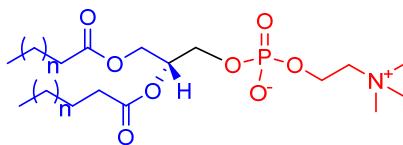
### 1.1 Plasmamembranen

Zellen sind die kleinste lebende Einheit aller Organismen und werden durch Plasmamembranen von ihrer Umgebung abgegrenzt. Mehrere eukaryotische Zellorganellen, wie das Mitochondrium oder auch das Lysosom, sind ebenfalls von solchen Membranen umgeben. Dabei agieren sie als selektive Permeabilitätsbarriere, sodass eine geregelte Diffusion bestimmter Stoffe zwischen dem Zellinnerem mit der Umgebung gewährleistet ist. Biomembranen spielen auch eine wichtige Rolle in der interzellulären Signaltransduktion und der Bildung von neuen Zellverbindungen. Mithilfe der Wechselwirkungen zwischen Zellmembranen und bestimmten Proteinen des Zytoskeletts werden Zellen zudem mechanisch stabilisiert.<sup>[1-5]</sup>

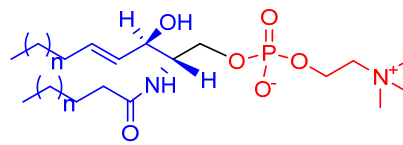
## 1.2 Lipide innerhalb der Plasmamembran

Plasmamembranen bestehen aufgrund ihrer vielfältigen Aufgaben aus mehreren verschiedenen Bestandteilen. Die genaue Verteilung der einzelnen Komponenten einer Membran sind sowohl art- als auch funktionsspezifisch. Dennoch stellen Lipide neben Kohlenhydraten und Proteinen den größten Anteil innerhalb der Membranen dar. Diese Naturstoffe sind aufgrund ihres amphiphilen Charakters essentiell für die Barrierefunktion. Um diese Eigenschaft zu erreichen, bestehen sie aus einer hydrophilen Kopfgruppe und hydrophoben Alkylketten. Die in eukaryotischen Membranen am häufigsten vorkommende Lipidspezies sind die sogenannten Phospholipide, welche sich durch ein mit zwei Fettsäuren sowie einer Phosphatgruppe verestertem Glycerinrückgrat auszeichnen. Eine hohe Varianz der Phospholipide wird durch Modifikation der Kopfgruppenstruktur sowie der Länge und Sättigungsgrad der Alkylketten erreicht. Zusätzlich können durch Änderungen des Rückgrats oder dessen Verknüpfungen weitere Lipidspezies wie Sphingolipide entstehen. (s. Abb. 1.1).<sup>[6-9]</sup>

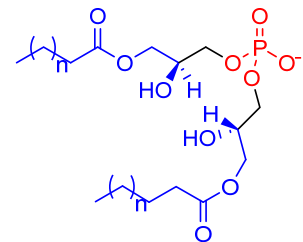
### Phospholipide



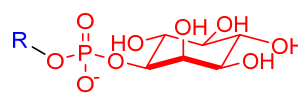
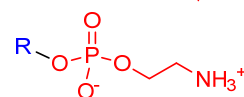
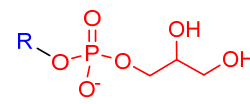
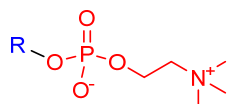
### Sphingomyeline



### BMPs



### Kopfgruppen:



zwitterionisch

anionisch

**Abbildung 1.1.: Darstellung der Struktur von verschiedenen Phospholipiden und bestimmten Kopfgruppen.** Die charakteristischen Hauptbestandteile dieser Lipide sind die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten (blau) und hydrophilen Kopfgruppen (rot).

Aufgrund dieser zahlreichen strukturellen Möglichkeiten bilden eukaryotische Organismen über 1000 verschiedene Lipidspezies, sodass jede biologische Membran ihre funktionellen Eigenschaften über ihre Zusammensetzung erreichen kann. Dadurch bleibt die Erhaltung bestimmter physikalischer Eigenschaften, wie beispielsweise die Fluidität, unter schwankenden äußeren Bedingungen jederzeit möglich. Die Entdeckung dieses Prozesses der sogenannten



homöoviskosen Adaption lieferte wichtige Einblicke für das Verständnis von Organismen, welche unter extremen oder sich ständig variierenden Umweltbedingungen überleben.<sup>[10]</sup>

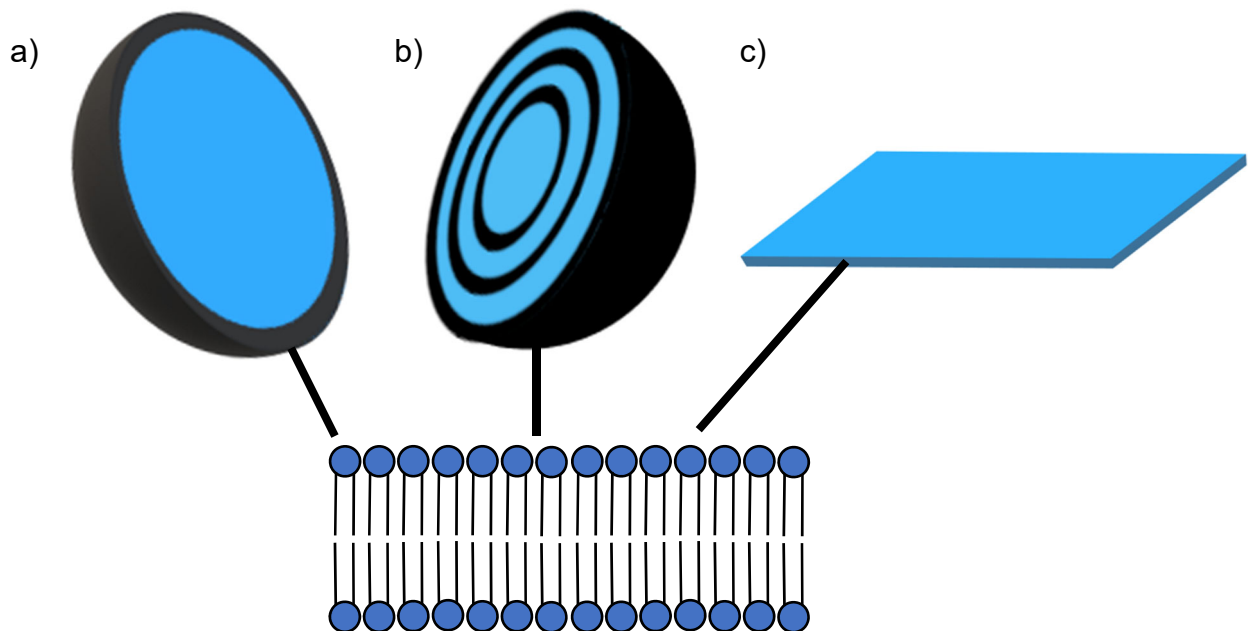
### 1.3 Aggregations- und Phasenverhalten von Lipiden

Die molekulare Struktur der Lipide bedingt ihr spezielles Aggregationsverhalten in wässrigem Milieu. Dabei lagern sich bevorzugt die hydrophoben beziehungsweise hydrophilen Bestandteile der Lipide zusammen, sodass die unpolaren Kohlenwasserstoffketten von Wassermolekülen abgeschirmt und die polaren Kopfgruppen diesen ausgesetzt werden. Auf der Grundlage dieses hydrophoben Effekts entstehen elastische Aggregate aus Lipiden in polaren Lösungsmitteln.<sup>[11]</sup> Das Aussehen dieser supramolekularen Strukturen wird von der optimalen Packung der Lipide bestimmt, welche wiederum von den jeweiligen Kopfgruppen- und Kettenregionen abhängt, da diese für die geometrische Form eines einzelnen Lipids verantwortlich sind. Die bevorzugte Struktur innerhalb des Lipidpolymorphismus kann mithilfe eines kritischen Packungsparameters

$$CPP = \frac{V_m}{A \cdot l} \quad (1.1)$$

vorausgesagt werden, welcher das molekulare Volumen  $V_m$  und die Länge  $l$  der Kohlenwasserstoffkette sowie die Fläche der polaren Kopfgruppe  $A$  einbezieht.<sup>[12,13]</sup> Dieser Parameter ist nicht nur ausschließlich von der Struktur des Lipids abhängig, sondern auch von den vorherrschenden äußeren Bedingungen wie Temperatur, Druck, Ionenstärke und pH-Wert, da diese die Fläche der Kopfgruppe stark verändern können. Während Phosphatidylcholin (PC)-haltige Kopfgruppen einen Packungsparameter von  $\sim 1$  besitzen und somit bevorzugt planare Doppelschichten bilden, führen kleinere Kopfgruppen aus Phosphatidylethanolamin (PE) zu einer Kegelstumpfform des Lipids ( $CPP > 1$ ), welche die Aggregation zu inversen Mizellen bevorzugt.<sup>[12,14]</sup> Diese Aggregate finden sich in nicht-lamellaren Lipidphasen, wie der invers hexagonalen ( $H_{II}$ ) oder den kubischen Phasen ( $Q_{II}$ ), deren Eigenschaften bei biologisch relevanten Vorgängen, wie der Endo- oder Exozytose, benötigt werden, während planare Doppelschichten in Membranen hauptsächlich für die Abgrenzung bestimmter Zellen oder deren Kompartimente verantwortlich sind.<sup>[3,12,14]</sup> Bei einem Wassergehalt von bis zu 30 Gewichtsprozent stapeln sich diese Doppelschichten übereinander. Diese können auf planen Festkörpern deponiert werden, sodass Messungen an der Oberfläche einer Membran beispielsweise mittels Rasterkraftmikroskopie möglich sind. Erhöht sich der Wasseranteil, aggregieren diese Doppelschichten zu multilamellaren Vesikeln (MLVs), dessen Doppelschichten durch polare Lösungsmittel, wie Wasser, voneinander getrennt sind.

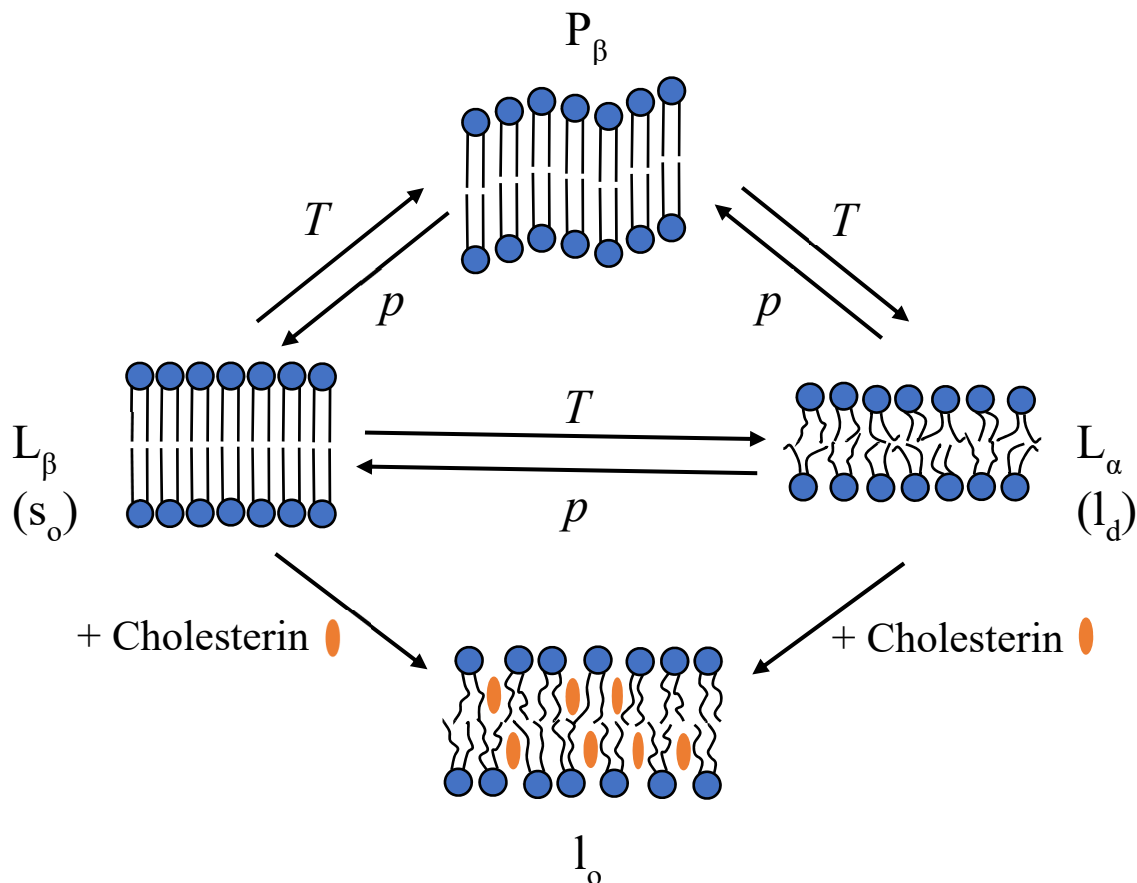
Unilamellare Vesikel, welche aus einer einzigen Doppelschicht bestehen und Größen von 10-50  $\mu\text{m}$  erreichen können, sind somit die beste Näherung einer Zellmembran *in vitro* und ausschließlich in verdünnten Lösungen mit hohem Wasseranteil stabil.<sup>[1]</sup> Die gebildeten Aggregatstrukturen sind in nachfolgender Abbildung 1.2 dargestellt.



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Strukturen, welche aus Lipiddoppelschichten gebildet werden können.**  
a) unilamellares Vesikel, b) multilamellares Vesikel, c) planare Lipiddoppelschicht.

Lipiddoppelschichten weisen unterschiedliche lamellare Phasen auf, die von der Membranzusammensetzung sowie verschiedenen Umweltbedingungen, wie der Temperatur, dem Druck oder auch bestimmten Zusätzen abhängig sind (siehe Abb. 1.3). Dabei kommt es zu einer Änderung der Dynamik und der lamellaren Ordnung der Lipide sowie zu Konformationsänderungen innerhalb der Kohlenwasserstoffketten.<sup>[14]</sup> Phospholipide liegen bei längerer Lagerung unter extrem kalten Temperaturen in der kristallinen  $L_c$ -Phase vor, in welcher sich die Lipide in einem orthorhombischen Gitter befinden. Hierbei kommt es zu praktisch keiner lateralen Diffusion oder Rotation der einzelnen Lipidmoleküle innerhalb der Doppelschicht. Durch Temperaturerhöhung wird die Bildung der gelförmigen  $L_\beta$ -Phase (oder auch  $s_o$ -Phase genannt) induziert. Eine hohe Packungsdichte innerhalb des quasi-hexagonalen Gitters wird durch maximal gestreckte Kohlenwasserstoffketten in *all-trans*-Konformation erzielt. Diese können sich bei entsprechendem Hydratationsgrad bezüglich der Membrannormalen neigen ( $L_\beta'$ ), wenn die Kopfgruppen im Vergleich zu den hydrophoben Ketten einen höheren Platzbedarf aufweisen. Diese Gelphase besitzt eine hohe laterale Ordnung und schränkt somit die laterale Diffusion einzelner Lipidmoleküle innerhalb der Membran stark

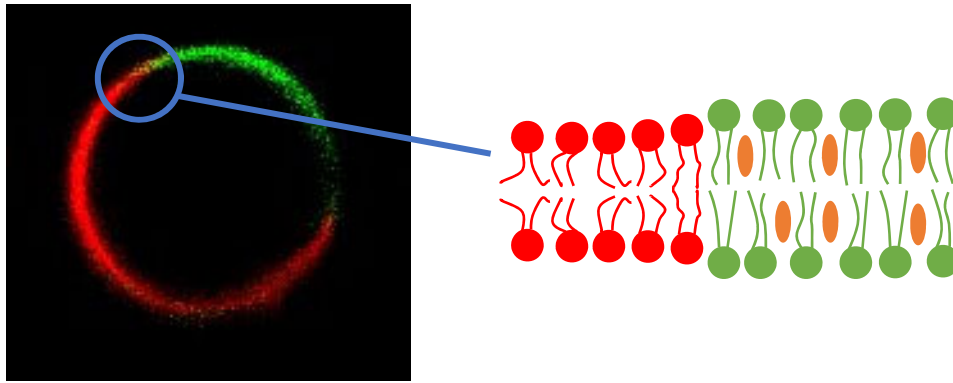
ein. Weitere Temperaturerhöhung führt zur Bildung der gelförmigen  $P_{\beta}$ -Phase, in welcher die Lipidkopfguppen eine periodisch gewellte Überstruktur einnehmen und damit die Schichtdicke der Membran erhöhen. Dieser Prozess wird auch Vorübergang genannt. Erst in der physiologisch relevanten flüssig-kristallinen  $L_{\alpha}$ -Phase (oder auch  $l_d$ -Phase), welche bei weiter steigender Temperatur gebildet wird, erhöht sich die Rotationsfreiheit wie auch die laterale Diffusion der Lipide innerhalb der Doppelschicht deutlich. Dies ist durch die Konformationsänderung der Kohlenwasserstoffketten bedingt, da diese nach dem Hauptphasenübergang von  $L_{\beta}$ - zu  $L_{\alpha}$ -Phase häufiger *gauche*-Konformationen annehmen.<sup>[14]</sup> Aufgrund dieser sperrigeren Konformere reduziert sich die Packungsdichte und damit auch die VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen zwischen den Fettsäuregruppen. Ein Phasenübergang ist ungeachtet dessen energetisch begünstigt, da die erhöhte Anzahl an Rotationsfreiheitsgraden die Konformationsentropie entsprechend erhöht.<sup>[15]</sup>



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der temperatur- und druckabhängigen Phasen einer Lipiddoppelschicht in wässrigem Medium.** Bei niedrigen Temperaturen ist der Ordnungsparameter der Lipiddoppelschicht relativ hoch und die Kohlenwasserstoffketten in einer gestreckten *all-trans*-Konformation. Durch Temperaturerhöhung geht die Lipidmembran von der  $L_{\beta}$ - in die  $P_{\beta}$ -Phase über, wobei eine gewellte Überstruktur ausgebildet wird. Ein weiterer Temperaturanstieg führt zum Übergang in die  $L_{\alpha}$ -Phase in welcher die hydrophoben Ketten vermehrt *gauche*-Konformere einnehmen und somit die laterale Diffusion erhöhen und den Ordnungsparameter verringern. Befindet sich eine hohe Konzentration von Cholesterin innerhalb der Membran wird die Ausbildung einer  $l_o$ -Phase beobachtet, welche sich durch eine relativ hohe laterale Diffusion und einem erhöhten Ordnungsparameter auszeichnet.

In dieser fluiden Phase besitzt die Membran eine erhöhte Fluidität, da die Kopfgruppenregion wegen der verringerten Packungsdichte stark hydratisiert wird. Diese Eigenschaft machen sich alle Organismen zu Nutze, weshalb Zellmembranen *in vivo* hauptsächlich in dieser Phase vorliegen. Die jeweilige Übergangstemperatur hängt auch von der Membranzusammensetzung ab, da beispielsweise kürzere oder ungesättigte Alkylketten weniger VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen ausbilden, die Packungsdichte erhöhen und somit die Hauptphasenübergangstemperatur erniedrigen. Ein weiterer beeinflussender Faktor stellt der vorherrschende Umgebungsdruck dar. Bei steigendem Druck ist nach dem Prinzip von LE CHÂTLIER derjenige Zustand am günstigsten, der insgesamt das geringste Volumen einnimmt. Dies sind besonders die Gelphasen, da deren Packungsdichte aufgrund der Vielzahl an *all-trans*-Konformationen höher und somit deren Volumen kleiner als jenes in der Flüssigphase ist.<sup>[16]</sup> Nach dem Grundsatz der homöoviskosen Adaption sind somit besonders Lipide mit kurzen oder ungesättigten Alkylketten in Plasmamembranen von Lebewesen zu finden, die tiefen Temperaturen oder hohen Drücken ausgesetzt sind.<sup>[10,17]</sup> Eine weitere Komponente, die häufig in eukaryotischen Zellmembranen gefunden werden kann, ist das Sterol Cholesterin.<sup>[7]</sup> Dieser polyzyklische Alkohol erhöht die Rigidität der Lipiddoppelschicht, da Interaktionen zwischen dem starren Steroidgerüst und den hydrophoben Ketten der Lipide die Bildung gestreckter *all-trans*-Konformationen induziert. Der Übergang in die Gelphase wird jedoch behindert, da eine kristalline Packung der Lipide durch den Einbau von Cholesterin gestört wird.<sup>[18,19]</sup> Die Hauptphasenübergangstemperatur wird mit steigender Cholesterinkonzentration zunehmend breiter und es wird eine Phasenkoexistenz innerhalb dieses Bereiches induziert. Dabei liegt die flüssig-geordnete  $l_o$ -Phase (s. Abb. 1.3), in welcher die Lipide ähnliche laterale Diffusionsgeschwindigkeiten und Rotationsfreiheiten wie in der  $l_d$ -Phase erreichen, neben  $l_d$ -Bereichen vor. Der Unterschied dieser beiden Phasen liegt in der Konformation der hydrophoben Ketten. Während in der flüssig geordneten Phase diese meist in *all-trans*-Konformation vorliegen, kommen vermehrt *gauche*-Konformationen in der  $l_d$ -Phase vor.<sup>[20]</sup>

Zurzeit wird in der Wissenschaft die Existenz cholesterinhaltiger *raft*-Domänen in Zellmembranen diskutiert. Experimente *in vitro* belegen, dass sich diese geordneten *lipid-rafts* besonders in Kombination mit gesättigten Phospho- und Sphingolipiden in ansonsten fluiden Membranen bilden.<sup>[20]</sup> In Abbildung 1.4 ist ein phasensepariertes Vesikel, welches mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektiert wurde, gezeigt. Die  $l_d$ -Phase wurde durch einen Fluorophor rot markiert, während ein grüner Fluoreszenzmarker verwendet wurde, um die  $l_o$ -Phase sichtbar zu machen.



**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung von *rafts* innerhalb einer Lipidmembran am Beispiel einer Aufnahme eines markierten Vesikels unterm Fluoreszenzmikroskop. Dabei stellen die roten Bereiche (N-Rhodamin) die  $l_a$ -Phase dar, während die  $l_o$ -Phase mit einem grünen Farbstoff (NBD) markiert wurde. In der  $l_o$ -Phase lassen sich generell mehr gesättigte und längere Phospholipide sowie einen höheren Cholesteringehalt finden.

Eine große Herausforderung ist die Existenz dieser Domänen *in vivo* zu beweisen, da diese Domänen eine kleine Größe sowie eine kurze Lebenszeit aufweisen.<sup>[21]</sup> Weitere Modelle zeigen, dass diese Domänen einen Einfluss auf die Konformation der in der Membran befindlichen Proteine und deren Funktion z.B. bei der Signalweiterleitung haben könnten.<sup>[22,23]</sup>

# Zielsetzung

---

Biomembranen spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Entwicklung von Leben durch ihre essentiellen Eigenschaften, welche praktisch jede Zelle sowie zahlreiche Organellen benötigen. Nur durch diese Trennschichten ist ein selektiver Transport von Enzymen, Wirkstoffen und vielen weiteren Molekülen in den intra- oder extrazellulären Raum möglich. Aufgrund dieser Eigenschaften ist es aktuelles Ziel der Forschung, mithilfe von neu entwickelten Methoden und Theorien, diesen zellulären Grundbaustein bis ins Detail zu verstehen. Die Untersuchung der Interaktion dieser Membranen mit unterschiedlichen natürlichen und synthetischen Stoffen sowie die strukturelle Änderung dieser unter verschiedensten Umweltbedingungen geben wichtige Einblicke in die Erforschung von Anwendungen, wie die Entwicklung von Arzneistoffen, oder auch des Verständnisses von möglichem Leben außerhalb irdischer Bedingungen. Ein weiteres aktuelles Forschungsthema liegt in der gezielten Modifikation der Biomembranen zur Modulation biologischer Prozesse.

In dieser Arbeit werden daher unter den vorherig genannten Gesichtspunkten folgende Projekte vorgestellt:

(I) EINFLUSS VERSCHIEDENER MARSSALZE AUF DIE STRUKTUR VON MODELLBIOMEMBRANEN

Durch die Hinweise auf das Vorhandensein von unterirdischen Seen auf dem Planeten Mars ist es von großem astrobiologischem Interesse, mögliches Leben auf dem Nachbarn der Erde zu untersuchen. Diese Salzlaken weisen einen auffällig hohen Anteil an bestimmten Magnesiumsalzen auf, deren Einfluss auf zelluläres Leben in Kombination mit dem gesteigerten Umgebungsdruck noch völlig unerforscht ist. In diesem Projekt wurde die Stabilität und Struktur verschiedener Modellmembranen daher unter diesen extremen Umweltbedingungen untersucht.

(II) LEBEN UNTER EXTREMEN BEDINGUNGEN IN HINBLICK AUF BIOMEMBRANSYSTEME

Während die Anpassung an hohe Umgebungsdrücke besonders für Tiefseeorganismen eine entscheidende Rolle spielt, kommen hohe Konzentrationen an Salzen und Osmolyten in bestimmten Seen vor, welche als Lebensraum von halophilen Organismen genutzt werden. Daher ist die Erforschung der Adaption von Organismen unter diesen Umweltbedingungen von großer Relevanz. In diesem Projekt wird der Einfluss von hohem hydrostatischem Druck im Vergleich zu hohem osmotischem Druck auf komplexe Modellbiomembranen untersucht.

(III) EINFLUSS EINES ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDS AUF BAKTERIELLE MEMBRANEN UNTER HOCHDRUCK

Mikrobielle Keime sind eine immer wachsende Herausforderung für die Lebensmittelverarbeitung. Um dieses Problem zu überwinden, ohne die Nährwerte der Nahrungsmittel zu verändern, wird aktuell an neuen Methoden geforscht. Bisherige Anwendungen finden sich in der Verwendung von antimikrobiellen Peptiden (engl. *antimicrobial peptides*, kurz AMP) oder auch in der kurzfristigen Erhöhung des Umgebungsdrucks, um bestimmte Lebensmittel länger haltbarer zu machen. Dieser Teil der Arbeit befasst sich mit der Kombination aus diesen beiden Methoden, um möglichst viele verschiedene mikrobielle Keime abzuschwächen. Dazu wurden die strukturellen Änderungen eines AMPs auf einer bakteriellen Modellmembran unter Hochdruck analysiert.

(IV) WIRKUNG VON INDUCIN AUF LYSOSOMALE MODELLMEMBRANEN

Ein wichtiges eukaryotisches Zellorganell stellt das sogenannte Lysosom dar. Diese speziellen Vesikel haben die Funktion, verschiedene Biopolymere zu umschließen und zu verdauen, um Beschädigungen oder Fehlfunktionen der Zelle durch diese zu vermeiden. Aufgrund dessen sind Lysosomen an der Verhinderung von mehreren Krankheiten, wie beispielsweise der Bildung von Tumoren, von großer Relevanz und damit von großem Interesse im Arzneimitteldesign. In diesem Projekt wird eine lysosomale Membran modelliert und die Wirkung verschiedener Substanzen, welche den Prozess der Autophagie in Zellen induzieren, auf diese untersucht.

(V) EINFLUSS VON LIPIDIERTEN IMIDAZOLEN AUF LIPIDMODELLMEMBRANEN

Die Herstellung von Lipidanaloga erlaubt das Studium und die Manipulation lipidabhängiger Prozesse in lebenden Zellen. Viele dieser Verbindungen basieren auf dem Strukturmotiv der *N*-Heterocyclischen Carbene (NHC). Während sich bereits mehrere Studien mit geladenen Imidazoliumsalzen befassten, werden in diesem Projekt verschiedene neutral geladene Lipidmimetika in Modellmembranen eingebaut und deren Einfluss auf die biophysikalischen Eigenschaften der Phospholipid-doppelschichten untersucht.



# Einfluss verschiedener Marssalze auf die Struktur von Modellbiomembranen

---

Die folgenden Ergebnisse sind bereits in Physical Chemistry Chemical Physics 23 (2021), 14212-14233 veröffentlicht.

### 3.1 Einleitung

In den letzten Jahren wurden vermehrt Organismen gefunden, welche unter extremen Umweltbedingungen überdauern können. Diese Organismen werden als Extremophile bezeichnet.<sup>[24]</sup> Die vorherrschenden physikalischen und chemischen Parameter wie Temperatur, Druck und pH-Wert weichen dabei enorm von bereits bekannten Lebensräumen ab.<sup>[24-26]</sup> Beispielsweise können sich halophile (gr. salzliebende) Mikroorganismen selbst unter Salzkonzentrationen bis zu 35 % vermehren, während piezophile (gr. druckliebende) Lebewesen in der Tiefsee Drücke bis zu 1000 bar tolerieren.<sup>[24,27]</sup> Dabei sind in allen drei Domänen des Lebens, welche aus Bakterien (Prokaryoten), Eukaryoten und Archaeen bestehen, piezophile Organismen zu finden, die an hohe hydrostatische Drücke adaptiert sind.<sup>[27]</sup> Diese Drücke herrschen nicht nur unter Wasser, sondern auch im Inneren eines Planeten. Auf der Erde befinden sich in diesem Bereich 50-87 % aller Mikroorganismen.<sup>[28,29]</sup> Damit Leben auf einem Planeten entstehen kann, wird das Vorhandensein von flüssigem Wasser angenommen. Neuste Erkenntnisse zeigen, dass es dieses sowohl auf der Oberfläche des Mars gab als auch dass unter der Oberfläche mögliche Seen entstehen konnten.<sup>[30-32]</sup> Diese befinden sich in einer Tiefe von bis zu 10 km und sind somit Drücken von bis zu 1000 bar ausgesetzt, wie Lebewesen in der irdischen Tiefsee.<sup>[33]</sup> In diesen subterranean Gebieten sind besonders hohe Salzkonzentrationen zu finden. Auf dem Mars sind dabei das magnesiumhaltige Perchlorat ( $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ) und Sulfat ( $\text{MgSO}_4$ ) häufig anzutreffen.<sup>[34,35]</sup> Während Sulfate auf der Erde ebenfalls vermehrt unter dessen Oberfläche vorkommen, sind Perchlorate nur selten und in speziellen Habitaten zu finden.<sup>[24,32]</sup> Diese Perchlorate stören als chaotrope Salze Wasserstoffbrückenbindungen und können somit die Struktur und Funktion von Biomolekülen beeinträchtigen.<sup>[36]</sup> Allerdings bilden diese Salze in Wasser auch ein sogenanntes Eutektikum und verringern dessen Schmelzpunkt auf bis zu  $-70\text{ }^\circ\text{C}$ , was das Vorhandensein von flüssigem Wasser auf dem Mars

ermöglicht. Zur Einschätzung möglichen Lebens unter diesen extremen außerirdischen Bedingungen und dessen Entstehung können verschiedene biologisch-relevante Makromoleküle unter diesen speziellen physikalischen und chemischen Parametern studiert werden.<sup>[32]</sup> Bisher konnte gezeigt werden, dass Enzyme, wie  $\alpha$ -Chymotrypsin, unter dem Einfluss von Magnesiumperchlorat verringerte Aktivitäten aufweisen, während die Zugabe von Magnesiumsulfat einen gegenteiligen Effekt bedingt.<sup>[35,37]</sup> Durch die Applikation von Druck konnte die Aktivität des Enzyms selbst bei Anwesenheit von Magnesiumperchlorat gesteigert werden, wodurch diese Bedingungen bewohnbarer scheinen als zuvor angenommen.<sup>[37]</sup> Aufgrund dessen ist die Untersuchung von Lipidmembranen unter diesen Bedingungen von besonderem Interesse und Ziel dieses Projekts, da diese Biomoleküle ebenso wie Proteine essentiell für zelluläres Leben sind.

## 3.2 Materialien und Methoden

### 3.2.1 Materialien

Die für dieses Projekt verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Bezugsquellen der Chemikalien für die Untersuchung von Marssalzen auf Biomembranen.

<b>Chemikalien</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Chloroform	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Cholesterin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DOPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DOPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPH	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DPPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
HEPES	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Laurdan	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Mg(ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Thermo Fischer (Kandel, Deutschland)
MgSO <sub>4</sub>	Abcr (Karlsruhe, Deutschland)
NBD-DHPE	Molecular Probes (Invitrogen, USA)
N-Rh-DHPE	Molecular Probes (Invitrogen, USA)

### 3.2.2 Probenpräparation

Die unterschiedlichen Lipidmischungen wurden aus Stammlösungen mit einer Konzentration von  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  vermischt. Die entsprechenden Magnesiumsalze und Fluorophore wurden ebenfalls zu dieser Mischung hinzugegeben. Danach wurde das Lösemittel mittels eines Stroms aus Stickstoff verdampft und der übrige Feststoff mittels eines Lyophilisators mindestens 2 h im Vakuum getrocknet. Daraufhin wurde der Lipidfilm mit einem 10 mM HEPES Puffer bei einem physiologischem pH-Wert von 7,4 aufgenommen. In einem Ultraschallbad, welches über die Phasenübergangstemperatur der entsprechenden Lipidmischung erhitzt wurde, wurden die Proben für 20 Minuten mit Ultraschallwellen behandelt. Anschließend wurden die Lösungen fünfmal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut, um eine möglichst homogene Verteilung an Vesikeln zu erreichen. Die somit entstandenen multilamellaren Vesikel wurden für die DSC-, Fluoreszenzspektroskopie- und Röntgenkleinwinkelstreuungsexperimente sowie für die Messung der dynamischen Lichtstreuung verwendet. Für jede Messung wurden mindestens zwei Proben pro Lipidsystem angesetzt.

Um für die Mikroskopie detektierbare große unilamellare Vesikel (GUVs) herzustellen, wurde die Elektroformationsmethode verwendet.<sup>[38]</sup> Dabei wurden  $100 \mu\text{L}$  einer Lipidlösung mit einer Konzentration von  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  mit Fluorophoren versetzt, sodass 0,1 Molprozent aller Lipide fluoreszent markiert waren. Bei der Präparation durch Elektroformation wurden  $20 \mu\text{L}$  dieser Lösung auf ein Indium-Zinn bedampftes Deckglas (ITO-Coverslip) gegeben und mithilfe eines Spin-Coaters bei 800 Umdrehungen pro Minute für eine Minute beschichtet. Dieser wurde daraufhin für mindestens 2 h im Vakuum getrocknet. In einer RC-21B Formationskammer (Warner Instruments, Hamden, USA) wurde der Lipidfilm mit 10 mM HEPES Puffer hydratisiert und mithilfe eines Funktionsgenerators TG315 der Firma Thurlby Thandar Instruments, Huntingdon, UK, einem elektrischen Feld, welches über ein 6 mm schmales Kupferklebeband (3M, Neuss, Deutschland) auf den Objektträger übertragen wurde, ausgesetzt. Dabei wurde für DPPC und das 5-Komponentensystem eine Frequenz von 500 Hz und eine steigende Spannung von 0,14 V für 5 Minuten, 1,25 V für 20 Minuten und schließlich 3,5 V für 90 Minuten bei  $75 \text{ }^\circ\text{C}$  gewählt. Für die Präparation von DOPC wurde dieselbe Frequenz mit 0,1 V für 10 Minuten, 1 V für 20 Minuten und 1,6 V für 150 Minuten bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  verwendet.

### 3.2.3 Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC)

Die Lösungen aus multilamellaren Vesikeln wurden für die DSC-Messungen mit einem Q20 Differential Scanning Calorimeter der Firma TA Instruments aus New Castle, USA, vermessen. Dabei wurden 20 µL dieser Lösungen mit einer Konzentration von 10 Gewichtsprozent Lipid in die entsprechenden Tiegel (*Tzero pans*) überführt und mit den passenden Deckeln (*Tzero hermetic lids*, beide ebenfalls von TA instruments) hermetisch verschlossen. Als Referenz wurden 20 µL des verwendeten 10 mM HEPES Puffers in die Referenzzelle gefüllt. Die Heizrate nach einem 5-minütigem Äquilibrierzeitraum betrug 1 °C min<sup>-1</sup>.

### 3.2.4 Fluoreszenzspektroskopie

Zur Messung der Intensität der Fluoreszenzemission wurde ein K2 *multifrequency phase modulation fluorometer* der Firma ISS Inc. aus Champaign, USA, verwendet. Der gemessene Temperaturbereich von 5 bis 75 °C wurde mithilfe eines Wasserbades erreicht, während eine speziell angefertigte Druckzelle die Messung bei Drücken von 1 bis 2000 bar bei 25 °C sowie 45 °C ermöglichte. Die Lipidkonzentration betrug 1 mg mL<sup>-1</sup>. Vor der Präparation wurde eine entsprechende Menge Fluorophor (Laurdan oder DPH) zur Lipidlösung hinzugegeben, um ein Verhältnis von 0,000735 mol Fluorophor pro mol Lipid zu erhalten. Die mit dem Fluorophor Laurdan markierten Proben wurden bei einer Wellenlänge von 390 nm angeregt, während die Emission zwischen 410 und 500 nm detektiert wurde. Eine Quantifizierung der Veränderungen der Spektren kann durch die Berechnung des *GP*-Wertes (*generalized polarisation*) durchgeführt werden. Dieser enthält Informationen über die laterale Ordnung und die Fluidität der Modellmembran und lässt sich mit folgender Formel berechnen:<sup>[39]</sup>

$$GP = \frac{I_B - I_R}{I_B + I_R} \quad (3.1)$$

Dabei entspricht  $I_B$  der Fluoreszenzintensität bei 440 nm und  $I_R$  der Fluoreszenzintensität bei 490 nm. Bei zunehmender Fluidität der Membran gelangen mehr Wassermoleküle in die Nähe des interkalierten Farbstoffs, dessen Emissionsmaximum abhängig von der Polarität seiner Umgebung ist. Demnach gibt ein hoher *GP*-Wert eine hohe laterale Ordnung der Membran an, während ein niedriger *GP*-Wert eine erhöhte Fluidität der Lipiddoppelschicht anzeigt.

Die Emission des bei einer Wellenlänge von 350 nm angeregten Fluorophors DPH wurde zwischen 380 und 480 nm aufgenommen. Die Anisotropie  $r$  wurde bei dem Emissionsmaximum von 420 nm bestimmt, um Aussagen über die Rotationsdynamiken der Kohlenwasserstoffketten treffen zu können. Der Wert der Anisotropie sinkt bei steigenden

Rotationsmöglichkeiten innerhalb der Ketten, während hohe Anisotropiewerte für geringe Bewegungen innerhalb des hydrophoben Teils der Membran stehen. Diese Werte werden aus den Intensitäten verschieden polarisierten Lichts ermittelt:<sup>[40]</sup>

$$r = \frac{I_{vv} - G \cdot I_{vh}}{I_{vv} + 2 \cdot G \cdot I_{vh}} \quad (3.2)$$

Die Subskripte „v“ und „h“ geben die vertikale und horizontale Position des Anregungs- und Emissionspolarisators an, sodass  $I_{vv}$  für die Intensität des parallelen Lichtes und  $I_{vh}$  für die Intensität des senkrecht polarisierten Lichtes bei jeweils vertikaler Anregung steht. Der geräteabhängige Korrekturfaktor  $G$  wird vor jeder Messung bestimmt und ist definiert als das Verhältnis der Intensitäten von horizontaler Intensität zu vertikaler Intensität bei horizontal polarisierter Anregung:

$$G = \frac{I_{hv}}{I_{hh}} \quad (3.3)$$

Für jedes Experiment wurde die Photonenzählung über den Zeitraum von einer Sekunde pro Wellenlänge gemittelt.

### 3.2.5 Röntgenkleinwinkelstreuung

Ein SAXSess  $mc^2$  der Firma Anton-Paar aus Graz, Österreich mit der dazugehörigen *TCS Control Unit* zur Temperaturreglung wurde für die Röntgenkleinwinkelstreuungsmessungen verwendet. Die Röntgenstrahlung wurde mithilfe einer aus Kupfer bestehenden Röntgenröhre erzeugt und in eine Quarz-Kapillare ( $\mu$ -cell, Anton-Paar) geleitet. In diese wurden 10  $\mu$ L einer Lösung aus multilamellaren Vesikeln mit einer Lipidkonzentration von 10 Gewichtsprozent gefüllt. Die Messung wurde in einer evakuierten Kammer durchgeführt, um Streuungseffekte der Luft zu reduzieren. Dabei wurden als Detektoren sogenannte *imaging plates* verwendet, welche 30 Minuten lang den Röntgenstrahlen ausgesetzt waren. DPPC-haltige Proben wurden in einem Temperaturbereich von 20 bis 60 °C vermessen, während für die Systeme DOPC und DOPE:DOPG (70:30) die Temperatur konstant bei 20 °C gehalten wurde.

### 3.2.6 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

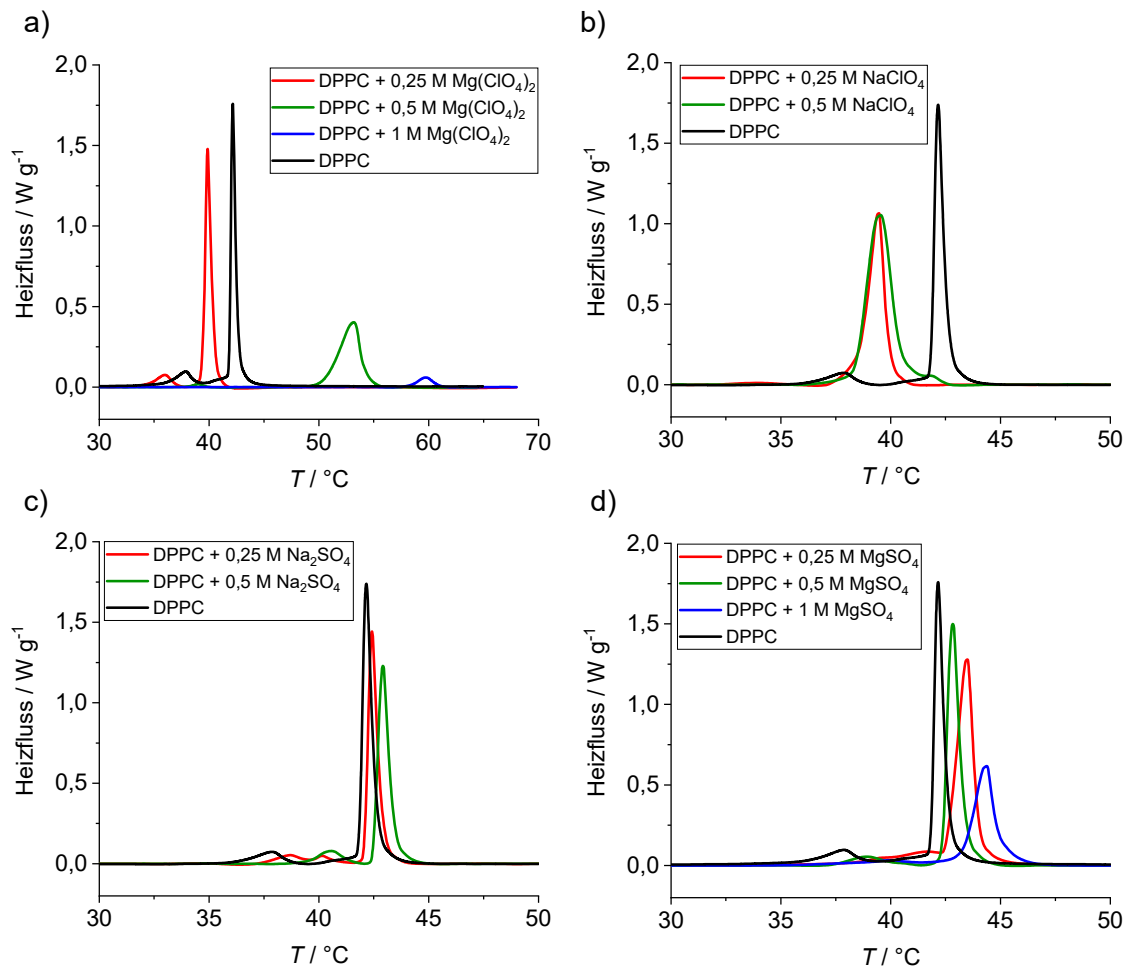
Für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde ein konfokales Laser Scanning Mikroskop Biorad MRC 1024 der Firma Zeiss aus Werdohl in Deutschland, welches mit einem invertierten Nikon Eclipse TE-300 Mikroskop verbunden war, verwendet. Ein *laser combiner* L4Cc-CSB-130 von Oxxius Simply Light (Lannion, Frankreich) oder eine Andor iXon Ultra

Kamera des Unternehmens Acal BFi aus Dietzenbach in Deutschland in Kombination mit einer 100 Watt Quecksilber Lampe von Nikon aus Tokio, Japan, wurden zur Detektion der Fluoreszenzmission bei einer Anregung von 488 nm und 561 nm genutzt. Als Objektiv wurde ein CFI Plan Apochromat Lambda mit einer 100-fachen Vergrößerung und einer numerischen Apparatur von 1,45 ebenfalls von Nikon gewählt. Die 0,25 und 0,5 molaren Salzlösungen wurden nach der Vesikelpräparation über ein Schlauchsystem in die Präparationszelle geleitet.

### **3.3 Ergebnisse und Diskussion**

#### **3.3.1 Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC)**

Um mehr darüber zu erfahren, wie sich die thermodynamischen Eigenschaften und Phasenübergänge von Lipid-Doppelschichtmembranen verändern, wenn sie mit Salzen in Kontakt kommen, die auch auf dem Mars vorkommen, wurden zuerst Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC)-Messungen durchgeführt. Als bereits charakterisiertes Modellmembransystem wurden multilamellare Vesikel aus dem Lipid DPPC verwendet. Dieses Phospholipid besteht aus zwei gesättigten Kohlenwasserstoffketten aus jeweils 16 Kohlenstoffatomen, welche an eine Phosphatidylcholin-Kopfgruppe gebunden sind. In Abbildung 3.1 sind die Thermogramme von DPPC-Vesikeln unter dem Einfluss der Salze  $Mg(ClO_4)_2$ ,  $NaClO_4$ ,  $MgSO_4$  und  $Na_2SO_4$  in verschiedenen Konzentrationen gezeigt.



**Abbildung 3.1:** DSC-Thermogramme von DPPC-Vesikeln in Anwesenheit von a)  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ , b)  $\text{NaClO}_4$ , c)  $\text{MgSO}_4$  und d)  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in verschiedenen Konzentrationen. Die Löslichkeitsgrenze der Salze liegt bei  $\sim 1$  M. Zum Vergleich ist in jedem Diagramm DPPC in reinem Puffer (schwarz) gezeigt.

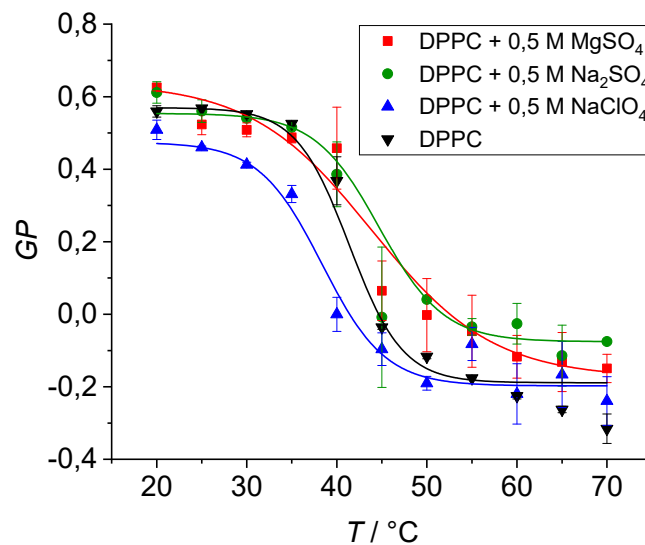
Das DSC-Thermogramm der Membran aus DPPC in reinem Puffer zeigt einen Vorübergang von der  $L_{\beta'}$ - zur  $P_{\beta'}$ -Phase bei einer Temperatur von  $36,0 \pm 0,5$  °C und einen Hauptphasenübergang von der  $L_{\beta'}$ -Phase zur fluiden  $L_{\alpha}$ -Phase bei  $41,6 \pm 0,5$  °C, welche mit entsprechenden Literaturwerten übereinstimmen.<sup>[41,42]</sup> In Abbildung 3.1 a) ist erkennbar, dass die Zugabe von 0,25 M Magnesiumperchlorat zu einer Verringerung der Hauptphasenübergangstemperatur um 2 °C führt, was auf einen destabilisierenden Effekt auf die geordnete Gelphase zurückzuführen ist. Bei höheren Salzkonzentrationen ist dieser charakteristische Peak nicht mehr zu erkennen und die Bildung eines neuen endothermen Übergangs bei  $53,3 \pm 0,2$  °C (0,5 M) bzw.  $59,6 \pm 0,1$  °C (1 M) wird beobachtet. Der Austausch des Kations von Magnesium zu Natrium zeigt eine ähnlich destabilisierende Wirkung auf die Gelphase der Membran durch die Verringerung der Schmelztemperatur  $T_m$  um 3 °C (s. Abb. 3.1 b)). Dabei tritt eine Verbreiterung des DSC-Peaks auf, welcher auf eine verringerte Kooperativität des Phasenübergangs schließen lässt. Der Vorübergang zwischen den Gelphasen  $L_{\beta'}$  und  $P_{\beta'}$  ist zudem nicht mehr detektierbar.

Die Bildung zusätzlicher thermodynamischer Übergänge tritt im Gegensatz zum Magnesiumhaltigen Salz nicht auf. Abbildung 3.1 c) zeigt, dass die Zugabe von Magnesiumsulfat die Übergangstemperatur von der Gel- zur fluiden Phase um bis zu 3 °C erhöht. Dies weist auf eine Stabilisierung der  $L_{\beta}'$ -Phase hin, die durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem doppelt negativ geladenem Sulfation und der positiv geladenen Cholin-Kopfgruppe hervorgerufen wird. Dieses Verhalten wird auch bei Zusatz von Natriumsulfat beobachtet (s. Abb. 3.1 d)). Diese Ergebnisse belegen, dass das Phasenverhalten der Lipiddoppelschicht im Besonderen vom Anion des Salzes kontrolliert wird.

### 3.3.2 Fluoreszenzspektroskopie

Mithilfe des solvatochromen Membranfarbstoffes Laurdan können Informationen über den Ordnungsparameter und die Fluidität des Modellmembransystems erhalten werden. Aufgrund seiner amphiphilen Struktur lässt sich dieser Fluorophor problemlos in Membranen interkalieren. Durch sein großes Dipolmoment im angeregten Zustand gibt das Emissionsmaximum dieses Farbstoffs Auskunft über die Polarität seiner Umgebung. Dadurch kann das Ausmaß von eindringendem Wasser in die Doppelschichtoberfläche quantitativ erfasst werden. Da das Eindringen von Wasser in die Membran abhängig von ihrer Packungsdichte und damit auch ihrer Fluidität ist, ist diese Sonde auch dafür geeignet, Aussagen über diese Eigenschaft der Membran zu treffen.<sup>[39]</sup> Das Emissionsmaximum von Laurdan liegt bei 490 nm, wenn die Lipide in der fluiden  $L_{\alpha}$ -Phase vorliegen, während es sich in den geordneteren Gelphasen zu 440 nm verschiebt. Der  $GP$ -Wert (s. Gleichung 3.1) wird dabei zur Quantifizierung dieser Verschiebung genutzt. In Abbildung 3.2 ist der Einfluss verschiedener Salze auf den temperaturabhängigen  $GP$ -Wert einer DPPC-Membran gezeigt.





**Abbildung 3.2:** Temperaturabhängige  $GP$ -Werte von DPPC Vesikeln unter Zugabe von 0,5 M  $MgSO_4$ ,  $Na_2SO_4$  und  $NaClO_4$ . Mithilfe eines BOLTZMANN-Fits wurden die Übergangstemperaturen bestimmt.

Die sigmoidale Abnahme des  $GP$ -Wertes mit steigender Temperatur wird durch das Phasenverhalten der Vesikel bestimmt, da die Lipide bei Temperaturen um 20 °C in der Gelphase vorliegen und somit wenig Wassermoleküle in die Membran eindringen können. Das Emissionsmaximum von Laurdan liegt dabei bei 440 nm, woraus ein  $GP$ -Wert von 0,5 resultiert. Da die Doppelschicht oberhalb von 42 °C in die fluide  $L_\alpha$ -Phase übergeht, verschiebt sich das Emissionsmaximum des Fluorophors zu 490 nm aufgrund der abnehmenden lateralen Ordnung durch die Bildung von entropisch bevorzugten *gauche*-Konformeren in den Kohlenwasserstoffketten der Lipide. Die Umgebungspolarität für die Laurdanmoleküle steigt dabei, da Wassermoleküle in den oberen Kettenbereich interkalieren können, wodurch die  $GP$ -Werte negative Zahlen annehmen. Am Wendepunkt der Auftragung des  $GP$ -Wertes gegen die Temperatur kann die Phasenübergangstemperatur abgelesen werden. Dabei fällt auf, dass die Sulfat-haltigen Salze in einer Konzentration von 0,5 M unabhängig vom Kation diese um 2 bis 3 °C erhöhen und die laterale Ordnung der Membran in der fluiden Phase erhöhen. Die Zugabe von 0,5 M Natriumperchlorat führt zu einer Verringerung der Übergangstemperatur um 3 °C und einer Destabilisierung der Gelphase. Diese Beobachtungen sind konsistent mit den Ergebnissen aus den DSC-Messungen (s. 3.3.1). Das relativ große Perchlorat-Anion besitzt wegen seines chaotropen Charakters die Eigenschaft, Wasserstoffbrückenbindungen zu stören. Dies ist durch seine geringe Ladungsdichte bedingt, weshalb das Anion seine Hydrathülle abstreifen kann, um in unpolare Strukturen, wie beispielsweise hydrophobe Bereiche von Proteinen, eindringen zu können.<sup>[43,44]</sup> In dem hier vorliegenden Fall einer Membran wären dies

die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten, welche eine höhere Konformationsunordnung durch die Einlagerung des Ions aufweisen und somit die niedrigeren Ordnungsparameter in der Gelphase erklären. Im Gegensatz dazu weist das Sulfat-Anion eine hohe Ladungsdichte auf und ist dadurch stark solvatisiert, sodass es nicht leicht in die Lipiddoppelschicht diffundieren kann. Die Messung des *GP*-Wertes der DPPC-Vesikel unter Zugabe von Magnesiumperchlorat war nicht möglich, da das charakteristische Laurdan-Spektrum unter diesen Bedingungen nicht mehr detektierbar war. Der Fluorophor wird vermutlich durch das Perchlorat oxidiert, da dieses aufgrund der durch das Ion induzierten geringen Packungsdichte der Membran einfacher an den Farbstoff gelangen kann. Zur Überprüfung des Einflusses von Magnesiumsulfat auf die DPPC-Membran wurden zudem druckabhängige Messungen durchgeführt.

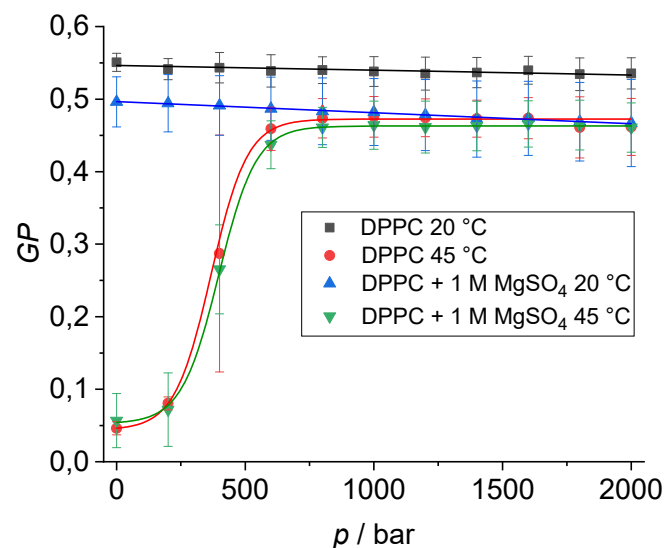
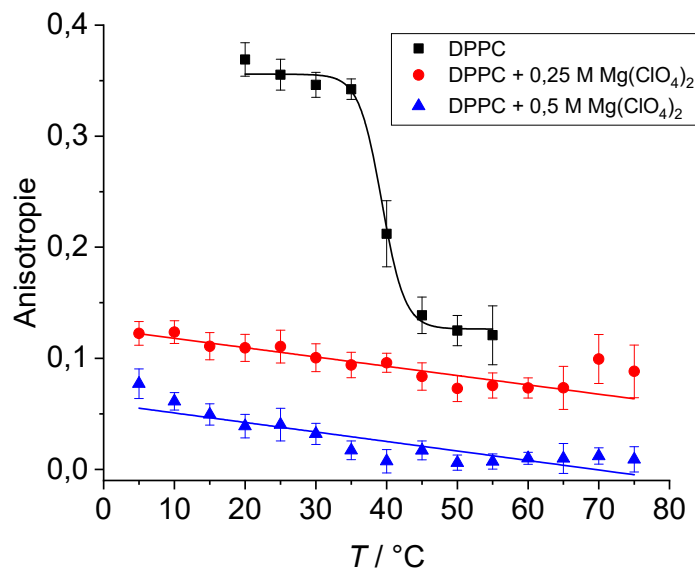


Abbildung 3.3: Druckabhängige *GP*-Werte von DPPC-Vesikeln bei 20 und 45 °C in Puffer und unter Zugabe von 1 M MgSO<sub>4</sub>.

Die in Abbildung 3.3 gezeigten *GP*-Werte beweisen die Druckunempfindlichkeit der Gelphase, da sich diese bereits durch eine hohe Packungsdichte auszeichnet. Durch Druckerhöhung in der fluiden Phase, welche DPPC bei einer Temperatur von über 42 °C erreicht, ist ein druckinduzierter Phasenübergang in die Gelphase bei 500 bar erkennbar. Bedingt wird dieser Übergang durch das geringere partielle Volumen der Lipide in der Gelphase gegenüber der  $L_{\alpha}$ -Phase, welches bei Erhöhung des Umgebungsdrucks favorisiert wird.<sup>[40,42]</sup> Einen signifikanten Einfluss auf dieses druckabhängige Phasenverhalten durch die Anwesenheit von Magnesiumsulfat ist nicht zu erkennen.

Zur Bestimmung der Lipidordnung bei der Zugabe von Magnesiumperchlorat wurde der Fluorophor DPH (1,6-Diphenyl-Hexatrien) verwendet, welcher sich bevorzugt in dem hydrophoben inneren Teil der Doppelschicht einbaut. Durch die Messung der Fluoreszenzanisotropie des Farbstoffes können wichtige Informationen über die Bewegungsfreiheit der Kohlenwasserstoffketten getroffen werden. Nimmt eine Membran eine fluide Phase ein, erhöht sich auch ihr partielles Volumen, weshalb der Fluorophor innerhalb der Kettenregion mehr Raum für Rotationsbewegungen in Anspruch nehmen kann und die Emission von parallel polarisiertem Licht verringert. Die mithilfe von Gleichung 3.2 bestimmte Anisotropie steht in reziproker Beziehung zur Membranfluidität.<sup>[39,40]</sup> In Abbildung 3.4 ist die Anisotropie des DPHs in DPPC-Vesikeln gegen die Temperatur unter Einfluss von Magnesiumperchlorat aufgetragen.



**Abbildung 3.4:** Temperaturabhängigkeit der Anisotropie von DPH in DPPC-Vesikeln in Puffer (schwarz) und unter Zugabe von 0,25 M (grün) und 0,5 M Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (rot).

Bei Temperaturen oberhalb 41 °C liegt DPPC in der fluiden Phase vor, welche aufgrund der geringeren Packungsdichte niedrigere Anisotropiewerte im Vergleich zu Gelphasen aufweisen. Die Zugabe von Magnesiumperchlorat führt zu einer deutlichen Senkung dieser Werte, sodass kein Phasenübergang zwischen Gel- und fluider Phase mehr erkennbar ist, da die Membran im gesamten Temperaturbereich von 5 bis 75 °C eine erhöhte Fluidität erreicht. Diese Beobachtung stützt die These, dass das Perchlorat-Anion in diese Bereiche der Membran interkaliert und somit die Packungsdichte verringern kann. Die in der DSC detektierten endothermen Peaks bei über 50 °C aus Abb. 1 a) können mithilfe der Anisotropiemessungen nicht weiter analysiert

werden, da es sich vermutlich nicht um konformationsdynamische Änderungen handelt und die Fluidität ebenfalls nahezu konstant bleibt.<sup>[45]</sup>

### 3.3.3 Röntgenkleinwinkelstreuung

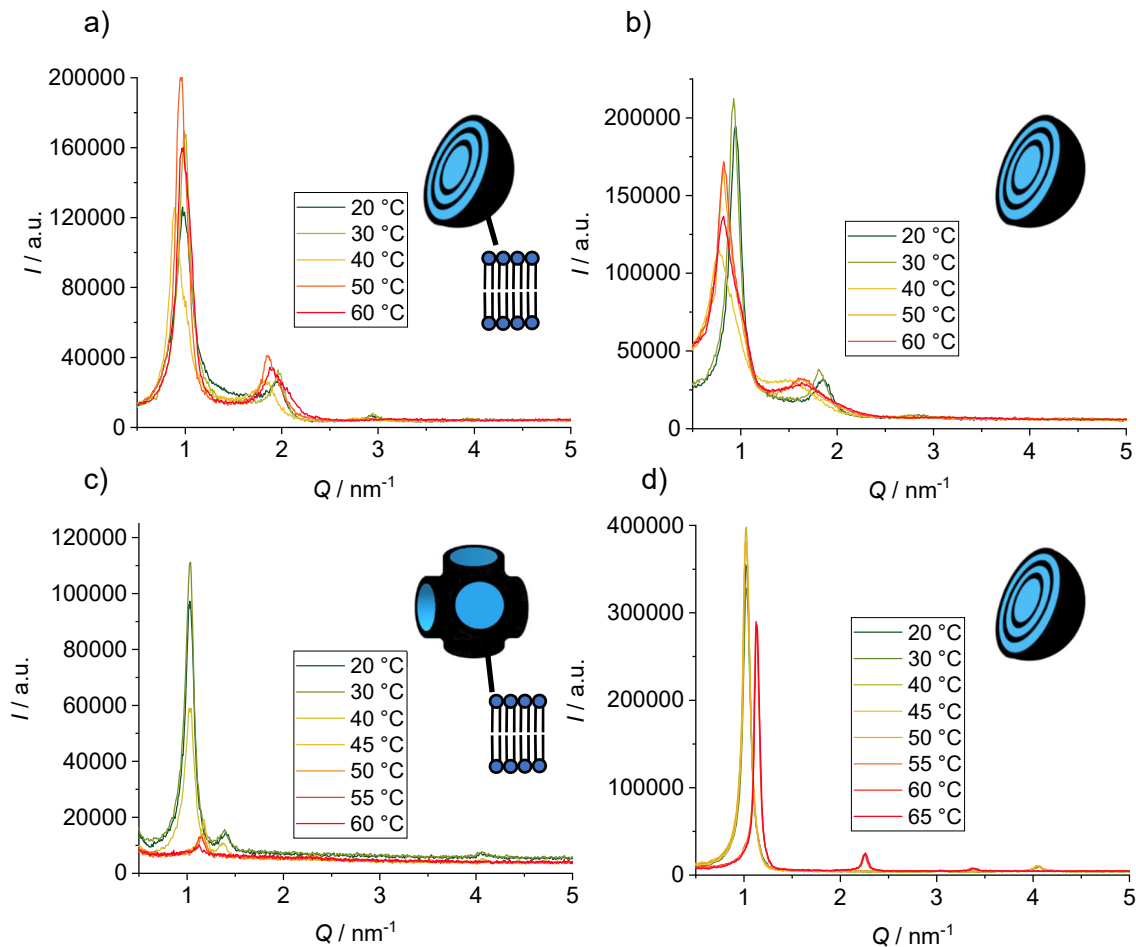
Die Röntgenkleinwinkelstreuung wurde zur Berechnung der lamellaren Distanz (Wiederholungseinheit) der Doppelschichten innerhalb multilamellarer Vesikel (MLVs) verwendet. Dieser Abstand kann aus den in der elastischen Streukurve  $I(Q)$  auftretenden BRAGG-Peaks bestimmt werden.  $Q$  entspricht dem Streuvektorbetrag, welcher über folgende Gleichung definiert ist:

$$Q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\theta \quad (3.5)$$

Dabei steht  $\lambda$  für die Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung (in diesem Fall 1,54 Å für Kupfer) und  $\theta$  für den halben Streuwinkel. Die Maxima aus den Streukurven wurden nach einer Entschmierung mithilfe einer GAUSSIAN-Funktion modelliert, um deren Positionen zu bestimmen. Dadurch kann die vorliegende Lipidphase identifiziert werden, da diese charakteristische Abstände zwischen den BRAGG-Peaks zeigen.<sup>[42]</sup> Die Positionen der Maxima der lamellaren Phasen sind immer gleich weit voneinander entfernt (1:2:3...), während sich diese Abstände für die inverse hexagonale Phase ( $H_{II}$ ) 1: $\sqrt{3}$ :2: $\sqrt{7}$ ... oder für die inverse kubische Phase  $Im\bar{3}m$  ( $Q_{II}^P$ )  $\sqrt{2}$ : $\sqrt{4}$ : $\sqrt{6}$ : $\sqrt{8}$ ... unterscheiden.<sup>[46-49]</sup> Mithilfe der BRAGG-Gleichung kann die lamellare Gitterkonstante nach

$$d_{\text{Gitter}} = \frac{2\pi}{Q_1} \quad (3.6)$$

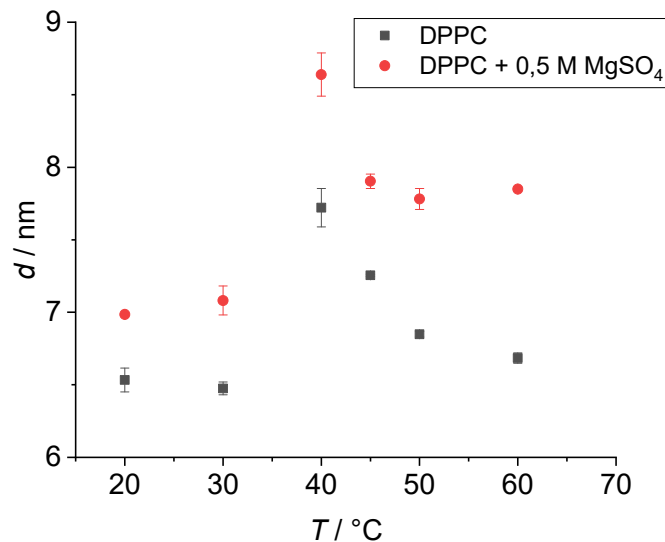
berechnet werden. Definitionsgemäß besteht dieser Parameter aus der Addition der Dicke einer Lipiddoppelschicht  $d_l$  und der Dicke der interlamellaren Wasserschicht  $d_w$  zwischen den Lipiddoppelschichten innerhalb eines multilamellaren Vesikels.<sup>[42]</sup> Abbildung 3.5 zeigt ausgewählte temperaturabhängige Streukurven von DPPC-Vesikeln verschiedener Konzentrationen unter dem Einfluss von 0,5 M  $MgSO_4$  und  $Mg(ClO_4)_2$ .



**Abbildung 3.5:** Temperaturabhängige Röntgenstreukurven multilamellarer Vesikel aus a) 20 Gewichtsprozent DPPC, b) 20 Gewichtsprozent DPPC + 0,5 M MgSO<sub>4</sub>, c) 10 Gewichtsprozent DPPC + 0,5 M Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> und d) 20 Gewichtsprozent DPPC + 0,5 M Mg(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Zur Deutung der verschiedenen SAXS-Muster sind schematisch in a) und b) multilamellare Vesikel und in c) die invertierte bikontinuierliche kubische Phase ( $Q_{II}^P$ )  $Im3m$  gezeigt.

Die Abstände der auftretenden BRAGG-Peaks sind für DPPC-Vesikel in Puffer und unter der Zugabe von MgSO<sub>4</sub> immer in einem ganzzahligen Abstand, woraus geschlossen werden kann, dass die vorliegenden Lipidphasen lamellarer Natur sind. In Anwesenheit von Magnesiumperchlorat beträgt das Verhältnis der Distanz zwischen den messbaren Peaks erster und zweiter Ordnung bei Temperaturen bis 40 °C 1 zu ~1,4. Dieses Beugungsmuster ist bezeichnend für die bikontinuierliche inverse kubische Phase  $Im3m$  ( $Q_{II}^P$ ). Sie besteht aus einer einzigen fluiden Lipiddoppelschicht, welche zu einer periodischen Oberfläche gefaltet ist, in der das Wasser in unzusammenhängenden Kompartimenten gehalten wird (s. Abb. 3.5 c)).<sup>[42,46–49]</sup> Wird der Lipidanteil verdoppelt, sind keine BRAGG-Peaks höherer Ordnung bei Temperaturen unter 50 °C zu erkennen, sodass den Aggregaten in diesem Bereich keine bekannten Strukturen zugeordnet werden könnten. Bei höheren Temperaturen wird ein Phasenübergang zu einer lamellaren Lipidphase beobachtet, welcher in Übereinstimmung mit

den DSC-Daten steht (s. 3.3.1). Die Gitterkonstante dieser Phase wurde mithilfe von Gleichung 3.6 auf einen Wert von 5,6 nm bestimmt. Die temperaturabhängigen Gitterkonstanten von DPPC-Vesikeln in Puffer und unter Zugabe von  $\text{MgSO}_4$  sind in Abbildung 3.6 dargestellt.



**Abbildung 3.6:** Gitterkonstanten  $d$  von DPPC-Vesikeln in Puffer (schwarz) und unter Zugabe von 0,5 M  $\text{MgSO}_4$  (rot) in Abhängigkeit der Temperatur.

Der Phasenübergang zwischen den beiden Gelphasen bei  $\sim 35^\circ\text{C}$  erhöht die Gitterkonstante der Membran deutlich, da die Lipide in der  $\text{P}_{\beta'}$ -Phase eine periodisch gewellte Überstruktur einnehmen, dessen Platzbedarf sich dadurch vergrößert. Eine Änderung in die fluide Phase ab  $42^\circ\text{C}$  bewirkt eine Verringerung der Gitterkonstanten durch die Bildung von *gauche*-Konformeren innerhalb der Acylketten, welche die Dicke der Lipiddoppelschicht erniedrigen. Die Anwesenheit von Magnesiumsulfat hat keinen Einfluss auf die Temperaturabhängigkeit der Gitterkonstante, allerdings werden die absoluten Werte dieses Parameters um bis zu einem Nanometer in der fluiden Phase erhöht. Die Messungen des lateralen Ordnungsparameters der Membran (s. 3.3.2) lassen auf eine größere Membrandicke schließen, welche durch dieses Salz bedingt wird. Eine Erhöhung des Wertes für die interlamellare Wasserschicht  $d_w$  kann ebenfalls in Betracht gezogen werden.

Eine Membran bestehend aus dem Lipid DOPC liegt aufgrund seiner ungesättigten Kohlenwasserstoffketten bei Temperaturen oberhalb von  $-22^\circ\text{C}$  in der fluiden  $\text{L}_\alpha$ -Phase vor.<sup>[42]</sup> Diese lamellare Phase zeigt deutliche BRAGG-Reflexe und ist auch in Anwesenheit der getesteten Magnesiumsalze stabil (s. Abb. 3.7). Die Gitterkonstante für diese Membran in Puffer bei  $20^\circ\text{C}$  beträgt  $6,5 \pm 0,1$  nm und wird durch 0,5 M Magnesiumsulfat auf  $7,2 \pm 0,1$  nm erhöht, während

das entsprechende Perchloratsalz den  $d$ -Wert um 0,9 nm auf einen Wert von  $5,4 \pm 0,1$  nm verringert. Obwohl die Gitterkonstante durch das Magnesiumperchlorat drastisch verringert wird, sind die multilamellaren Vesikeln aus diesem Lipid in der Lösung stabil. Diese Abnahme ist vermutlich durch eine dünnere intermolekulare Wasserschicht  $d_w$  bedingt, die durch den größeren osmotischen Druck entsteht.

Zur Überprüfung des Einflusses von Magnesiumperchlorat auf bakterielles Leben wurde ein Modellmembransystem bestehend aus den Lipiden DOPE und DOPG in einem molaren Verhältnis von 70:30 verwendet. Die Kopfgruppen der Lipide aus Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerol (PG) kommen speziell in Bakterien häufig vor.<sup>[50]</sup> Im Inlet der Abbildung 3.7 ist die gemessene Röntgenstreucurve gezeigt.

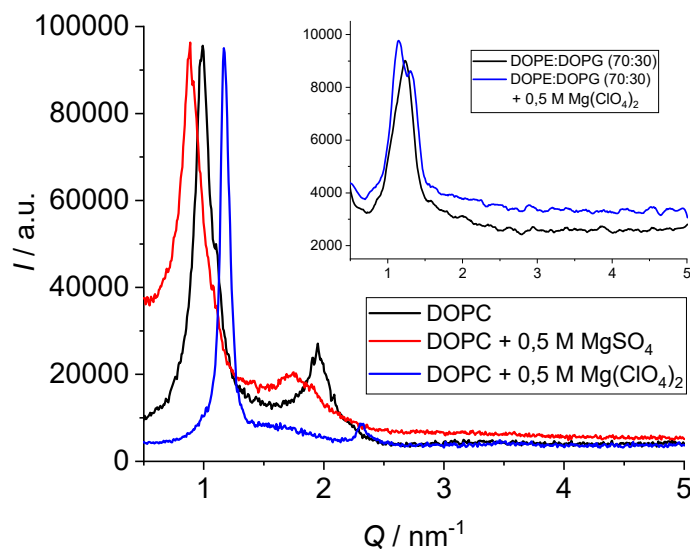


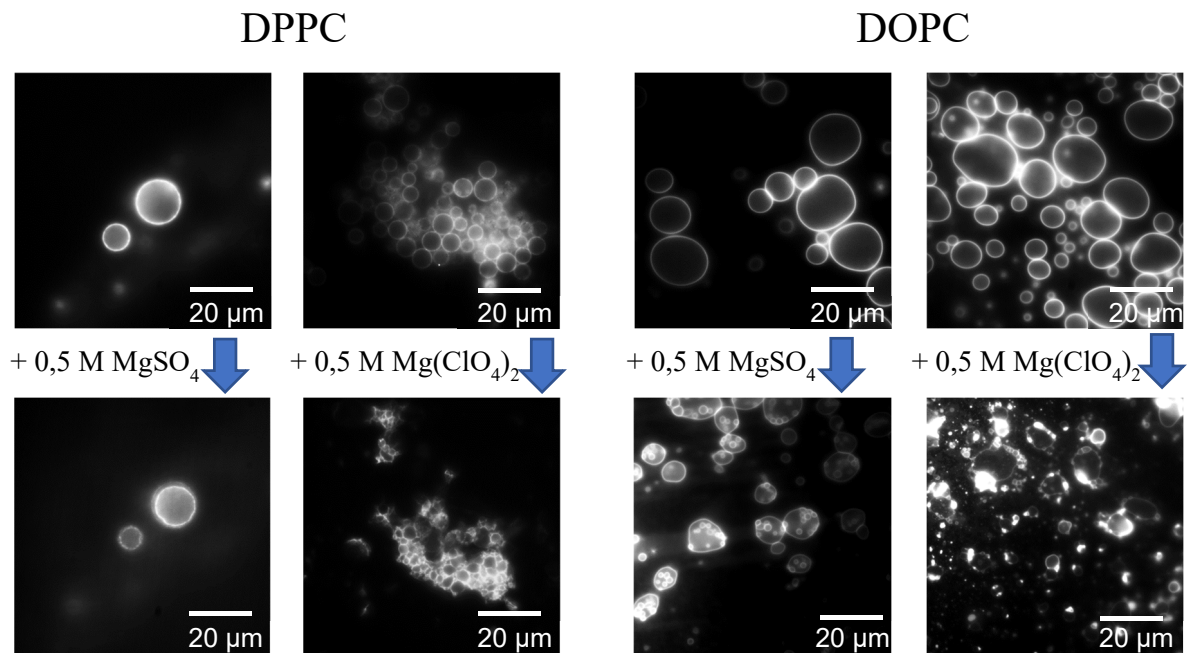
Abbildung 3.7: Röntgenstreucurve von 20 Gewichtsprozent DOPC und DOPE:DOPG in einem molaren Verhältnis von 70:30 bei 20 °C in Puffer und in Anwesenheit von 0,5 M  $\text{MgSO}_4$  und  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ .

Da beide Lipide bei 20 °C in der fluiden Phase vorliegen, zeigen die lamellaren Schichten innerhalb der Vesikel eine hohe Unordnung, sodass keine BRAGG-Reflexe höherer Ordnungen detektierbar sind. Der lamellare Abstand des 2-Komponentensystems wurde auf  $5,5 \pm 0,1$  nm und stimmt damit mit der Gitterkonstanten reiner DOPE Doppelschichten ( $5,1 \text{ nm}^{[49]}$ ) nahezu überein. Die Zugabe von  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  verändert diesen Abstand nicht ( $5,6 \pm 0,1$  nm), sodass die Struktur der bakteriellen Modellmembran durch diese hochkonzentrierte Magnesiumperchlorat-Lösung nicht beeinflusst wird.

### 3.3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Zuletzt wurden morphologische Änderungen von *giant unilamellar vesicles* (GUVs) unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht, die durch die Zugabe der auf dem Mars gefundenen

Salze induziert werden könnten. Abbildung 3.8 zeigt mikroskopische Aufnahmen von GUVs aus den Lipiden DPPC und DOPC vor und nach Zugabe von 0,5 molaren Magnesium-haltigen Salzlösungen.



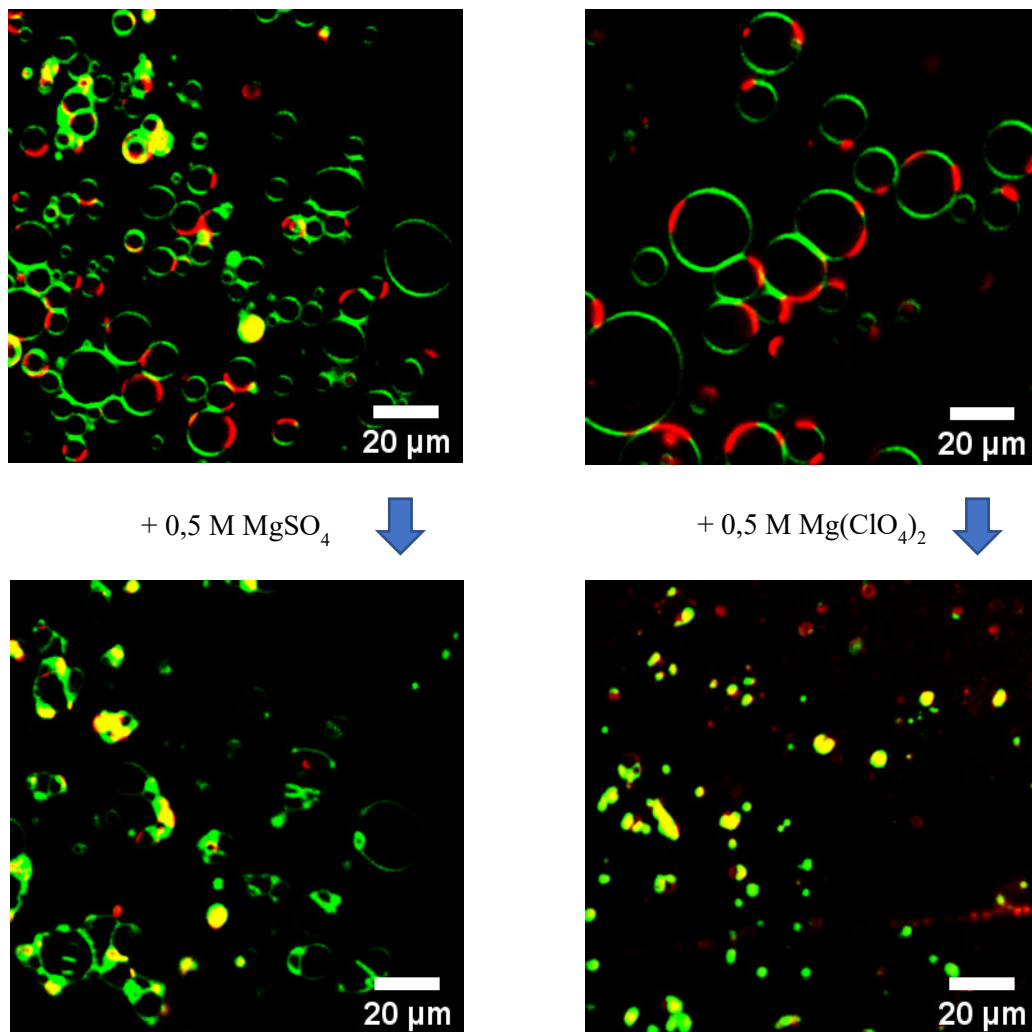
**Abbildung 3.8:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GUVs bestehend aus DPPC (links) und DOPC (rechts) vor (oben) und nach (unten) der Zugabe von 0,5 M  $\text{MgSO}_4$  und  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  bei 20 °C. Als Fluorophor wurde *N*-Rhodamin-DHPE verwendet. (Messung durchgeführt von M. HERZOG)

Die Erhöhung der extravesikulären Salzkonzentration und der dadurch entstehende osmotische Stress hat in allen Fällen eine Verformung der sphärischen Vesikel zur Folge. Dabei zeigt sich, dass die Zugabe von Magnesiumperchlorat sowohl bei den in der Gelphase befindlichen DPPC-, als auch bei den fluiden DOPC-Vesikeln, zu einem Schrumpfen der Vesikel führt. Magnesiumsulfat scheint die Topologie der GUVs aus DPPC verhältnismäßig wenig zu beeinflussen, während DOPC-Vesikel durch dieses Salz schrumpfen und fusionieren können.

Um die komplexeren phasenseparierten Zellmembranen von Eukaryoten unter hohen Magnesiumsalzkonzentrationen zu simulieren, wurden Vesikel aus einem 5-Komponentensystem (5 KS) hergestellt. Dieses enthält einen Cholesterinanteil von 25 Molprozent, sodass sowohl *liquid-ordered* ( $l_o$ ) als auch *liquid-disordered* ( $l_d$ ) Domänen in einem einzigen Vesikel bei Raumtemperatur nebeneinander vorliegen. Diese Bereiche können mithilfe von spezifischen Fluorophoren einzeln markiert werden. In diesem Fall wurde die  $l_o$ -



Phase mit NBD-DHPE (grün) und die  $l_d$ -Phase mit *N*-Rhodamin-DHPE (rot) angefärbt (s. Abb. 3.9).



**Abbildung 3.9:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GUVs bestehend aus DPPC:DPPG:DOPC:DOPG:Cholesterin (45:5:20:5:25) vor (oben) und nach (unten) der Zugabe von 0,5 M  $MgSO_4$  und  $Mg(ClO_4)_2$  bei 20 °C. Als Fluorophore wurden *N*-Rhodamin DHPE (rot,  $l_d$ -Phase) und NBD-DHPE (grün,  $l_o$ -Phase) verwendet. (Messung durchgeführt von M. HERZOG)

Eine Phasenkoexistenz der  $l_o$ - und  $l_d$ -Phase innerhalb der Vesikel ist bei Raumtemperatur durch die beiden Fluorophore erkennbar, welche in den GUVs diese einzelnen Bereiche visualisieren. Die Injektion von Magnesiumsulfat zu der Modellmembran führt zur Aggregation der Vesikel und einer deutlichen Verringerung der Anteile der fluiden-ungeordneten Phase, sodass die Vesikel nun hauptsächlich aus gesättigten Lipiden und Cholesterin aufgebaut sind. Magnesiumperchlorat hat einen noch drastischeren Einfluss auf dieses Membransystem, da die Vesikel durch Zugabe dieses Salzes innerhalb weniger Minuten zerfallen. Um den Effekt des osmotischen Stresses auf die GUVs zu minimieren, wurde auch die Präparation der Aggregate in den jeweiligen Salzlösungen durchgeführt. In einer  $Mg(ClO_4)_2$ -Lösung fand keine Bildung

von Vesikeln statt, während in einer  $\text{MgSO}_4$ -Lösung wenige aggregierte Vesikel gebildet werden konnten (s. Abb. A1).

### 3.4 Zusammenfassung

Die Interaktionen zwischen Metallionen mit einer Lipidmembran sind von der Größe, der Ladung und den Bindungseigenschaften der Ionen abhängig.<sup>[51-53]</sup> Eine weitere Charakterisierung von Salzen in Bezug auf deren Einfluss auf Biomoleküle ist durch die HOFMEISTER-Reihe gegeben, welche Salze nach ihrer chaotropen Wirkung auf Makromoleküle in wässrigen Lösungen klassifiziert.<sup>[54]</sup> Während Sulfate in biochemischen Anwendungen als kosmotrope Salze verwendet werden, besitzen Perchlorate einen eher chaotropen Charakter. Zweifach positiv geladene Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  weisen eine hohe Ladungsdichte auf und werden an Lipiddoppelschichten adsorbiert. Wechselwirkungen zwischen den Ionen und der Kopfgruppenregion können nicht nur Konformationsänderungen in dem hydrophilen Teil der Membran verursachen, sondern auch für eine dichtere Packung der Kohlenwasserstoffketten in der fluiden Phase verantwortlich sein.<sup>[51-53]</sup> In vorherigen Studien wurde nachgewiesen, dass Magnesiumionen im Vergleich mit Kalziumionen wesentlich geringere Bindungskonstanten zu Lipidkopfgruppen besitzen. Somit interagieren Magnesiumionen mit der Oberfläche von Liposomen auch in einem geringeren Maße, sodass die hydrophilen Lipidgruppen weiterhin zugänglich für Wassermoleküle sind.<sup>[51]</sup> Daher gehen keine schädlichen Auswirkungen von diesem auf dem Mars vorkommenden Ionen auf die Struktur und Fluidität von Biomembranen aus, da trotz ihrer Anwesenheit eine ausreichende Hydratation der Membran gegeben ist.

In diesem Projekt konnte demonstriert werden, dass die Kombination aus den Einflüssen von hohem Umgebungsdruck und hohen Konzentrationen auf dem Mars befindlicher Salze verschiedene Auswirkungen auf die Stabilität und Struktur von Modellmembranen zeigen. Konzentrationen unter 0,5 M  $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$  erniedrigen die Hauptphasenübergangstemperatur von DPPC um wenige Grad Celsius und führen somit zu einer Fluidisierung der Membran. Bedingt wird dies durch die geringe Ladungsdichte des Anions, weshalb dessen Hydrathülle abgestreift werden kann, um in hydrophobe Bereiche der Membran zu interkalieren und somit für eine höhere Unordnung im Alkylkettenbereich zu sorgen.<sup>[43,44]</sup> Durch eine Erhöhung der Salzkonzentration ändert sich das Phasenverhalten der Liposomen. Es kommt zur Ausbildung von nicht-lamellaren Phasen. In Anwesenheit von 10 Gewichtsprozent DPPC nehmen die

Lipide eine kubische Struktur an, welche bei hohen Temperaturen oder Erhöhung der Lipidkonzentration in eine fluide lamellare Phase übergeht. Kubische Lipidphasen wurden bisher sowohl Chloroplasten als auch im Inneren Teil von Membranen des Mitochondriums gefunden. Anwendungen finden diese auch in der Pharmakologie zur gezielten Freisetzung von Arzneimitteln im Körper.<sup>[55,56]</sup> Einen geringeren Einfluss auf die DPPC-Vesikel wurde durch den Austausch des Kations von  $Mg^{2+}$  zu  $Na^+$  erreicht, da selbst unter hohen Konzentrationen von Natriumperchlorat (1 M) nur eine minimale Fluidisierung der Membran zu beobachten war. Lipidsysteme aus *cis*-ungesättigten Fettsäuren wie DOPC oder auch DOPE:DOPG bildeten trotz hoher Konzentrationen an Magnesiumperchlorat vesikuläre Strukturen aus.

Die verwendeten Sulfate stabilisierten im Gegensatz zu den Perchloraten die Membransysteme in der Gelphase durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Sulfat-Anion und der Cholin-Kopfgruppe der Phospholipide. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Anionen hauptsächlich für das Phasenverhalten der Lipiddoppelschicht verantwortlich sind.

Ebenfalls zeigten die verschiedenen Anionen unterschiedliche Effekte auf die Topologie von GUVs diverser Membransysteme in der Fluoreszenzmikroskopie. Während die Anwesenheit von Perchlorat für alle getesteten Vesikel nicht tolerierbar war und sie kollabierten, zeigte das Sulfation auf geordnetere Lipidphasen nur einen minimalen Einfluss. Fluide Vesikel hingegen aggregierten aufgrund des Sulfates. Die passive Diffusion dieser Salze durch die Membran ist im Gegensatz zu der von Wassermolekülen stark gehindert. Aufgrund des großen Flächenausdehnungsmoduls ( $55-70 k_B T \text{ nm}^{-2}$ ), gekoppelt mit einer geringen Biegesteifigkeit ( $10-20 k_B T$ ), biegen sich Lipiddoppelschichtschalen leicht, lassen jedoch nur eine begrenzte Flächenausdehnung von ca. 5 % zu.<sup>[57-61]</sup> Um Konzentrationsunterschiede zwischen dem Inneren und Äußeren eines Vesikels zu überwinden, passen GUVs ihr Volumen an, weshalb sich diese in hypertonischen Medien verformen. In dieser Studie entstanden osmotische Drücke ( $\pi = c \cdot R \cdot T$ ) von bis zu 10 bar, sodass die beobachteten Formveränderungen auf diesen Effekt zurückzuführen sind. Das resultierende erhöhte Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen bei dem Austritt von Wasser induziert verschiedene irreguläre Topologien, wie abgekapselte kleinere Vesikel, welche druckstabiler sind als die größeren GUVs. Dieser Prozess geht in einem Mehrkomponentensystem mit einer Trennung der lateralen  $l_d$ - und  $l_o$ -Phase einher. Der steigende osmotische Druck erhöht die Linienspannung zwischen den beiden Domänen und führt somit zu einer Änderung der Größen dieser Bereiche.<sup>[58,62]</sup>

Zusammenfassend implizieren die Ergebnisse dieser Studie, dass die Struktur und das generelle Phasenverhalten von Lipidmembranen empfindlich von dem jeweiligen auf dem Mars gefundenen Salz und seiner Konzentration abhängig sind. Dabei spielt das Anion eine größere Rolle als das Kation des Salzes. Hauptsächlich werden Vesikel aus langkettigen und gesättigten Lipiden durch Magnesiumperchlorat ab 0,25 M stark in ihrer Doppelschichtstruktur beeinflusst. Beide Salze beeinträchtigen zudem die laterale Organisation komplexer heterogener Membransysteme. Vesikuläre Strukturen aus ungesättigten Lipiden, welche in Bakterien vorkommen, sind in Gegenwart dieser Ionen stabil, wodurch Organismen unter diesen Bedingungen ihre Zellmembranen aufrechterhalten könnten. Dieses Projekt gibt auch Hinweise über die Anpassungen der Membranzusammensetzung von Lebewesen, welche auf der Erde in extremen Bedingungen, wie in sulfatreichen Fluiden in der Erdkruste, überleben.<sup>[63]</sup> Eine weitere Herausforderung für Organismen, die möglicherweise diese hohen Salzkonzentrationen und den vorherrschenden Druck tolerieren, ist die Erhaltung der Fluidität ihrer komplexen Membran bei den extrem tiefen Temperaturen auf dem Mars. Möglich wäre dies durch einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäureketten, welche selbst bei Temperaturen unter 0 °C eine fluide Phase annehmen.

# Leben unter extremen Bedingungen in Hinblick auf Biomembransysteme

---

Die folgenden Ergebnisse sind bereits in Chemical Reviews 123 (2022), 73-104 veröffentlicht.

### 4.1 Einleitung

Extremophile Organismen auf der Erde konnten sich im Laufe der Evolution an außerordentliche chemische und physikalische Umweltbedingungen adaptieren.<sup>[24-26]</sup> In diesem Projekt wird ein besonderes Augenmerk auf die Einflüsse von osmotischen und hydrostatischen Druck auf Membransysteme gelegt, um diese lebenswichtigen Organellen von Organismen, welche diese Parameter überstehen, zu untersuchen. Dabei erzeugen beide Faktoren eine Volumenänderung, diese beruhen aber auf unterschiedlichen Prozessen und können gegensätzliche Wirkungen auf Biomoleküle haben.<sup>[64-66]</sup> Physikalisch gesehen beschreibt der hydrostatische Druck den Druck, der aufgrund des Gewichts eines Fluids in einer Flüssigkeitssäule entsteht und dabei in alle Richtungen wirkt. Eine Änderung dieses Drucks führt zu einer Volumenänderung, ohne gleichzeitig die interne Energie (wie bei einer Temperaturänderung) oder die Zusammensetzung des Lösemittels (wie bei einer drastischen Änderung des pH-Wertes) zu beeinflussen. Nach dem Prinzip von LE CHÂTELIER verringert ein System sein Volumen bei Erhöhung des hydrostatischen Drucks. Die Grundlage der Entstehung von osmotischem Druck liegt in dem Konzentrationsunterschied eines Stoffes in zwei Lösungen, die durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt sind. Die Diffusion des Stoffes wird durch diese Membran verhindert und ergibt eine Änderung des chemischen Potentials zwischen den beiden Lösungen. Zur Erreichung eines thermodynamischen Gleichgewichts diffundiert entsprechend viel Wasser durch die Membran. Durch die Erhöhung des hydrostatischen Drucks und der damit verbundenen Volumenverringerng kommt es oftmals zu einer Konformationsänderung, welche häufig einen höheren Hydratationsgrad der funktionellen Gruppen des Moleküls zulässt. Dagegen führt die Zunahme des osmotischen Drucks zu einer verringerten Interaktion dieser Gruppen mit den umgebenden Wassermolekülen, da die Osmolyte die Aktivität des Wassers absenken. Während die

Adaptionen von piezophilen Organismen an ihre Umgebung aufgrund der extremen Kultivierungsbedingungen noch nicht vollständig erforscht sind, wurden bereits für Bakterien einige Mechanismen identifiziert, welche das Überdauern unter osmotischen Stress erlauben.<sup>[67–69]</sup> Dabei verwenden sie bestimmte organische Osmolyte, Metabolite oder Ionen, die durch Änderung des osmotischen Drucks durch mechanosensitive Kanäle in eine Zelle aufgenommen oder in den extrazellulären Raum geleitet werden können.<sup>[68]</sup> Zellen ohne solche Adaptionen schrumpfen und dehydrieren, wenn die Konzentration von gelösten Molekülen außerhalb der Zelle erheblich größer ist als innerhalb, da zum Ausgleich der chemischen Potentiale das Wasser in der Zelle nach außen diffundiert. Umgekehrt platzen Zellen, die im Verhältnis zum extrazellulären Raum eine besonders hohe intrazelluläre Osmolyt- oder Salzkonzentration aufweisen. Beide Ereignisse führen somit bei plötzlichen Änderungen des osmotischen Drucks zum Zelltod, wenn keine Regulationsmechanismen im Organismus vorhanden sind. Diese biophysikalische Studie beschäftigt sich im Wesentlichen mit der Reaktion von Modellmembranen auf eine drastische Änderung des hydrostatischen und osmotischen Drucks.

## 4.2 Materialien und Methoden

### 4.2.1 Materialien

Die für dieses Projekt verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

**Tabelle 4.1: Bezugsquellen der Chemikalien für die Untersuchung Biomembranen unter von extremen Bedingungen.**

<b>Chemikalien</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Chloroform	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Cholesterin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DOPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DOPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
HEPES	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
<i>N</i> -Rh-DHPE	Molecular Probes (Invitrogen, USA)
POPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Sphingomyelin	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)

## 4.2.2 Probenpräparation

Die GUVs wurden mithilfe eines adaptierten Protokolls der PVA-Präparation von WEINBERGER ET AL. hergestellt.<sup>[70]</sup> Dabei wurden zuerst die gewünschten Lipide in Chloroform gelöst (s. 3.2.2) und ein Gel aus Polyvinylalkohol auf einen Objektträger aufgetragen. Dieser wurde für 30 Minuten unter 60 °C getrocknet. 20 µL der Lipidlösung wurden auf dieses Gel gegeben und im Vakuum getrocknet. Daraufhin wurden 500 µL Puffer auf den Objektträger gegeben, sodass die Vesikel auf dem beschichteten Objektträger 45 Minuten lang bei 70 °C aufschwellen konnten.

## 4.2.3 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Für die mikroskopischen Aufnahmen von Vesikeln unter verschiedenen osmotischen Drücken wurde dieselbe Apparatur wie in 3.2.7 beschrieben verwendet. Zusätzlich wurde eine mit Diamantfenstern ausgestattete Hochdruckzelle für die Mikroskopie verwendet, welche von MCCARTHY ET AL. inspiriert ist.<sup>[71]</sup> Als Objektiv wurde ein CFI Lu Plan ELWD 50 x Air, NA 0,55 (Nikon, Tokio, Japan) gewählt.

## 4.3 Ergebnisse und Diskussion

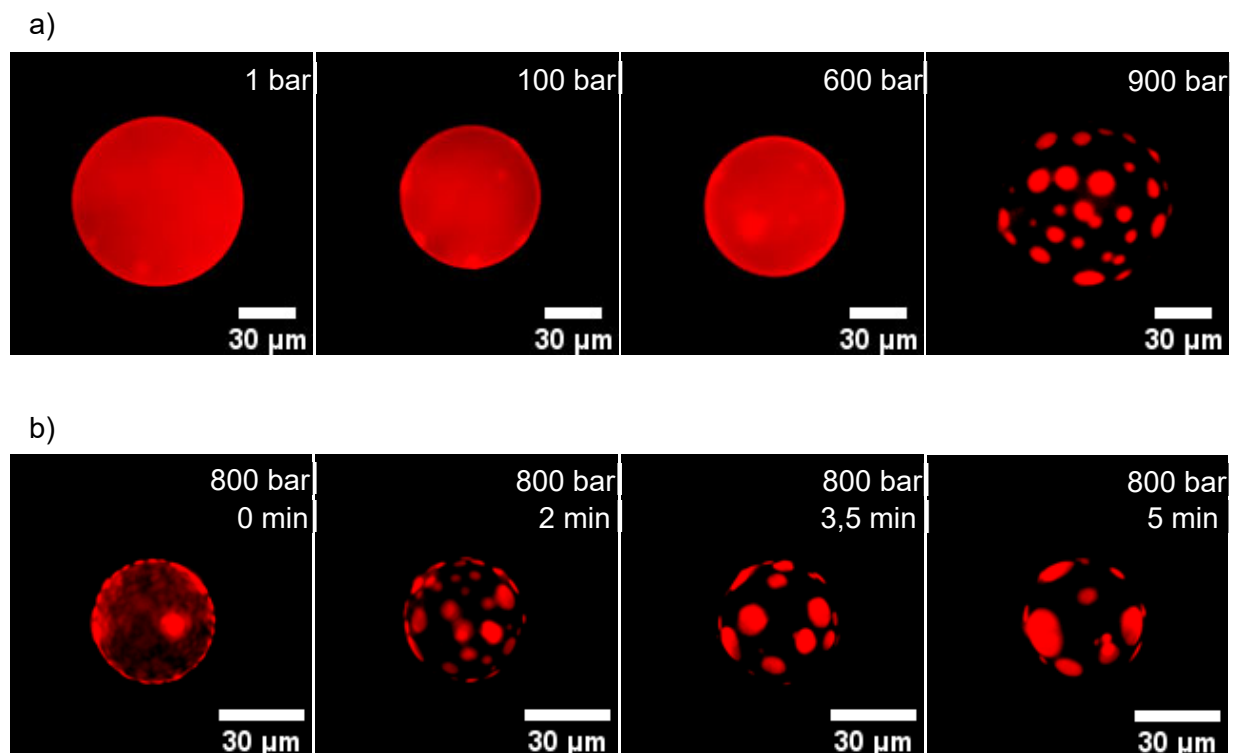
### 4.3.1 Hydrostatischer Druck

Wie in Abschnitt 1.3 erläutert, unterliegen Lipidvesikel einem temperatur- und umgebungsdruckabhängigen Phasenverhalten. Während eine höhere Temperatur die Bildung von fluideren Phasen begünstigt, induziert ein steigender hydrostatischer Druck die Entstehung von geordneteren Phasen, da diese weniger Volumen einnehmen als die durch das Vorhandensein von *gauche*-Konformere charakterisierten fluiden Phasen. Ein Verhältnis von ca. 20 °C/kbar wurde für den Gel/fluid-Übergang von gesättigten Phospholipiden bestimmt, während Lipide mit *cis*-Doppelbindungen kleinere Steigungen des  $T(p)$ -Phasenübergangs aufweisen.<sup>[42,71–75]</sup> Die erhöhte Unordnung im Bereich der Kohlenwasserstoffketten durch Knicke der *cis*-Doppelbindungen wirkt gegen den ordnenden Einfluss des hydrostatischen Drucks, sodass ungesättigte Lipide häufig in Organismen zu finden sind, die in extremen Lebensräumen unter hohen Drücken leben.<sup>[10]</sup>

Biophysikalische Untersuchungen eines Mehrkomponentensystems aus einem ungesättigten Lipid (POPC), einem Sphingolipid (Sphingomyelin) und dem Sterol Cholesterin zeigen einen Phasenkoexistenzbereich bei Temperaturen von unter 40 °C bei 1 bar Umgebungsdruck aus

einer cholesterinreichen  $l_o$ -Phase und einer ungeordneten fluiden  $l_d$ -Phase.<sup>[75]</sup> Das Phasenverhalten dieser heterogenen Membransysteme ähnelt demjenigen von biologischen Zellmembranen, welche die verschiedenen Domänen für diverse Funktionen, wie beispielsweise für die interzelluläre Signaltransduktion, verwenden.<sup>[22,23]</sup> Vorherige Studien bewiesen, dass die Phasenkoexistenz aus  $l_d$ - und  $l_o$ -Domänen selbst unter Drücken bis zu wenigen 1000 bar stabil sind, sodass selbst unter diesen Bedingungen die physiologisch wichtige Fluidität der Membran gegeben ist.<sup>[42,75,76]</sup>

Mithilfe der Druckapplikation in der Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich, die Domänenbildung in Abhängigkeit des hydrostatischen Drucks zu visualisieren. Abbildung 4.1 zeigt ein *giant unilamellar vesicle* eines 3-Komponentensystems aus POPC:SM:Cholesterin (1:1:1) unter verschiedenen Drücken bei 50 °C.



**Abbildung 4.1:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines GUVs aus POPC:SM:Cholesterin (1:1:1) markiert mit 0,5 mol% *N*-Rh-DHPE a) unter verschiedenen hydrostatischen Drücken und b) auf einer Zeitskala bis zu 5 Minuten unter 800 bar bei 50 °C. (Messung durchgeführt von M. MANISEGARAN)

Der verwendete Fluorophor *N*-Rh-DHPE wird aufgrund seines großen Volumens bevorzugt in die  $l_d$ -Phase der Membran eingebaut, sodass die rote Fluoreszenzemission die ungeordneteren Bereiche des Vesikels visualisiert. Die Erhöhung des hydrostatischen Drucks auf über 800 bar bei 50 °C erhöht die Ordnung der hydrophoben Ketten, sodass neben der *liquid-disordered*- auch die *liquid-ordered*-Phase vorliegt, welche eine Interkalation des Farbstoffs nicht zulässt.



Dieses Phasenverhalten wurde bereits mithilfe kalorimetrischer und spektroskopischer Methoden an diesem System beobachtet.<sup>[75]</sup> In Abbildung 4.1 b) ist das Wachstum der Domänen in Abhängigkeit der Zeit bei konstantem Druck gezeigt. Dieses resultiert aus der ungünstigen Linienanspannung zwischen den beiden Domänen, deren Dicke sich um ca. 1 nm voneinander unterscheidet. Die Zeitspanne für die Koaleszenz der einzelnen Phasen liegt hier im Bereich weniger Minuten. In vorangegangenen Studien wurden wesentlich kürzere Zeitabstände gemessen (< 1 min), welche allerdings die temperaturinduzierte Koaleszenz untersuchten.<sup>[77]</sup> Die Applikation von Druck verlangsamt diesen Prozess, da die druckinduzierte verringerte Fluidität zu einer langsameren Diffusion der Lipide führt.

Die Grenzflächenspannung  $\sigma$  zwischen zwei flüssigen Phasen in Abhängigkeit vom Umgebungsdruck  $p$  bei konstanter Temperatur  $T$  kann mithilfe der thermodynamischen Gleichung von J. W. GIBBS bestimmt werden:<sup>[78-80]</sup>

$$\left(\frac{\partial\sigma}{\partial p}\right)_{T,A} = \left(\frac{\partial V}{\partial A}\right)_{T,p} \quad (4.1)$$

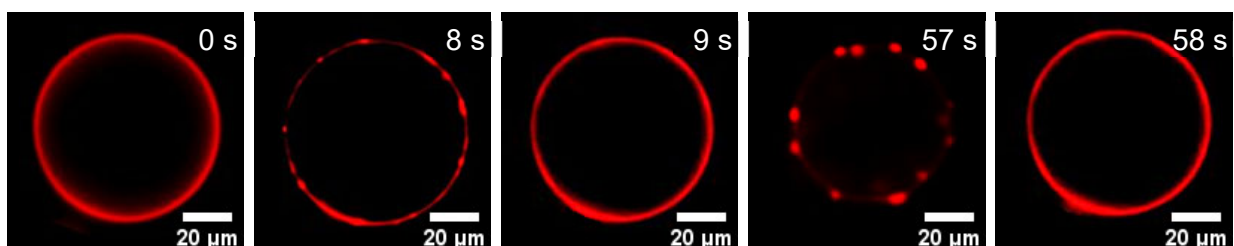
Dabei beschreibt  $V$  das Volumen des Systems, während  $A$  die Grenzfläche zwischen den Phasen beschreibt. Dies bedeutet, dass die druckabhängige Grenzflächenspannung mit dem effektiven Volumen der Moleküle im Inneren und der Grenzfläche des Systems zusammenhängt. Die rechte Seite der Gleichung drückt die durch die Grenzflächenspannung bedingte Volumenänderung  $dV$  pro Einheit der Grenzfläche aus. Im Hinblick auf Lipiddoppelschichten wird ein positiver Wert für  $dV$  erwartet, da die Region zwischen  $l_o$ - und  $l_d$ -Domänen eine geringe Packungsdichte aufweist. Innerhalb dieser Grenzregion sind VAN-DER-WAALS Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen geringer, da dort Packungsdefekte vorliegen, die eine Koaleszenz der Domänen favorisieren.

### 4.3.2 Osmotischer Druck

Im Folgenden wird der Einfluss von verschiedenen Cosolventien und der damit erzeugte osmotische Stress auf GUVs erforscht. Obwohl sich Wassermoleküle mit Geschwindigkeiten von bis zu  $10^{-2} \text{ cm}^3 \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$  durch Lipiddoppelschichten bewegen können, ist die Diffusion anderer Moleküle, wie beispielsweise Saccharose, stark eingeschränkt.<sup>[81]</sup> Vesikel lassen sich verhältnismäßig leicht verbiegen (Biegesteifigkeit  $\sim 10^{-19} \text{ J}$ ), sind gegenüber Volumenkompression stabil ( $\sim 10^{-9} - 10^{-10} \text{ Pa}^{-1}$ ), tolerieren aber nur geringe Änderungen ihrer Querschnittsflächen um wenige Prozent.<sup>[5]</sup> Zum Ausgleich der chemischen Potentiale fließt Wasser aus einem Vesikel, wenn dieses einem großen Konzentrationsgradienten an

Cosolventien ausgesetzt wird. Durch den daraus resultierenden Verlust von intravesikulärem Wasser und dem veränderten Verhältnis von Oberfläche zu Volumen kommt es zu Verformungen des amphiphilen Aggregats.<sup>[60,61]</sup> Befindet sich ein Vesikel in einem hypotonischen Medium wirkt der Konzentrationsgradient in die entgegengesetzte Richtung, sodass Wasser ins Innere fließt. Es entsteht eine laterale Membranspannung aufgrund des steigenden Volumens des Vesikels. Wird diese Spannung zu groß, kommt es zur lokalen Porenbildung durch Platzen der Membran. Die Porenbildung zum Ausgleich des osmotischen Drucks findet dabei in kurzen repetitiven Schritten (0,3 – 1 s) statt.<sup>[57,58,82,83]</sup> Dieser Prozess ist solange zu beobachten, bis die laterale Membranspannung durch Verringerung des Konzentrationsgradienten bis zur Toleranzgrenze des Vesikels gesenkt wurde. Es wird zudem beobachtet, dass diese Zyklen an eine Änderung der Membranzusammensetzung gekoppelt sind, sodass Phasenseparation ausgelöst werden kann. Ein optisch homogenes Mehrkomponentensystem zeigt in einem hypotonischen Medium eine kurzfristige Phasenseparation während solch einer Porenbildung.

Wie in 4.3.1 dient auch hier das Mehrkomponentensystem aus POPC, Sphingomyelin und Cholesterin als Modellmembran. Aus diesem System wurden GUVs in einer 1 M Saccharose-Lösung hergestellt und in reines Wasser gegeben, um osmotischen Stress zu erzeugen. Abbildung 4.2 stellt den Einfluss des Konzentrationsgradienten auf ein Vesikel in einem hypotonischen Medium dar.



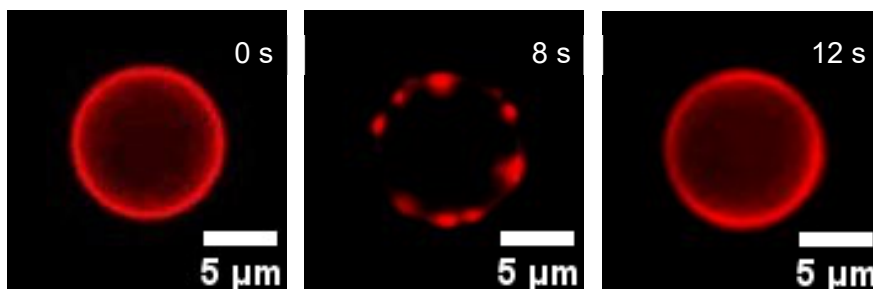
**Abbildung 4.2:** Zeitabhängige fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines GUVs aus POPC:SM:Cholesterin (1:1:1) markiert mit 0,5 mol% *N*-Rh-DHPE, welches in einer Saccharose-Lösung (1 M) präpariert und dann in reines Wasser gegeben wurde.

Das homogene Vesikel zeigt bereits nach wenigen Sekunden die ersten sog. *swell-burst*-Zyklen zum Ausgleich des erzeugten osmotischen Drucks, begleitet von periodischen Oszillationen der Membranzusammensetzung. Es entstehen kurzzeitige Phasenkoexistenzgebiete, welche mithilfe des Fluorophors *N*-Rh-DHPE, der ausschließlich die  $l_d$ -Phase markiert, erkennbar werden. Die Gesamtanzahl der erforderlichen Zyklen zum Ausgleich des Konzentrationsgradienten ist proportional zur Konzentration des Zuckers. Die Dauer eines einzelnen kurzfristigen

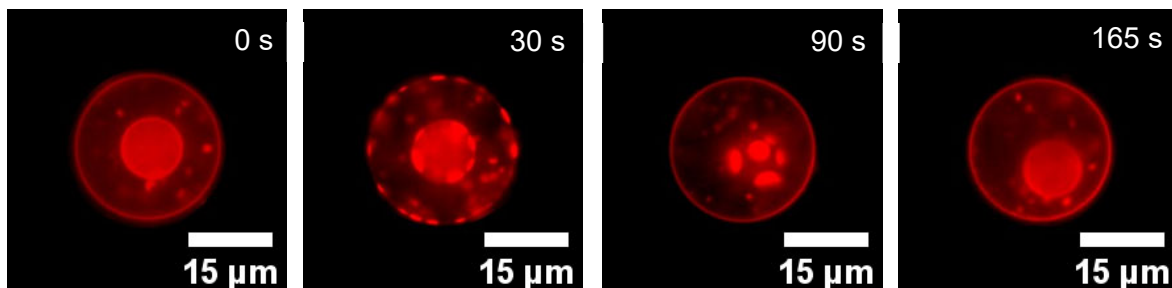
Phasenseparation ist von der Größe des Vesikels, der Konzentration des Osmolyten und der Anzahl der bisherigen Zyklen abhängig.<sup>[57,82,83]</sup>

Änderungen der Membranzusammensetzung oder der Art des Osmolyten führen ebenfalls zur osmotisch induzierten kurzfristigen Phasenseparation. Dabei wurde als Osmolyt Trimethylaminoxid (TMAO) in einer hohen Konzentration von 5 M (s. Abb. 4.3 b)) sowie das Salz Magnesiumsulfat in einer Konzentration von 0,5 M (s. Abb. 4.3 a)) als auch ein anionisches 5-Komponentensystem als Modellmembran (s. Abb. 4.3 b)) verwendet.

a)



b)



**Abbildung 4.3:** Zeitabhängige fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von GUVs aus a) POPC:SM:Cholesterin (1:1:1) oder b) DPPC:DPPG:DOPC:DOPG:Cholesterin (45:5:20:5:25) markiert mit 0,5 mol% *N*-Rh-DHPE, welche in einer a)  $\text{MgSO}_4$ - (0,5 M) oder b) TMAO-Lösung (5 M) präpariert und dann in reines Wasser gegeben wurden.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das hier behandelte Phänomen zur Osmoregulation von Biomembranen in hypotonischem Medium relativ unabhängig von deren Zusammensetzung und der Art des Osmolyten ist. Damit sind Vesikel selbstständig in der Lage, osmotischen Stress in ihrer Umgebung mittels Phasenseparation und Porenbildung zu regulieren. Diese Beobachtungen legen nahe, dass diese durch osmotischen Druck induzierte Phasentrennung und lokale transiente Porenöffnung als eine Art Mechanosensor für große Konzentrationsunterschiede an Osmolyten angesehen werden kann, sodass Zellen nicht nur ausschließlich auf das Vorhandensein von Ionenkanälen zur Anpassung an osmotische Druckdifferenzen angewiesen sind.<sup>[57,82,83]</sup>

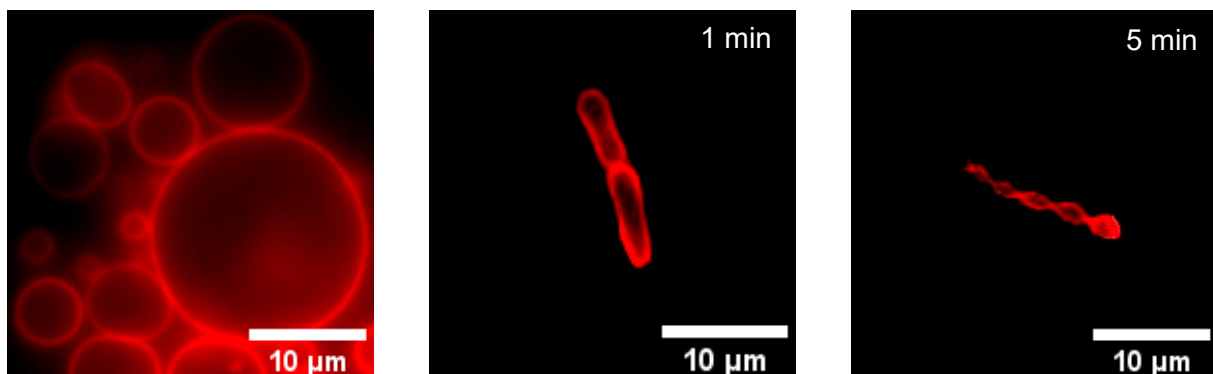
Anders verhält es sich bei einer Umkehr des osmotischen Drucks. Aufgrund der höheren Osmolytkonzentration außerhalb des Vesikels diffundiert Wasser über die Membran zur Regulation des Konzentrationsgradienten. Dadurch verringert sich das Volumen des Vesikels, sodass eine Formveränderung stattfindet. Die resultierende Form unterscheidet sich deutlich von der vorherigen sphärischen Topologie und ist abhängig von der Geometrie und der Ladung der Lipidmoleküle und damit der Membranzusammensetzung.<sup>[60,61,84]</sup>

Die geometrische Form eines Vesikels in einer hypertonischen Lösung kann mithilfe einer Erweiterung des von HELFRICH entwickelten Elastizitätsmodells für heterogene Membranen über ein *area difference elasticity* (ADE) Modell beschrieben werden, dessen Energie wie folgt definiert ist:<sup>[60,84]</sup>

$$E_{ADE} = \frac{K_b}{2} \oint (C_1 + C_2 - 2C_0)^2 dA + \frac{\pi K_G}{2AD^2} (\Delta A - \Delta A_0)^2 \quad (4.2)$$

Jede Oberfläche kann mit zwei Krümmungsradien ( $C_1$  und  $C_2$ ), welche sich aus dem lokalen Hauptkrümmungsradius ergeben ( $C_i = 1/R_i$ ), charakterisiert werden. Die mittlere ( $H = (C_1 + C_2)/2$ ) und die GAUßsche-Krümmung ( $K = C_1 \cdot C_2$ ) sind ebenfalls über  $C_i$  definiert.  $C_0$  entspricht der spontanen bzw. bevorzugten Krümmung der Membranoberfläche, die sich aus der Asymmetrie von zwei nebeneinanderliegenden Monoschichten verschiedener Lipidzusammensetzung ergibt. Im symmetrischen Fall ist  $C_0 = 0$ .  $K_b$  und  $K_G$  sind die mittlere und lokale GAUßsche Biegesteifigkeiten, die zur Beschreibung von topologischen Übergängen, wie Fusionen oder Vesikelabschnürungen, nötig sind. Die Variable  $D$  gibt die Membrandicke an, während  $\Delta A$  und  $\Delta A_0$  die Flächenunterschiede zwischen den gegenüberliegenden äußeren und inneren Monoschichten innerhalb eines Vesikel aus einer Lipiddoppelschicht im gestressten bzw. im Gleichgewichtszustand entsprechen. Die resultierende geometrische Form eines Lipidvesikels wird durch Minimierung von  $E_{ADE}$  für vorgegebene Werte für die Flächen, Volumina und Krümmungen der verschiedenen Geometrien erhalten. Diese Werte sind zudem abhängig von den Umgebungsparametern, wie der Temperatur sowie dem hydrostatischen und dem osmotischen Druck.<sup>[60,84]</sup> Die Reaktion auf osmotische Druckdifferenzen ist für eine komplexer aufgebaute Membran aus verschiedenen Lipiden wesentlich schwieriger vorherzusagen, da weitere Variablen, wie die GIBBS-Energie der lateralen Phasenseparation und die Energie der Linienspannung zwischen den Domänen neben der Elastizität wichtige Rollen für die ausgebildete Geometrie spielen. Dabei können sich einzelne Domänen aus einem Vesikel wölben, da die Linienspannung bei einer möglichst kleinen Domänengrenze am geringsten ist und diese den Term der Biegeenergie überwiegt,

weshalb eine erhöhte Krümmung in Kauf genommen werden kann. Die Tendenz zur Koaleszenz dieser ausgebeulten Domänen nimmt aufgrund der Deformationen der sie umgebenden restlichen Membran deutlich ab. Durch Untersuchung einer Mehrkomponentenmembran aus Phospholipiden und Cholesterin bei steigendem osmotischem Druck konnte diese Theorie bestätigt werden. Die Vesikel dieses Systems verkleinern sich bei irreversibler Änderung ihrer Topologie, welche zur Bildung von mehreren kleineren Vesikeln führt, die teilweise mit dem ursprünglichen Vesikel verbunden sind, sich aber auch von diesem abspalten können. Abbildung 4.4 zeigt dieses Verhalten eines solchen komplexen Lipidsystems unter dem Einfluss einer zugegebenen hochkonzentrierten Saccharose-Lösung.



**Abbildung 4.4:** Zeitabhängige fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von GUVs aus POPC:SM:Cholesterin (1:1:1) markiert mit 0,5 mol% *N*-Rh-DHPE, welche in Wasser präpariert und nachfolgend in eine Saccharose-Lösung (1 M) gegeben wurden.

Zellmembranen *in vivo* besitzen neben der Lipiddoppelschicht noch weitere Strukturen, wie das membrangebundene Zytoskelett, und auch das makromolekulare „Crowding“, also die hohe intrazelluläre Dichte an Makromolekülen, die zum osmotischen Druck beitragen können.

#### 4.4 Zusammenfassung

Diese Studie zeigt, dass Lipidmembranen auf Druckänderungen hydrostatischer und osmotischer Natur verschieden reagieren. Eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks führt zur Stabilisierung des Zustands mit dem kleinstmöglichen Volumen, welcher durch Änderungen der Konformation und Hydratisierung erreicht wird. Abgesehen von einer ausgeprägten Kontraktion im Bereich der Kohlenwasserstoffketten, kommt es zu keiner deutlichen Änderung der Doppelschicht in longitudinaler Richtung. Entsprechend hohe Drücke induzieren einen Phasenübergang von einer fluiden in eine Gelphase durch eine steigende Packungsdichte und der resultierenden partiellen Dehydratisierung des Glycerin-Rückgrats.

Vesikel aus domänenbildenden Lipidmischungen, welche in hypotonische Lösungen transferiert wurden, neigen zu „*swell-burst*“-Zyklen, in welchen kurzzeitige Phasenseparationen und Porenbildungen zum Ausgleich des Konzentrationsgradienten genutzt werden. Es ist zu erwarten, dass diese Änderungen der Membranzusammensetzung die Konformation und damit die Funktion membranassoziierte Proteine, wie Ionenkanäle, beeinflusst und die Lipidmembran somit als Sensor für sich drastisch ändernde Umweltbedingungen fungieren kann. Ebenso könnten im Laufe der Evolution proteinlose Protozellen diesen Mechanismus verwendet haben, um osmotischen Stress zu überleben. Die Ausbildung kleinerer Vesikel, ausgelöst durch hypertotonische Lösungen, könnten sich Organismen als ersten Prozess zur Zellteilung zunutze gemacht haben. Ein zukünftiges Forschungsgebiet besteht darin, zu untersuchen, in wie weit Zellmembranen die Wahrnehmung und Regulation von osmotischem Stress kompletter Zellsysteme beeinflussen.

# Einfluss eines antimikrobiellen Peptids auf bakterielle Membranen unter Hochdruck

---

Die folgenden Ergebnisse sind bereits in Physical Chemistry Chemical Physics 25 (2023), 11185-11191 veröffentlicht.

## 5.1 Einleitung

Kationische antimikrobielle Peptide (cAMPs) sind eine Klasse aus kurzen Peptiden mit einem hohen Anteil an hydrophoben und basischen Aminosäuren in einem Verhältnis von 1:1 oder 1:2.<sup>[50,85]</sup> Sie zeigen nicht nur eine antibakterielle Wirkung, sondern wirken auch gegen Viren, Pilze und Tumorzellen.<sup>[85]</sup> Diese Peptide können die „*droplet*“-Struktur von membranlosen Organellen bestehend aus Proteinen und Nukleinsäuren, welche als Modelle für intrazelluläre Organisation verwendet werden, stören, sodass diese aggregieren und nicht mehr für zelluläre Prozesse zur Verfügung stehen.<sup>[86]</sup> Ebenso verhindern sie die Ausbildung sogenannter Fibrillen des Proteins  $\alpha$ -Synuclein, das bei der Entstehung der neurodegenerativen Krankheit Alzheimer eine wichtige Rolle spielt.<sup>[87]</sup> Bisherige Studien zeigen, dass cAMPs Krankheitserreger beeinflussen, indem sie deren schützende Lipidmatrix zerstören oder durch diese diffundieren und dann mit intrazellulären Komponenten wechselwirken.<sup>[88]</sup> Eine Selektivität gegenüber bakteriellen Pathogenen wird durch deren Membranzusammensetzung erreicht. In bakteriellen Membranen befinden sich mehrere negativ geladene Kopfgruppen wie Phosphatidylglycerol (PG) oder Cardiolipin. In der Zellmembran von *Escherichia coli* wurde beispielsweise ein PG-Anteil von über 20 % gefunden, während eukaryotische Zellmembranen in ihrem extrazellulären Teil der Doppelschicht keine Ladung aufweisen.<sup>[50]</sup> Da Bakterien außerdem keine spezifischen Rezeptoren gegenüber diesen Peptiden besitzen, sind sie von großem Interesse bei der Erforschung neuer Antibiotika, Kosmetika und der Lebensmittelkonservierung.<sup>[89-92]</sup> Zurzeit wird in der Lebensmittelherstellung auf spezielle Chemikalien, wie Nitrite oder Benzoate, zurückgegriffen, die zwar pathogene Bakterien vernichten, aber auch die Qualität der Lebensmittel senken und teilweise schädlich für Menschen sein können, wenn sie

nicht vor dem Verzehr gründlich genug entfernt werden.<sup>[90]</sup> Zusätzlich haben einige Bakterienstämme bereits Resistenzen gegenüber diese weit verbreiteten Mittel aufgebaut.<sup>[93]</sup> Kationische antimikrobielle Peptide sind somit geeignete Alternativen, da sie nicht nur unschädlich für Menschen sind, sondern auch die Lebensmittelqualität nicht beeinflussen.<sup>[90]</sup>

Eine andere bekannte Methode zur Konservierung von Nahrungsmitteln ist die thermische Behandlung (Pasteurisierung), welche allerdings einen Nährstoffverlust oder die Bildung von toxischen Stoffen zur Folge haben kann.<sup>[94]</sup> Aufgrund dessen wurde in den 1990er Jahren in Japan die Hochdruckbehandlung zur Lebensmittelkonservierung eingeführt. Dabei werden Nahrungsmittel für mehrere Minuten bei 20 °C unter 3 bis 7 kbar inkubiert, sodass Zellorganellen von Pathogenen, wie Membranen oder endogene Proteine, zerstört und somit unschädlich gemacht werden.<sup>[94-96]</sup> Diese Art der Behandlung wurde bereits von der europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) beurteilt, mit der Schlussfolgerung, dass Krankheitserreger (im Besonderen *Listeria monocytogenes*) ohne große Auswirkungen auf Geschmack, Erscheinungsbild und Nährwertgehalt der Nahrung effektiv abgetötet werden.<sup>[97]</sup>

Da eine vollständige mikrobielle Inaktivierung in manchen Fällen mit einer Hochdruck-Behandlung nicht erreicht werden kann, sind bestimmte Zusätze sinnvoll, die speziell gegen druckresistente Keime wirken. Diese Idee ist Grundlage der hier vorgestellten Studie, in welcher die Interaktion einer bakteriellen Modellmembran bestehend aus den Lipidkopfgruppen PE und PG (80:20) mit einem kationischen antimikrobiellen Peptid unter Hochdruck untersucht wird.

Das hier verwendete Peptid (P)GKY20 besitzt eine Ladung von +5 bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 (s. Abb. A2). Ursprünglich wurde dieses Peptid aus dem C-terminalen Ende des Thrombin gewonnen, welches in Wirbeltieren für die Blutgerinnung zuständig ist.<sup>[98]</sup> Es zeigt gegenüber eukaryotischen Membranen eine geringe hämolytische Aktivität, während es gram-negative Bakterien abtötet, indem es ihre Zellmembranen auflöst.<sup>[99,100]</sup> Vorherige Studien auf Membransystemen mit PC- und PG-Kopfgruppen zeigten unter Normalbedingungen, dass das Peptid mit Membranen spezielle Domänen bildet, die letztlich zur Auflösung der Lipiddoppelschicht führen.<sup>[100]</sup>



## 5.2 Materialien und Methoden

### 5.2.1 Materialien

Die für dieses Projekt verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen sind in Tabelle 5.1 aufgeführt.

Tabelle 5.1: Bezugsquellen der Chemikalien für die Untersuchung eines antimikrobiellen Peptids auf Biomembranen.

<b>Chemikalien</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Chloroform	Merck (Darmstadt, Deutschland)
DOPE	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DOPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Laurdan	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
<i>N</i> -Rh-DHPE	Molecular Probes (Invitrogen, USA)
(P)GKY20	GenScript (Piscataway Township, USA)
POPE	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
POPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Tris	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

### 5.2.2 Probenpräparation

Die Präparation der Liposomen für die DSC-, FT-IR-, CD- und Fluoreszenzspektroskopie-messungen wurde wie in 3.2.2 beschrieben durchgeführt. Bevor die multilamellaren Vesikel für die CD- und Fluoreszenzspektroskopie verwendet wurden, wurden sie mithilfe einer Extrusion durch eine Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 100 nm (Miniextruder, Avanti Lipids, Alabaster, USA) auf eine einheitliche Größe gefiltert, um größere Lichtstreuungseffekte zu vermeiden.

Die GUVs für die Fluoreszenzmikroskopie wurden wie in 4.2.2 auf einem PVA-Gel hergestellt.

### 5.2.3 FOURIER-Transform Infrarot (FT-IR)-Spektroskopie

Ein Austausch der Wasserstoffatome gegen Deuteriumatome der Umgebung des Peptids wurde mithilfe einer Dialyse und einer darauffolgenden Lyophilisation erreicht. Das Peptid und die Lösung aus multilamellaren Vesikeln wurden in 20 mM Tris Puffer in D<sub>2</sub>O bei einem pH-Wert von 7 gelöst, um keine störende Wasserbande im Infrarot-Spektrum der Amid I' Bande zu erhalten. Die Peptidkonzentration während der Messungen lag bei 2 Gewichtsprozent

(7,6 mM). Die entsprechende Vesikelkonzentration betrug 190 mM, sodass ein molares Lipid zu Peptid Verhältnis von 50:1 erreicht wurde. Die Messung wurde an einem Nicolet 6700 Spektrometer (Thermo Fischer Scientific), ausgestattet mit einem durch flüssigen Stickstoff gekühlten MCT-Detektor (HgCdTe), durchgeführt. Jedes Spektrum wurde aus 128 Scans gemittelt, welche zwischen 4000 und 650  $\text{cm}^{-1}$  bei 25 °C detektiert wurden. Mithilfe der Software Omnic 7.2 (Thermo Fischer Scientific) wurden die Spektren nach der HAPP-GENZEL Apodisation bearbeitet. Die Temperatur wurde über ein zirkulierendes Wasserbad mit Thermostat konstant gehalten. Vor und während der Messungen wurde die Probenkammer mit  $\text{CO}_2$ -freier, trockener Luft gespült, um ein möglichst gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen. Eine membrantriebene Diamantstempelzelle (Diacells VivoDac) mit Typ Ila Diamanten wurde an einen automatisierten pneumatischen Druck Controller (Diacells iGM Controller) angeschlossen, sodass Messungen bis 12 kbar durchgeführt werden konnten. Die zusätzlichen Geräte für die Druckapplikation wurden von der Firma Almax easyLab bezogen. Zur Druckkalibrierung wurde Bariumsulfat hinzugegeben. Dieses Pulver ist inert gegenüber einer Vielzahl von biologischen Makromolekülen, wie Proteinen oder Membranen, und zeigt eine drucksensitive Infrarotbande der symmetrischen Streckschwingung des Sulfatanions bei 983,4  $\text{cm}^{-1}$  (1 bar). Die Frequenz dieser Bande steigt linear mit dem Umgebungsdruck bis 50 kbar, sodass diese Bande zur Kalibrierung des angewandten pneumatischen Drucks verwendet werden kann.<sup>[101]</sup> Die Messung der druckabhängigen Scans wurden nach einer 5-minütigen Äquilibration durchgeführt. Für die Datenanalyse wurde die Software Thermo Grams 8.0 (Thermo Fischer Scientific) genutzt, in welcher für jedes Spektrum eine Puffersubtraktion mit anschließender Glättung ausgeführt wurde. Um Änderungen der Sekundärstruktur des Peptids zu erkennen, wurde die Fläche der Amid I' Bande (1700 – 1600  $\text{cm}^{-1}$ ) der Spektren auf 1 normiert. Anzahl und Position der Subbanden wurden aus den Minima der zweiten Ableitung und den Maxima der *FOURIER-self-deconvolution* (FSD) bestimmt. Diese mathematische Operation führt zu einem Spektrum mit reduzierten Halbwertsbreiten der Subbanden, sodass die im ursprünglichen Spektrum zu beobachtende Überlappung korrigiert wird.<sup>[102]</sup> Die Amid I' Bande des Peptids besitzt dabei 6 charakteristische Subbanden, die bestimmten Sekundärstrukturelementen zugeordnet werden können.<sup>[103]</sup> Die relativen Anteile der Sekundärstrukturen wurden durch die Integration der Flächen unter den Hochpunkten der einzelnen Subbanden mittels einer linear kombinierten GAUß-LORENTZ-Funktion bestimmt.

#### **5.2.4 Cirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie**

Zur Messung des Circular dichroismus wurde ein Jasco J-715 Spektrometer der Firma Jasco Corporation aus Tokio verwendet. Eine Quarz-Küvette mit einer optischen Weglänge von 0,1 cm wurde während der Messungen mithilfe eines zirkulierenden Wasserbads auf 25 °C temperiert. Das Peptid wurde in einer Konzentration von 50 µM vermessen und mit einer 2,5 millimolaren Vesikellösung versetzt, um ein Lipid zu Peptid Verhältnis von 50:1 zu gewährleisten. Die Scanrate betrug 50 nm/min mit einer Bandweite von 5 nm und einer Reaktionszeit von 2 s. Jedes Spektrum entstand aus jeweils 5 Akkumulationen, von welchem entsprechend das Spektrum des reinen Puffers oder der Lipidlösung abgezogen wurde. Um Interferenzen des Tris Puffers auszuschließen, wurde für diese Messungen 20 mM Natriumphosphat Puffer (20 mM) mit einem pH-Wert von 7,4 verwendet.

#### **5.2.5 Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC)**

Die DSC-Messungen wurden mit den identischen Geräten wie in 3.2.3 beschrieben durchgeführt. Da DOPE- und DOPG-Vesikel ihren Hauptphasenübergang bei Temperaturen unter 0 °C besitzen, wurden für diese Messungen die Lipide POPE und POPG benutzt. Die Lipidlösung wurde mit einem Massenanteil von 5 % in Tris Puffer hergestellt. Das Peptid wurde nach der Präparation der Liposomen in einem Lipid zu Peptid Verhältnis von 50:1 dazugegeben.

#### **5.2.7 Fluoreszenzspektroskopie**

Für die Messungen der Fluoreszenzemission von Laurdan wurden die gleichen Geräte und Rechnungen wie in 3.2.4 verwendet. Die Lipidkonzentration lag bei 3 mM und wurde mit 2,2 µM Laurdan versetzt. Die Messungen wurden 30 Minuten nach der Inkubation mit dem Peptid gestartet.

#### **5.2.8 Fluoreszenzmikroskopie**

Mithilfe der in 3.2.7 beschriebenen Apparatur konnten GUVs aus der Mischung DOPE und DOPG unter Einfluss des Peptids visualisiert werden. Der verwendete Fluorophor *N*-Rhodamin-DHPE lag in einem molaren Verhältnis von 1:500 gegenüber der 1 mg/mL konzentrierten Lipidmischung vor. Das Peptid wurde aus einer 1 mM Stammlösung dazugegeben. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde.

## 5.3 Ergebnisse und Diskussion

### 5.3.1 Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC)

Der Einfluss des Peptids (P)GKY20 auf die Stabilität und die thermodynamischen Eigenschaften einer bakterielle Modellmembran aus POPE:POPG (80:20) kann mithilfe von DSC-Experimenten bestimmt werden. Abbildung 5.1 zeigt die DSC-Scans einer Lösung aus multilamellaren Vesikeln dieser Membran vor und nach der Zugabe des Peptids bei einem Lipid zu Peptid Verhältnis von 50:1 nach 90 Minuten und 24 Stunden Inkubationszeit. Für dieses Experiment wurden die Lipide mit jeweils einer gesättigten Fettsäurekette verwendet, da ihre Phasenübergänge im Gegensatz zu denen von DOPE und DOPG oberhalb von 0 °C liegen.

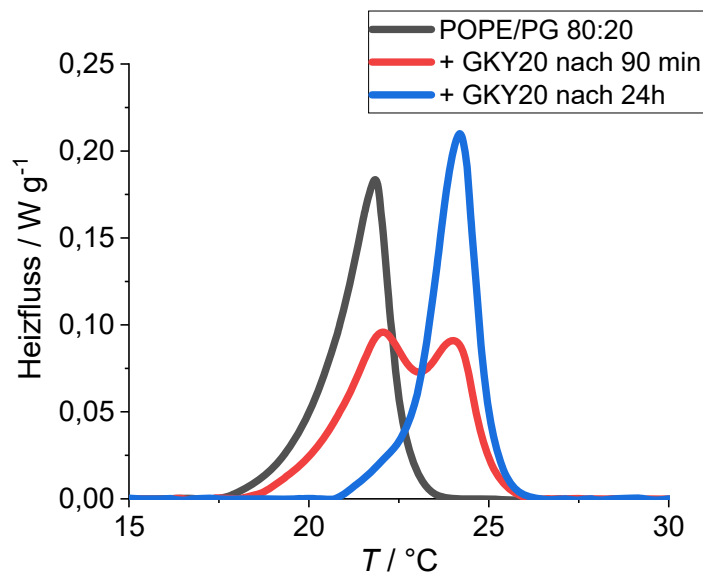


Abbildung 5.1: DSC-Thermogramme von POPE:POPG (80:20) Vesikeln in Abwesenheit (schwarz) und Gegenwart des Peptids GK Y20 in einem Verhältnis von 50:1 nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten (rot) und 24 Stunden (blau).

Der Phasenübergang des reinen Lipidsystems von der Gelphase in die fluide  $L_{\alpha}$ -Phase wird bei einer Temperatur von  $21,8 \pm 0,1$  °C induziert und geht mit einer Enthalpieänderung von  $\Delta H_m = 20,5 \pm 0,2$  J/g in Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Literaturdaten einher.<sup>[104,105]</sup> Die Zugabe des Peptids führt nach kurzer Inkubation zu zwei Peaks im Thermogram bei  $21,9 \pm 0,1$  und  $24,2 \pm 0,1$  °C, während ein längerer Zeitraum wieder zur Bildung eines einzelnen Peaks bei  $24,2 \pm 0,1$  °C führt. Diese Daten verdeutlichen, dass das Peptid eine Umverteilung der Lipide innerhalb der Doppelschicht induziert. Ein wahrscheinlicher Mechanismus ist die elektrostatische Wechselwirkung des positiv geladenen Peptids mit den anionischen PG-Kopfgruppen, welche zur Bildung von Lipiddomänen führt, die sich durch eine höhere Phasenübergangstemperatur auszeichnen wie es bereits für ähnliche Lipidmischungen

beobachtet wurde.<sup>[100]</sup> Damit stabilisiert GKY20 die Gelphase der bakteriellen Modellmembran durch Bindung an die Vesikeloberfläche. Da die Enthalpieänderungen der Phasenübergänge, welche sich aus der integrierten Fläche der Hochpunkte ergeben, mit  $21,2 \pm 0,5$  J/g nach 90 Minuten bzw.  $20,3 \pm 0,2$  J/g nach 24 Stunden nahezu konstant bleiben, kann davon ausgegangen werden, dass das Peptid an der Oberfläche der Membran lokalisiert ist und keine Penetration stattfindet.

### 5.3.2 FT-IR-Spektroskopie an Lipiden

Um diese These zu untermauern, wurden die symmetrische ( $2854 \text{ cm}^{-1}$  bei 1 bar) und asymmetrische ( $2925 \text{ cm}^{-1}$  bei 1 bar) Streckschwingungen der  $\text{CH}_2$ -Gruppen innerhalb der hydrophoben Alkylkettenregion der Modellmembran unter dem Einfluss des Peptids und erhöhtem Umgebungsdruck untersucht. Die Positionen dieser Banden sind abhängig von der Konformation der Kohlenwasserstoffketten, sodass Änderungen des *trans*- zu *gauche*-Verhältnisses mit dieser Methode detektiert werden können.<sup>[106]</sup> In Abbildung 5.2 ist die Wellenzahl der jeweiligen  $\text{CH}_2$ -Streckschwingung des reinen Lipidsystems DOPE:PG und unter Zugabe des Peptids GKY20 in einem molaren Verhältnis von 50:1 gegen den Druck aufgetragen.

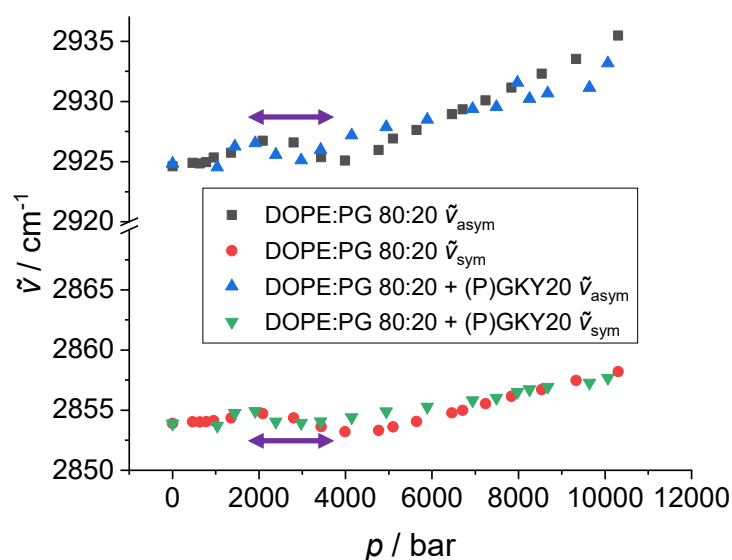
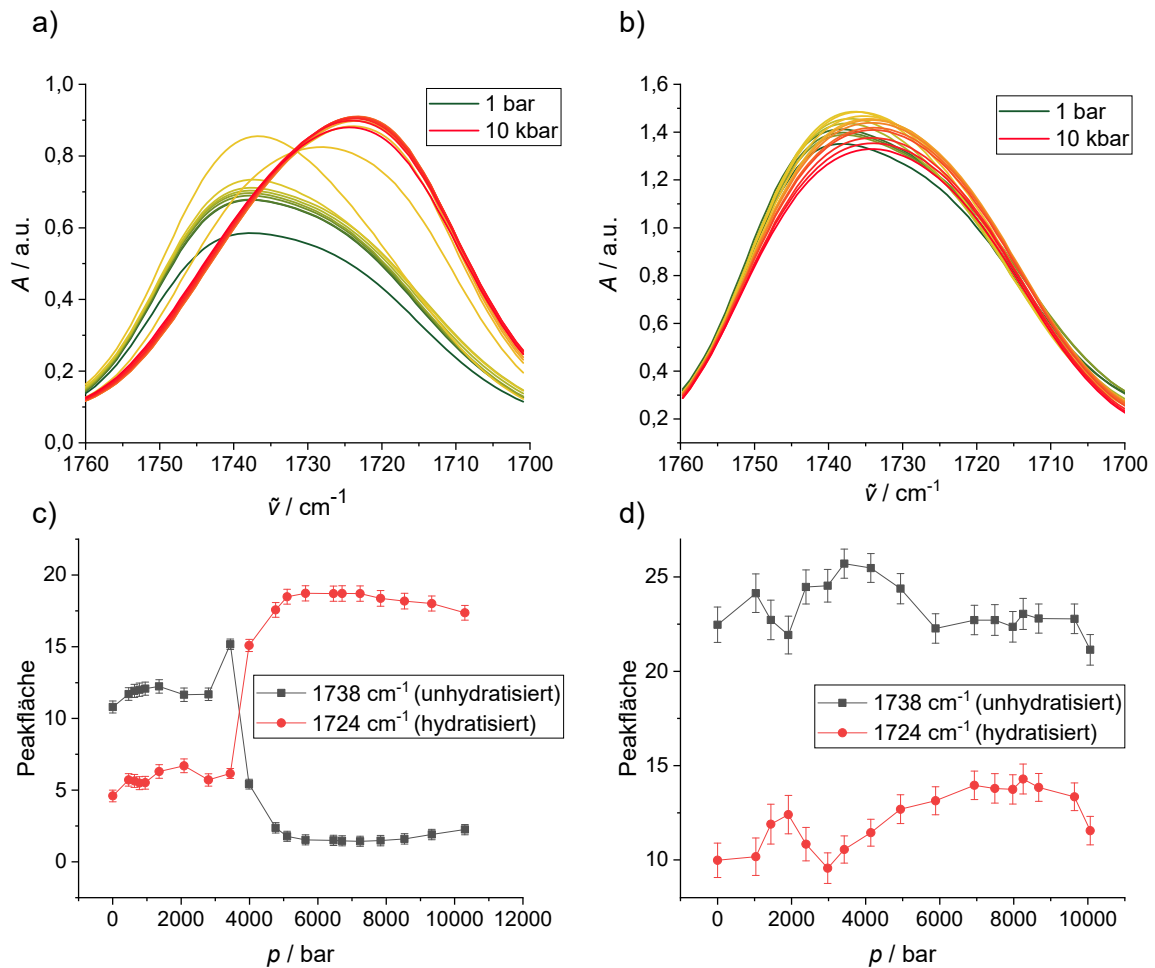


Abbildung 5.2: Druckabhängige Wellenzahlen der Maxima der verschiedenen  $\text{CH}_2$ -Streckschwingungen des Lipidsystems DOPE:DOPG (80:20) in An- und Abwesenheit des Peptids GKY20 in einem molaren Verhältnis von 50:1.

Wenn Lipidmembranen unter Druck einer rein elastischen Kompression unterliegen, erhöht sich die Wellenzahl der Banden linear mit steigendem Druck.<sup>[106]</sup> Eine Änderung dieser Steigung, wie hier zwischen 2 und 4 kbar, weist auf einen druckinduzierten Phasenübergang

von der fluiden ( $L_{\alpha}$ ) in eine Gelphase ( $L_{\beta}$ ) hin. Dieser Übergang in einem ähnlichen Druckbereich wurde bereits für reine DOPE-Liposomen beobachtet.<sup>[42]</sup> Die Zugabe von (P)GKY20 führt zu geringeren Phasenübergangsdrücken, sodass wie in 5.3.1 eine Stabilisierung der Gelphase stattfindet. Ebenso unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass das Peptid selbst unter hohen Drücken ausschließlich mit der Membranoberfläche wechselwirkt, da eine mögliche Penetration der Membran einen deutlich Einfluss im Bereich der Alkylketten bedingen würde, die anhand dieser Ergebnisse aber ausgeschlossen werden kann.

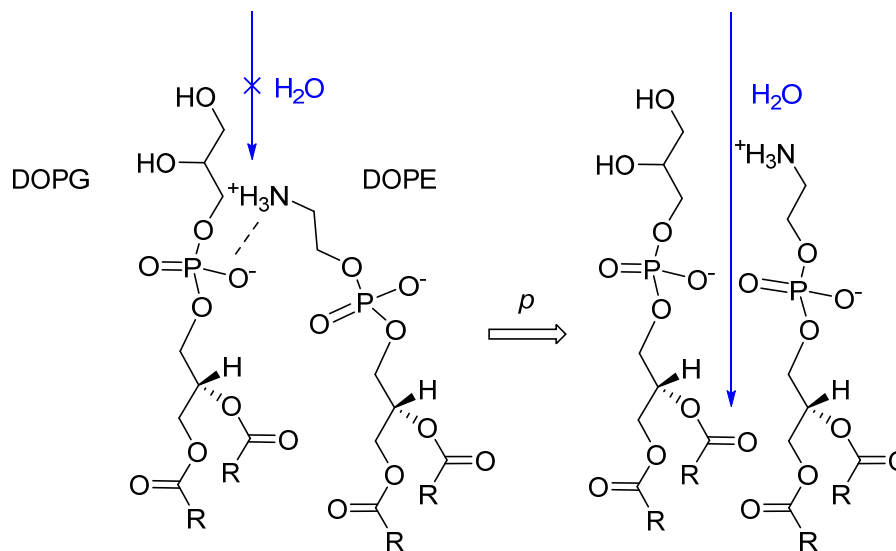
Eine weitere charakteristische Lipidbande in der FT-IR-Spektroskopie ist die Carbonyl-Streckschwingung ( $C=O$ ), welche bei ungefähr  $1735\text{ cm}^{-1}$  auftritt (s. Abb. 5.3 a),b)). Lipidmoleküle besitzen an ihrer *sn*-1- und an ihrer *sn*-2-Fettsäure jeweils eine Carbonyl-Gruppe, deren Wellenzahlen sich nur um wenige inverse Zentimeter voneinander unterscheiden, sodass sie im Infrarot-Spektrum ein breites Maximum bilden. Die Position der  $C=O$ -Bande verschiebt sich zu niedrigeren Wellenzahlen, wenn diese funktionelle Gruppe Wasserstoffbrückenbindungen mit dem umgebenden Lösemittel ausbildet, weshalb sie den Hydratationsgrad der Membran angibt.<sup>[106–108]</sup> Zur Quantifizierung des Verhältnisses gebundener und ungebundener Carbonylgruppen wurden die beiden Maxima mit einer GAUSSIAN-Funktion angepasst und integriert. Die resultierenden Flächen unter den Peaks geben die jeweilige Anzahl dieser Gruppen an. Dabei wurden die Maxima den Wellenzahlen  $1724\text{ cm}^{-1}$  für die gebundenen und  $1738\text{ cm}^{-1}$  für die ungebundenen Carbonyle zugeordnet. Die gemessenen Carbonylbanden der reinen bakteriellen Modellmembran und unter dem Einfluss von (P)GKY20 sowie die resultierenden Peakflächen in Abhängigkeit des Drucks sind in Abbildung 5.3 aufgeführt.



**Abbildung 5.3:** Druckabhängiges FT-IR Spektrum der Carbonyl-Streckschwingung von Vesikeln aus a) DOPE:PG (80:20) und b) unter dem Einfluss von (P)GKY20 bei einem Lipid zu Peptid Verhältnis von 50:1 bei 25 °C sowie die resultierenden Peakflächen der unhydratisierten und hydratisierten Gruppen c) der reinen Membran und d) nach Zugabe des Peptids.

Bei niedrigen Umgebungsdrücken bis 3 kbar ist die Bande des unhydratisierten Carbonyls bei 1738  $\text{cm}^{-1}$  deutlich größer als die des gebundenen, was auf eine hohe Packungsdichte der Membran unter diesen Bedingungen hindeutet. Eine weitere Druckerhöhung ändert dieses Verhältnis drastisch, sodass die Anzahl an gebundenen Carbonylen überwiegt. In diesem Druckbereich wurden auch Änderungen innerhalb der  $\text{CH}_2$ -Streckschwingungen detektiert (s. Abb. 5.2). Dieses Ergebnis ist im Vergleich zu anderen Membransystemen sehr ungewöhnlich, da normalerweise eine Druckerhöhung die Bildung einer kompakten und geordneten Lipidphase induziert, welche unter anderem von der Abnahme der Hydratation im Bereich der C=O-Gruppen begleitet ist.<sup>[106]</sup> Theoretische Simulationen dieser Modellmembran zeigten, dass bei niedrigem Umgebungsdruck die Doppelschicht in der fluiden Phase vorliegt, in welcher Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Kopfgruppen beobachtet werden können. Dabei können die negativ geladenen Phosphatgruppen der Phosphoglycerine

Wasserstoffbrückenbindungen mit der positiv geladenen  $\text{NH}_3^+$ -Gruppe der Phosphoethanolamine ausbilden, sodass die Aufnahme von Wassermolekülen in die Membran gehindert wird.<sup>[109,110]</sup> In der geordneten Gelphase, welche die Doppelschicht durch Druckerhöhung einnimmt, sind die Kopfgruppen der Lipide senkrecht zur Membranoberfläche orientiert, um eine höhere Packungsdichte erreichen zu können. Dadurch bricht die Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Lipidkopfgruppen und Wassermoleküle können zu den Carbonylgruppen gelangen, weshalb die Bandenintensität bei  $1724\text{ cm}^{-1}$  zunimmt. Dieses Membranverhalten ist schematisch in Abbildung 5.4 gezeigt.



**Abbildung 5.4:** Schematische Abbildung der Lipidkopfgruppeninteraktion zwischen DOPG und DOPE in Abhängigkeit des Drucks. R steht für die Fettsäurekette der Ölsäure.

Die Zugabe des Peptids verhindert eine druckinduzierte Orientierungsänderung der Kopfgruppen, da im gesamten Druckbereich keine Verschiebung des Bandenverhältnisses erkennbar ist (s. Abb. 5.4 b), d)). Diese Ergebnisse bestätigen die Interaktion des Peptids mit der Membranoberfläche bis zu 10 kbar, da das Hydratationsniveau der Carbonylgruppen konstant bleibt.

### 5.3.3 Fluoreszenzspektroskopie

Zur weiteren Analyse des Einflusses von (P)GKY20 auf die Kopfgruppenregion der Membran wurden fluoreszenzspektroskopische Experimente mit dem Fluorophor Laurdan durchgeführt. Als solvatochromer Farbstoff mit amphiphiler Struktur gibt eine druckabhängige Verschiebung seines Emissionsmaximums eine Änderung der lateralen Ordnung und Hydratation der Membran an.<sup>[111]</sup> In Abbildung 5.5 ist der  $GP$ -Wert (s. Gleichung 3.1) von Laurdan in DOPE:DOPG (80:20) Liposomen bei konstanter Temperatur ( $20\text{ °C}$ ) in Abhängigkeit des



Drucks und unter Zugabe verschiedener Konzentrationen des Peptids GKY20 (0, 1, 2, 10  $\mu\text{M}$ ) gezeigt.

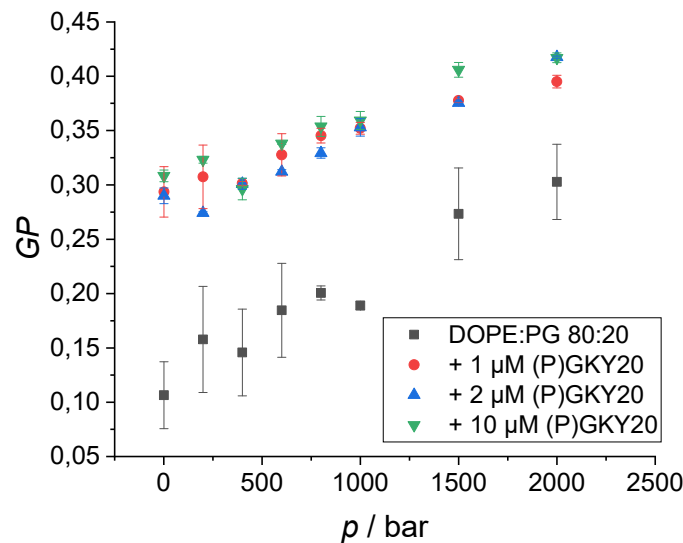


Abbildung 5.5: Druckabhängiger  $GP$ -Wert von Laurdan in DOPE:DOPG (80:20) Liposomen unter Zugabe verschiedener Konzentrationen (P)GKY20 bei 20  $^{\circ}\text{C}$ .

Die reine Lipiddoppelschicht weist einen geringen  $GP$ -Wert von 0,1 bei 1 bar Umgebungsdruck auf, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Membran in der fluiden  $L_{\alpha}$ -Phase vorliegt. Eine Steigerung des Drucks bis zu 2 kbar erhöht diesen Wert in einem linearen Verhältnis, sodass die laterale Ordnung der Membran unter Druck ebenfalls erhöht wird, um ein kleineres Volumen einnehmen zu können. Diese Adaption wurde bereits mehrfach für verschiedene Membransysteme beobachtet.<sup>[42,64,71,111]</sup> Unabhängig von dessen Konzentration, führt eine Zugabe von (P)GKY20 zu einer signifikanten Steigerung des Ordnungsparameters bei einem Umgebungsdruck von 1 bar. Zusätzlich steigt der  $GP$ -Wert weiterhin mit erhöhtem Druck. Somit besitzt das Peptid selbst bei geringen Konzentrationsverhältnissen von 3000:1 die Fähigkeit zur Versteifung und Dehydratisierung der Membran in einem Druckbereich bis mindestens 2 kbar.

Nach Analyse der Carbonylgruppen- und Kopfgruppenhydratation kann davon ausgegangen werden, dass (P)GKY20 bevorzugt mit der Membranoberfläche und somit den Lipidkopfgruppen wechselwirkt. Detailliertere Informationen über diesen Bindungsprozess könnten *molecular dynamics* (MD)-Simulationen liefern. Die in diesem Projekt verwendeten Systeme wurden zum Stand der Veröffentlichung dieser Arbeit noch nicht mithilfe solcher computergestützten Methoden untersucht. Ähnliche Moleküle wie (P)GKY25 und das Modell

Lipid A zeigten in Simulationen Interaktionen zwischen der Phosphatgruppe des Lipids mit der Aminosäuresequenz KYGFY, welche auch in (P)GKY20 vorhanden ist.<sup>[98]</sup> Eine ähnliche Studie kam zu dem Ergebnis, dass die Seitenketten K2, T7, H8, R11, K13 und K14 des (P)GKY25 an der Kopfgruppe des Modelllipids binden. Die aromatischen Aminosäuren Y3, F5, Y6 und F10 konnten in die Grenzfläche der Lipiddoppelschicht zwischen Kopfgruppe und Kohlenwasserstoffketten interkalieren.<sup>[112]</sup> Da in der hier verwendeten Membran ebenfalls Phospholipide verwendet werden, kann von einer ähnlichen Interaktion ausgegangen werden, sodass (P)GKY20 in der Nähe dieser Region der Doppelschicht aufzufinden ist.

### 5.3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung möglicher Topologieänderungen von GUVs durch die Zugabe des (P)GKY20 und zusätzlicher Druckerhöhung wurden Vesikel der bakteriellen Modellmembran mithilfe des Farbstoffes *N*-Rhodamin-DHPE angefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

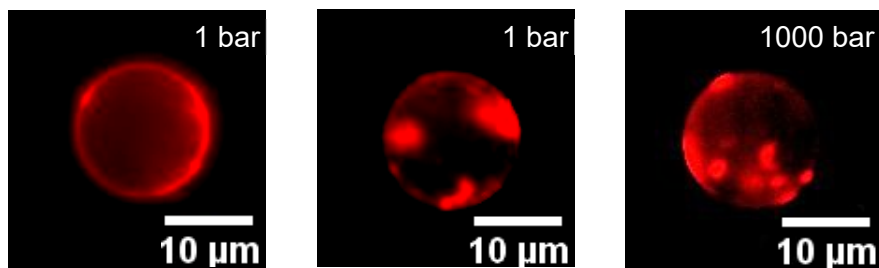


Abbildung 5.6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von GUVs bestehend aus DOPE:DOPG (80:20) markiert mit *N*-Rhodamin-DHPE unter 1 bar (links, Mitte) und 1 kbar (rechts) sowie unter dem Einfluss von (P)GKY20 (Mitte, rechts) in einem Lipid zu Peptid Verhältnis von 50:1.

Weder die Zugabe des Peptids noch die Druckapplikation haben einen Einfluss auf die Vesikeltopologie. Die zu beobachtenden Domänen entstehen vermutlich aufgrund der bevorzugten Wechselwirkung zwischen dem verwendeten Lipidanker am Fluorophor und den PE-Lipiden in der Membran. Eine Porenbildung oder ähnliche membranstörende Effekte konnten nicht beobachtet werden. Das Peptid kann somit nicht die Vesikel penetrieren, da dieser Prozess das Aussehen der Vesikel entsprechend verändern würde.

### 5.3.5 Konformationsanalyse des Peptids mittels CD- und FT-IR-Spektroskopie

cAMPs liegen während der Bindung an eine Membran häufig in einer helikalen Struktur vor, welche auch ihre biologische Aktivität sicherstellt.<sup>[50]</sup> In Kombination mit einem ähnlichen Membransystem wurde diese Sekundärstruktur für (P)GKY20 bereits beobachtet.<sup>[100]</sup> Wie in

der vorherigen Studie von OLIVA ET AL wurden auch hier Spektren von zirkular polarisiertem Licht des Peptids in An- und Abwesenheit von Vesikeln gemessen.

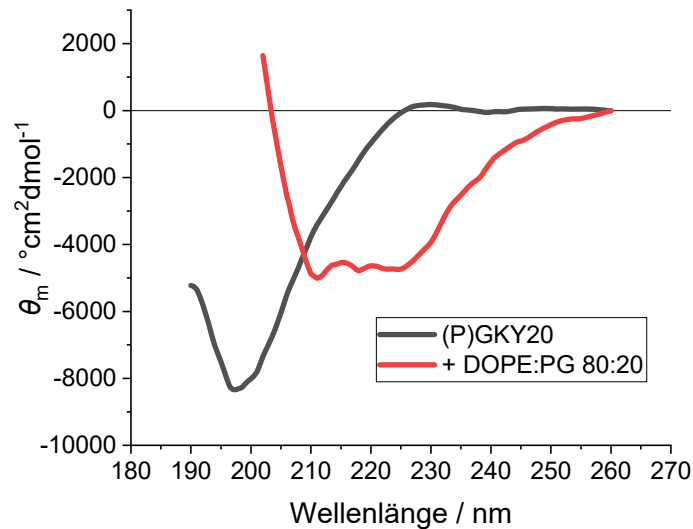
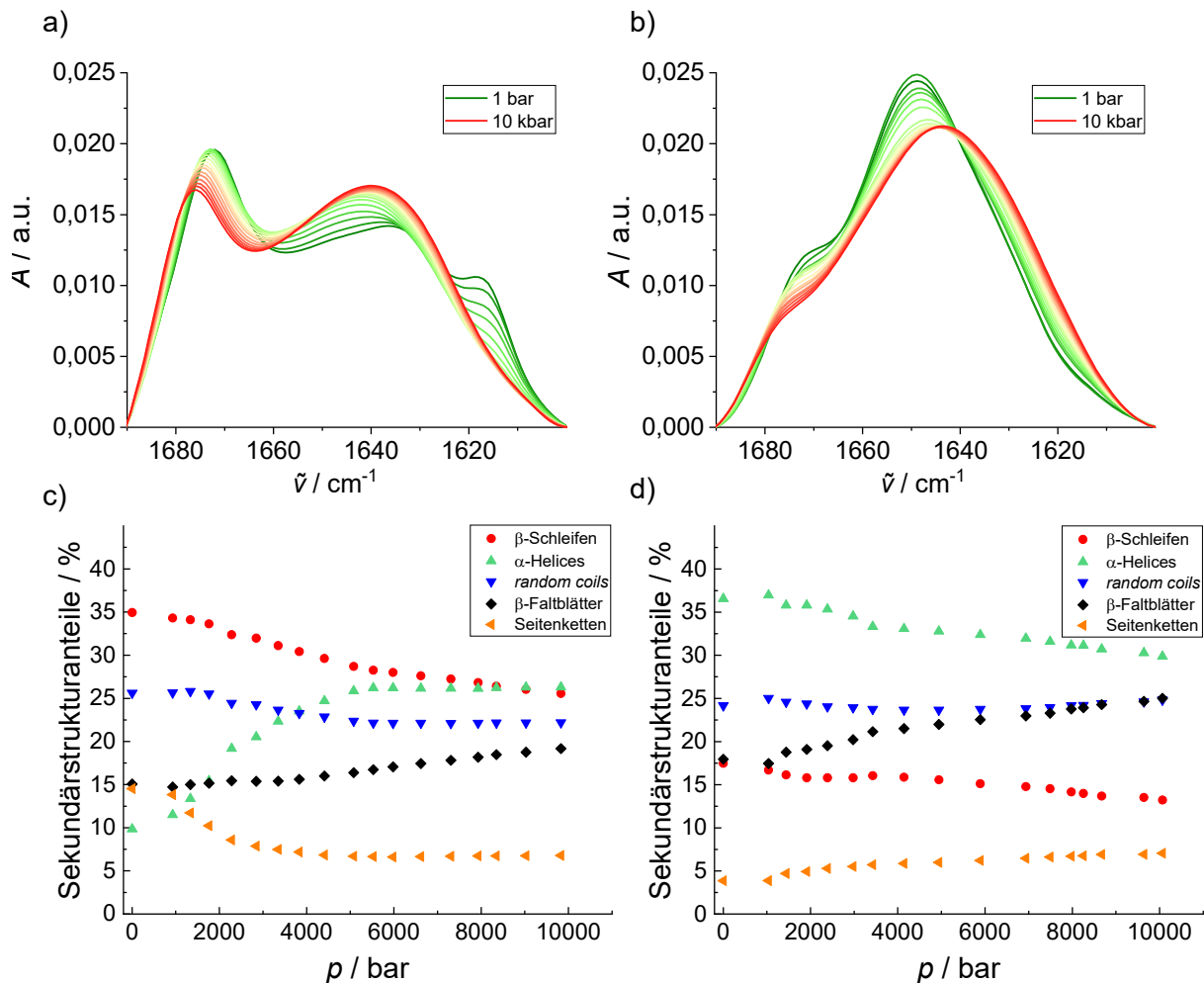


Abbildung 5.7: CD-Spektrum des Peptids GKY20 in Puffer (schwarz) und in Anwesenheit von DOPE:DOPG Vesikeln bei einem Lipid zu Peptid Verhältnis von 50:1 (rot).

Das Spektrum für das Peptid in Puffer zeigt ein Minimum bei 200 nm, welches charakteristisch für eine ungeordnete *random coil* Struktur ist. Die Zugabe der anionischen Vesikel führt zur Bildung eines CD-Couplets bei 210 und 225 nm. Diese Aufspaltung tritt in  $\alpha$ -helikalen Peptidstrukturen auf, was bedeutet, dass GKY20 seine Sekundärstruktur bei Anwesenheit der Vesikel wie andere cAMPs von einem Zufallsknäuel zu einer  $\alpha$ -Helix verändert.

Mittels FT-IR-Spektroskopie können die Sekundärstrukturanteile des Peptids unter Zugabe der Vesikel druckabhängig betrachtet werden. Dazu wurden die Subbanden der Amid I' Bande des Peptids analysiert (s. 5.2.3). In der nachfolgenden Abbildung sind die druckabhängigen Spektren dieser Bande in Puffer und unter Einfluss der Vesikel sowie die entsprechende Analyse zur Sekundärstrukturbestimmung dargestellt.



**Abbildung 5.8:** FT-IR-Analyse der Amid I' Bande des Peptids GKY20 bei Abwesenheit (a) und c) und Anwesenheit (b) und d) von DOPE:DOPG (80:20) Vesikeln bei einem Lipid zu Peptid Verhältnis von 50:1. a) und b) zeigen die Druckabhängigkeit der Amid I' Bande (1600 - 1700  $\text{cm}^{-1}$ ), während in c) und d) die relativen Strukturanteile gegen den Druck aufgetragen sind. Dabei wurden folgende Peakpositionen gewählt:  $\beta$ -Schleifen 1672  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\alpha$ -Helices 1654  $\text{cm}^{-1}$ , random coils 1644  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\beta$ -Faltblätter 1631 und 1672  $\text{cm}^{-1}$  und Seitenketten 1616  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>[103]</sup> (Analyse durchgeführt von M. JAWOREK)

Die Strukturanalyse zeigt, dass in dem Peptid GYK20 in Puffer bei 1 bar Umgebungsdruck hauptsächlich  $\beta$ -Schleifen und ungeordnete *random coil* Strukturen vorliegen, wie bereits in der Analyse des CD-Spektrums gefunden. Die Druckapplikation führt zu einer Veränderung der relativen Strukturanteile. Die Anteile der  $\beta$ -Schleifen und *random coils* sinken, während der prozentuale Anteil an  $\alpha$ -Helices bei 10 kbar mehr als verdoppelt wird. Dies lässt sich über das geringere partielle Volumen der  $\alpha$ -Helices gegenüber einer ungefalteten Peptidstruktur erklären, sodass diese Sekundärstruktur bei erhöhtem Druck am günstigsten ist.<sup>[113–115]</sup> In Anwesenheit der Vesikel ist der Anteil an Helices besonders häufig und relativ druckstabil. Eine druckinduzierte Bildung von  $\alpha$ -Helices zeigt ebenfalls das membrangebundene Peptid Gramacidin, allerdings nur in der Anwesenheit von Lipiddoppelschichten.<sup>[116]</sup> Diese Sekundärstruktur der cAMPs ist essentiell für ihre Aktivität, weshalb die Induzierung von  $\alpha$ -

Helices mittels Druckerhöhung vor der Zugabe von Membranen ihre antimikrobielle Wirkung deutlich effizienter gestalten könnte. In der Literatur lassen sich einige Beispiele zur Stützung dieser These finden. Beispielsweise weisen das Protein Lysozym und das Peptid Nisin auf *E.coli* mittels Hochdruck eine erhöhte biologische Aktivität *in vivo* auf.<sup>[117]</sup> Lactoferrin und dessen Derivate hemmen ebenfalls gram-positive Bakterien in fleischhaltigen Lebensmitteln unter Erhöhung des Drucks.<sup>[118]</sup>

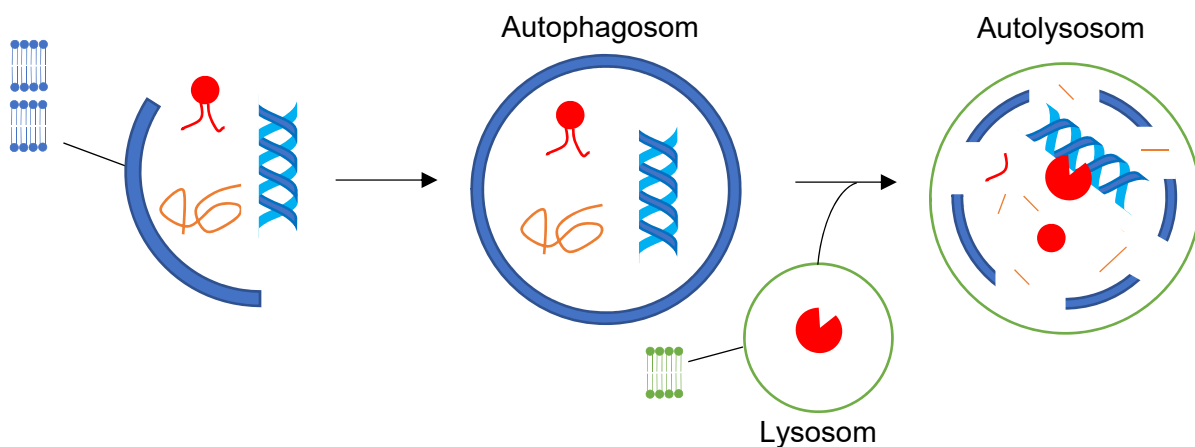
#### **5.4 Zusammenfassung**

Zusammenfassend demonstriert dieses Projekt, dass das cAMP (P)GKY20 mit bakteriellen Modellmembranen aus PE- und PG-haltigen Lipiden hauptsächlich mit der hydrophilen Membranoberfläche interagiert. Dabei geht es höchstwahrscheinlich mit den negativ geladenen Molekülgruppen der Lipide elektrostatische Wechselwirkungen ein. Dadurch wird eine kompaktere Membran erhalten, da das Peptid die intermolekularen Repulsionen zwischen den Kopfgruppen abschirmt. Dabei nimmt es eine helikale Konformation an, welche dem Peptid einen amphiphilen Charakter ermöglicht, um weitere Wechselwirkungen mit den in der Membran befindlichen Lipiden eingehen zu können. Eine weitere Möglichkeit, diese biologisch aktive Struktur bereits in Bulk-Lösung zu induzieren, ist die Anwendung von hohen Umgebungsdrücken, welche bereits in der Lebensmittelverarbeitungstechnologie verwendet wird. Darüber hinaus hat dieser physikalische Parameter keinen negativen Einfluss auf die Interaktion zwischen dem Peptid und der Membran. Somit eröffnet die Kombination aus der Zugabe von antimikrobiellen Peptiden und der Anwendung von Hochdruck neue Möglichkeiten in der Nahrungsmittelkonservierung.<sup>[96]</sup>

# Wirkung von Inducin auf lysosomale Modellmembranen

## 6.1 Einleitung

Das Lysosom ist ein wichtiges Zellorganell, dessen Aufgabe darin besteht, Biopolymere innerhalb der Zelle zu zersetzen. Lysosomen sind aus Lipiden aufgebaute Vesikel mit einem intravesikulären sauren pH-Wert, welcher die Aktivität der hydrolysierenden Enzyme im Innern des Lysosoms erhöht. Diese Vesikel verschmelzen während des Prozesses der Autophagie mit einem sogenannten Autophagosom zu einem Autolysosom, in welchem letztlich Proteine, Nukleinsäuren und Lipide verdaut werden.<sup>[119]</sup> (s. Abb. 6.1)



**Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der Autophagie.** Nach Bildung des Autophagosoms, welches die zu zersetzenden Biomoleküle einkapselt, fusioniert es mit dem Lysosom zu einem Autolysosom. In dessen Innerem werden die Polymere durch hydrolysierende Enzyme in ihre Bestandteile geschnitten.

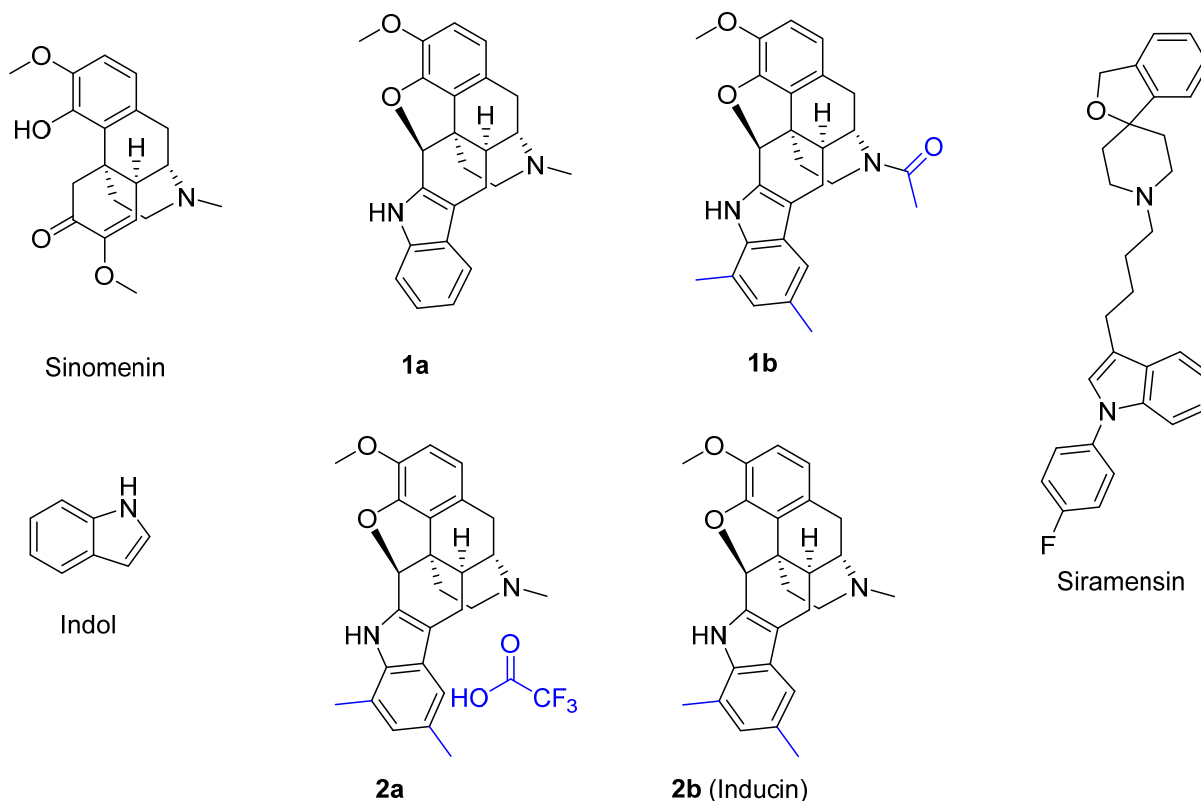
Dieser zellinterne Mechanismus reguliert nicht nur den Abbau alter und defekter Zellbestandteile, sondern spielt auch im Immunsystem von Eukaryoten eine wichtige Rolle. Dabei werden in die Zellen eingedrungenen Viren, Bakterien und deren Proteine mittels Autophagie unschädlich gemacht.<sup>[120,121]</sup> Mittlerweile wurden verschiedene Substanzen gefunden, die einzelne Schritte dieses Prozesses beeinflussen können. Beispielsweise induziert das biogene Polyamin Spermidin die Autophagie in tierischen und menschlichen Zellen, welche durch diese Behandlung eine längere Lebensspanne aufwiesen.<sup>[122]</sup> Die Entstehung

neurodegenerativer Krankheiten wird ebenfalls durch die Autophagie verhindert.<sup>[123]</sup> Allerdings werden auch Substanzen gesucht, die diesen zellulären Prozess inhibieren können, da mehrere Tumorerkrankungen auf diesen Mechanismus zurückgreifen, um sich vor metabolischem Stress zu schützen.<sup>[124]</sup> Das Medikament Chloroquin verhindert die Bildung des Autolysosoms, indem es in Lysosomen diffundieren kann und dort den pH-Wert erhöht, sodass die Aktivität der im Lysosom befindlichen Enzyme massiv verringert wird. Dabei nutzt es nach der Diffusion in das Lysosom das Membranprotein NPC1, welches normalerweise Cholesterin aus der lysosomalen Membran exportiert, um wieder in das pH-neutrale Cytosol zu gelangen und deprotoniert zu werden. Innerhalb des Lysosoms kann es auch an negativ geladene Lipidkopfgruppen binden, die als Erkennungsmerkmal für das Enzym Lipase Verwendung finden. Dadurch können Membranen nicht mehr von dem Enzym abgebaut werden.<sup>[125]</sup> Die Erforschung solcher lysosomotropischer Substanzen, die sowohl aus basischen als auch lipophilen Bestandteilen aufgebaut sind, ist somit in der Medizin von großer Relevanz.<sup>[124–126]</sup>

Die Membran eines Lysosoms enthält eine Vielzahl an unterschiedlichen Lipiden. Den Hauptbestandteil stellen Phosphatidylcholine (PC) und Cholesterin mit einem jeweiligen Anteil von 30 %.<sup>[127]</sup> Zusätzlich befinden sich Sphingolipide, Phosphatidylethanolamine (PE) und die negativ geladenen Phosphatidylinositole (PI) und Bis(monoacylglycero)phosphate (BMP) in geringeren Verhältnissen in dieser Membran. Dabei sind BMP-Lipide ausschließlich in lysosomalen Membranen lokalisiert und dienen der Rekrutierung von Hydrolasen, welche innerhalb des Lysosoms Biomoleküle verdauen.<sup>[128]</sup> Eine weitere Fähigkeit dieser Vesikel ist die Fusion mit Membranen anderer Zellorganellen, wie den Mitochondrien oder dem endoplasmatischen Retikulum. Dabei findet ein Transport von Cholesterin zwischen den Organellen statt.<sup>[6]</sup>

In diesem Projekt wurden verschiedene Substanzen (s. Abb. 6.2), deren molekulare Struktur von dem Naturstoff Sinomenin abgeleitet wurde, auf ihr Verhalten als lysosomotropische Medikamente an Modellmembransystemen getestet. Dabei wurde der Naturstoff, der in der traditionellen chinesischen Naturheilkunde als Mittel gegen Rheuma und Arthritis Verwendung findet, mit verschiedenen Indol-Fragmenten kombiniert.<sup>[129]</sup> Sinomenin weist strukturelle Ähnlichkeiten mit bekannten Opiaten wie Morphin auf, mit dem Unterschied, dass die Stereozentren des Naturstoffs im Vergleich zum Opiat entgegengesetzt konfiguriert sind. Dies führt zu unterschiedlichen biologischen Aktivitäten. Nach dem Prinzip der Synthese von pseudo-naturrellen Produkten sind Kombinationen aus Naturstofffragmenten zur Herstellung von bioaktiven Verbindungsklassen erfolgsversprechend.<sup>[130–133]</sup>

Als Modellmembransysteme wurden Vesikel aus POPC:POPG (85:15) und POPC:Cholesterin:SM:POPE:POPI:BMP (30:30:15:11:7:7) bei pH-Werten von 5 und 7,4 hergestellt und mit den zu untersuchenden Stoffen inkubiert. Im Besonderen wurden die Membranfluidität, die laterale Ordnung der Lipide und die Diffusivität durch die Membranen untersucht.



**Abbildung 6.2: Strukturformeln der Naturstoffe Sinomenin und Indol sowie die verschiedenen getesteten Verbindungen.** Die strukturellen Unterschiede der vier ähnlichen Substanzen sind in blau markiert. (synthetisiert und zur Verfügung gestellt von AG ZIEGLER, MPI Dortmund)

Die Substanz **1a** stellt das Grundgerüst der untersuchten Verbindungen dar. Es besitzt ein basisches Stickstoffatom, aber keine hydrophoben Methylgruppen an der Indolgruppe im Gegensatz zu den drei anderen Stoffen. **1b** weist als einzige Substanz kein basisches Stickstoffatom auf, da es Teil einer Amidbindung ist. Die Verbindung **2b**, welche auch Inducin genannt wird, unterscheidet sich von **2a** durch die Abwesenheit von Trifluoressigsäure, die durch eine weitere Aufreinigung entfernt werden konnte. Zusätzlich wurde das Medikament Siramesin als Kontrolle verwendet, da dieser Stoff Lysosomen inaktiviert, indem es als lysosomotropische Verbindung den pH-Wert innerhalb der lysosomalen Membran erhöht. Ob es dabei die lysosomale Membran permeabilisiert, ist noch nicht ausreichend erforscht.<sup>[134–136]</sup>



## 6.2 Materialien und Methoden

### 6.2.1 Materialien

Die für dieses Projekt verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen sind in Tabelle 6.1 aufgeführt.

Tabelle 6.1: Bezugsquellen der Chemikalien für die Untersuchung von Inducin auf Biomembranen.

Chemikalien	Bezugsquelle
Atto-647	ATTO-TEC (Siegen, Deutschland)
BMP (18:1 S,S)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Chloroform	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Cholesterin	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPH	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DPPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
HEPES	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Laurdan	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
N-Rh-DHPE	Molecular Probes (Invitrogen, USA)
POPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
POPE	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
POPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
POPI	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Sphingomyelin	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)

### 6.2.2 Probenpräparation

Die Präparation der LUVs für die Fluoreszenzspektroskopiemessungen wurde wie in 5.2.2 beschrieben durchgeführt.

Die GUVs für die Fluoreszenzmikroskopie wurden wie in 3.2.2 mithilfe der Elektroformation hergestellt. Die Lipide wurden vor Beginn der Präparation in 10 mM HEPES Puffer mit einem pH von 5 oder 7,4, welcher 10  $\mu$ M Atto647 enthielt, hydratisiert. Für beide Membransysteme wurde eine Frequenz von 500 Hz genutzt. Die angelegte Spannung wurde in folgenden Schritten erhöht: 1,4 V für 5 Minuten, 2,5 V für 20 Minuten und 3,5 V für 90 Minuten. Die

Substanzen wurden nach einem Pufferaustausch mit 10 mM HEPES ohne Fluorophor aus 0,1 mM Stammlösungen über ein Schlauchsystem in die Kammer gegeben.

### **6.2.3 Fluoreszenzspektroskopie**

Für die Messungen der Fluoreszenzemission von Laurdan und der Fluoreszenzanisotropie von DPH wurden die gleichen Geräte und Rechnungen wie in 3.2.4 verwendet. Die Lipidkonzentration lag bei 100  $\mu\text{M}$ , während die Fluorophorkonzentration 1  $\mu\text{M}$  betrug. Die Messungen wurden 30 Minuten nach der Inkubation mit den jeweiligen Verbindungen gestartet.

### **6.2.4 Fluoreszenzmikroskopie**

Mithilfe der in 3.2.7 beschriebenen Apparatur konnten GUVs der Membransysteme visualisiert werden. Der verwendete Fluorophor *N*-Rhodamin-DHPE lag in einem molaren Verhältnis von 1:500 gegenüber der 1 mg/mL konzentrierten Lipidmischung vor. Zudem wurden zwei Laser mit Anregungswellenlängen von 561 und 642 nm (L4Cc-CSB-130, Oxxius Simply Light, Lannion, Frankreich) genutzt.

## **6.3 Ergebnisse und Diskussion**

### **6.3.1 Fluoreszenzspektroskopie**

Aufgrund des komplexen Aufbaus der lysosomalen Membran wurde zuerst eine simple Modellmembran aus POPC und POPG (85:15) verwendet, die wie ein Lysosom aus 15 % negativ geladenen Lipiden besteht. Die in diese Vesikel eingebauten Fluorophore Laurdan und DPH liefern wichtige Informationen über die Fluidität und die laterale Ordnung der Membran sowie über die Packungsdichte im Bereich der Kohlenwasserstoffketten. Dabei beschreibt der *GP*-Wert, der mithilfe der Emissionmaximumsverschiebung des Laurdans berechnet werden kann (s. Gleichung 3.1), die laterale Ordnung der Membran im Grenzflächenbereich zwischen Kopfgruppe und Acylketten, während die Anisotropie des DPHs (s. Gleichung 3.2) Rückschlüsse auf die Ordnung innerhalb der Kohlenwasserstoffketten zulässt. Diese Parameter der POPC:POPG Membran in Abhängigkeit der Substanzkonzentration bei 25 °C und pH-Werten von 5 und 7,4 sind in Abbildung 6.3 aufgetragen.

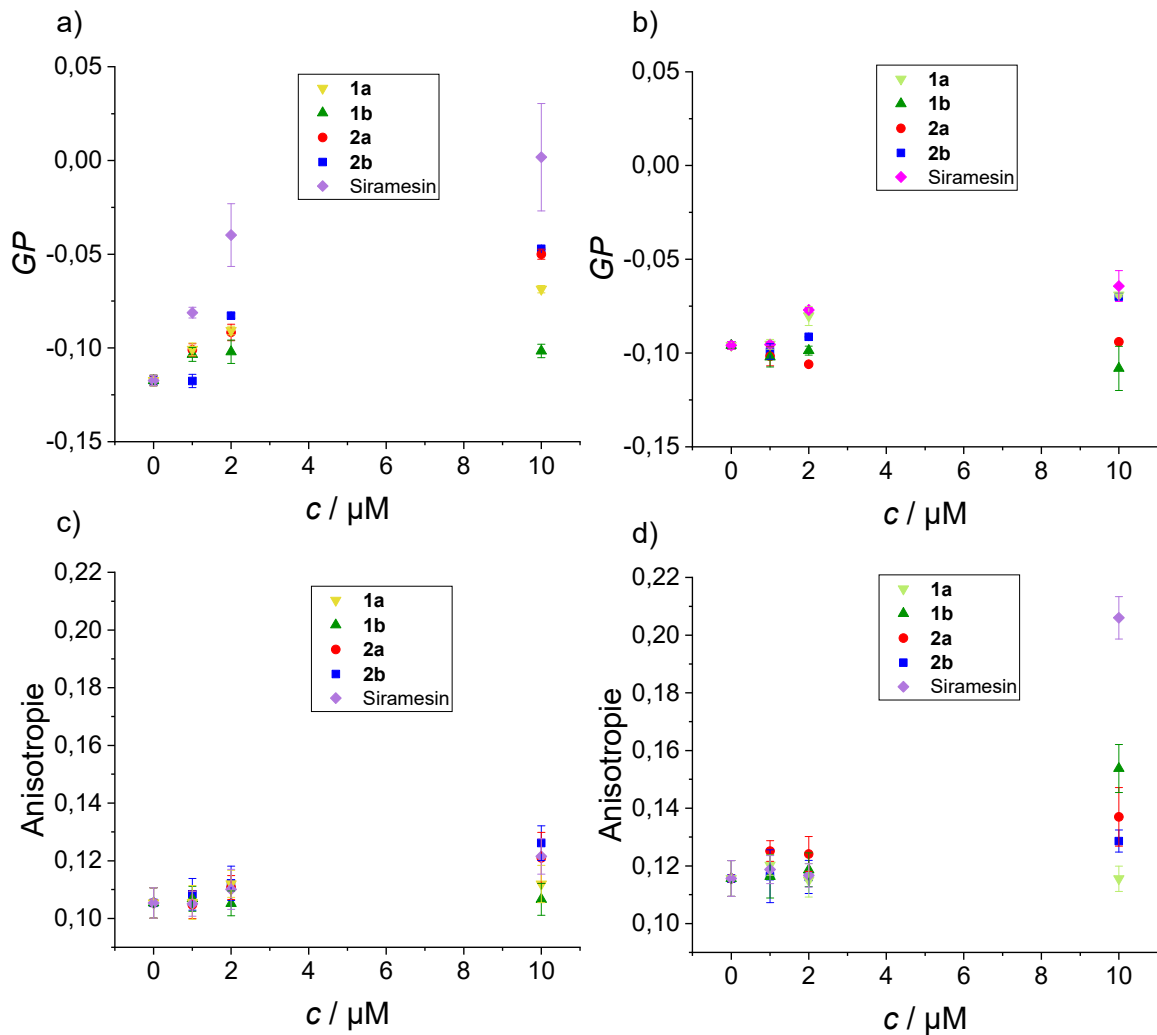


Abbildung 6.3: *GP*-Werte von Laurdan in unilamellaren Vesikeln aus POPC:POPG in Abhängigkeit der Substanzkonzentration bei a) pH 5 und b) pH 7,4 sowie Anisotropiewerte von DPH in diesen Vesikeln in Abhängigkeit der Substanzkonzentration bei c) pH 5 und d) pH 7,4 bei 25 °C.

Der *GP*-Wert der Modellmembran liegt bei 25 °C und beiden pH-Werten um -0,1, was bedeutet, dass die Lipiddoppelschicht in der fluiden  $L_{\alpha}$ -Phase vorliegt. Die *cis*-Doppelbindungen innerhalb der Kohlenwasserstoffketten verhindern eine hohe Packungsdichte, sodass diese Lipide eine niedrige Phasenübergangstemperatur von ca. -2 °C aufweisen.<sup>[137]</sup> Die Zugabe der verschiedenen Verbindungen zeigen bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 keinen signifikanten Effekt auf den Packungsparameter. Bei einem sauren pH-Wert, der im Inneren eines Lysosoms vorliegt, erhöht einzig eine hohe Konzentration der Kontrollsubstanz Siramesin die laterale Ordnung der Membran. Eventuell kommt es zum Einbau dieses Stoffes in die Membran, wodurch das starre Ringsystem ähnlich wie Cholesterin die Doppelschicht rigider werden lässt. Eine stabile Interkalation der anderen Verbindung im Bereich der Kopfgruppen kann aufgrund der unveränderten *GP*-Werte ausgeschlossen werden. Die Werte der DPH-Anisotropie für das Membransystem liegen um 0,1, welche den fluiden Charakter der Vesikel

widerspiegelt. Selbst in Gegenwart hoher Konzentrationen der verschiedenen Verbindungen ändert sich dieser Parameter bei einem pH-Wert von 5 nur geringfügig. In pH-neutraler Lösung erhöhen hohe Anteile an Siramesin die Anisotropie, weshalb ein Einbau dieses Stoffes in den hydrophoben Teil der Membran möglich wäre.

Analog zu dem vorheriger Modellmembran wurden diese Fluoreszenzspektroskopiemessungen an einem komplexeren 6-Komponentensystem bestehend aus POPC:Cholesterin:SM:POPE:POPI:BMP (30:30:15:11:7:7), welches an den Aufbau einer lysosomalen Membran angelehnt ist<sup>[127]</sup>, durchgeführt. In nachfolgender Abbildung sind die *GP*-Werte dieser Vesikel in Abhängigkeit der Substanzkonzentration der verschiedenen Verbindungen bei einem pH-Wert von 5 und 7,4 dargestellt.

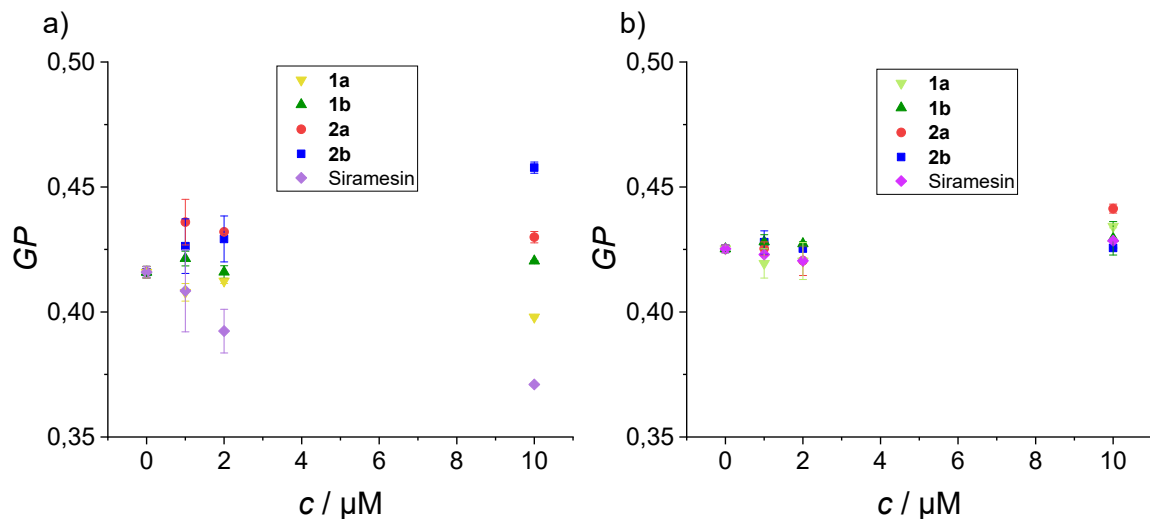
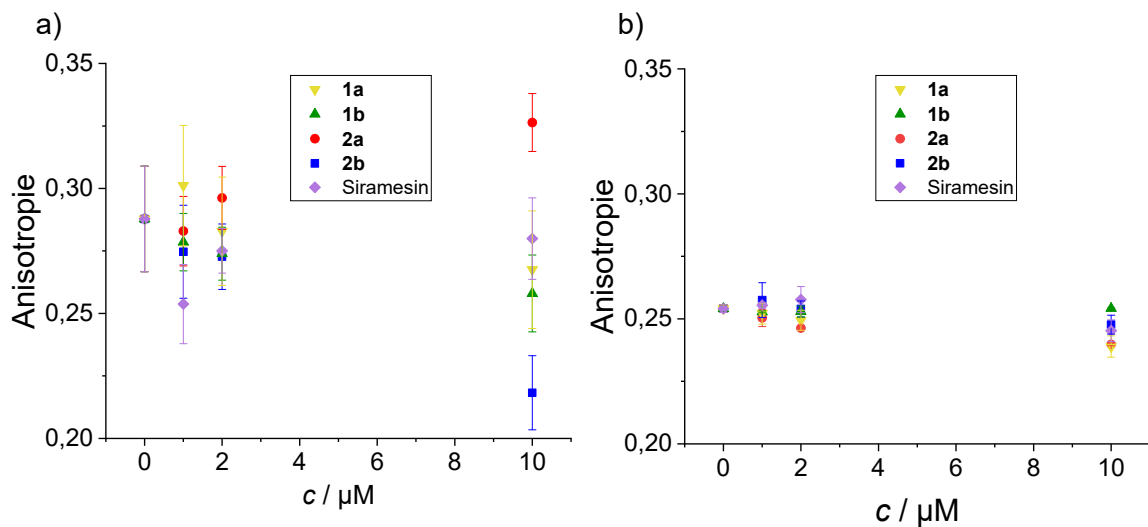


Abbildung 6.4: *GP*-Werte von Laurdan in unilamellaren Vesikeln aus POPC:Cholesterin:SM:POPE:POPI:BMP in Abhängigkeit der Substanzkonzentration bei a) pH 5 und b) pH 7,4 bei 25 °C.

Die komplexe Modellmembran weist bei beiden pH-Werten einen relativ hohen *GP*-Wert von ca. 0,42 auf, welcher die hohe Packungsdichte einer Gelphase widerspiegelt, die größtenteils auf den hohen Cholesteringehalt zurückzuführen ist.<sup>[18,20,76,106,138]</sup> Die laterale Ordnung dieser Membran sinkt linear mit steigender Temperatur bis zu einem Wert von 0,1 bei 60 °C (s. Abb. A3). Die Zugabe der verschiedenen Verbindungen verursachte keine signifikante Veränderung des *GP*-Wertes, sodass die Packung der Lipiddoppelschicht auf Ebene der oberen Kettenregion nicht wesentlich beeinflusst wird. Bei dem sauren pH-Wert lassen sich nur eine geringfügige Erhöhung durch **2b** und Erniedrigung durch Siramesin erkennen, welche bei hohen Konzentrationen dieser Substanzen auftreten. Zur Analyse des hydrophoben Anteils der Modellmembran wurden entsprechende DPH-Anisotropiemessungen ausgeführt:



**Abbildung 6.5:** Anisotropiewerte von DPH in unilamellaren Vesikeln aus POPC:Cholesterin:SM:POPE:POPI:BMP in Abhängigkeit der Substanzkonzentration bei a) pH 5 und b) pH 7,4 bei 25 °C.

Das 6-Komponentensystem zeigt in Abwesenheit der zu testenden Stoffe bei beiden pH-Werten eine Anisotropie von ca. 0,26, welche ebenfalls auf eine dichte Packung der Kohlenwasserstoffketten schließen lässt. Aufgrund des hohen Cholesteringehalts liegt die Membran in der *liquid-ordered* Phase vor.<sup>[139]</sup> Die Existenz möglicher Domänen im Submikrometer-Bereich kann jedoch nicht ausgeschlossen werden und ist bei der hohen Komplexität des Systems wahrscheinlich der Fall. Bei einem physiologischem pH-Wert von 7,4 beeinflussen die Verbindungen die Fluoreszenzanisotropie des DPHs nicht wesentlich, sodass kein dauerhafter Einbau dieser Substanzen in den hydrophoben Kern der Membran vorzuliegen scheint. Im sauren Milieu erwies sich die Messung der Anisotropie als deutlich fehlerbehafteter, weshalb die geringen Veränderungen der Werte meistens innerhalb der Fehlertoleranzen nicht von den Anisotropiewerten des reinen Systems abweichen.

### 6.3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Mithilfe der Visualisierung von GUVs unter einem Fluoreszenzmikroskop können topologische Veränderungen sowie die Stabilität gegenüber transversaler Diffusion bestimmt werden. Die Lipiddoppelschichten wurden mit dem Fluorophor *N*-Rhodamin-DHPE markiert, während gleichzeitig der wasserlösliche Farbstoff Atto-647 in den wässrigen Kern der Vesikel eingeschlossen wurde und somit als Sonde für eine mögliche Permeabilität der Membran dient (*leakage test*). Abbildung 6.6 zeigt ausgewählte Fluoreszenzmikroskopiebilder der Vesikel aus

POPE:POPG bei pH 7,4 in Gegenwart der Verbindungen in einem molaren Verhältnis von Lipid zu Substanz von 10:1.

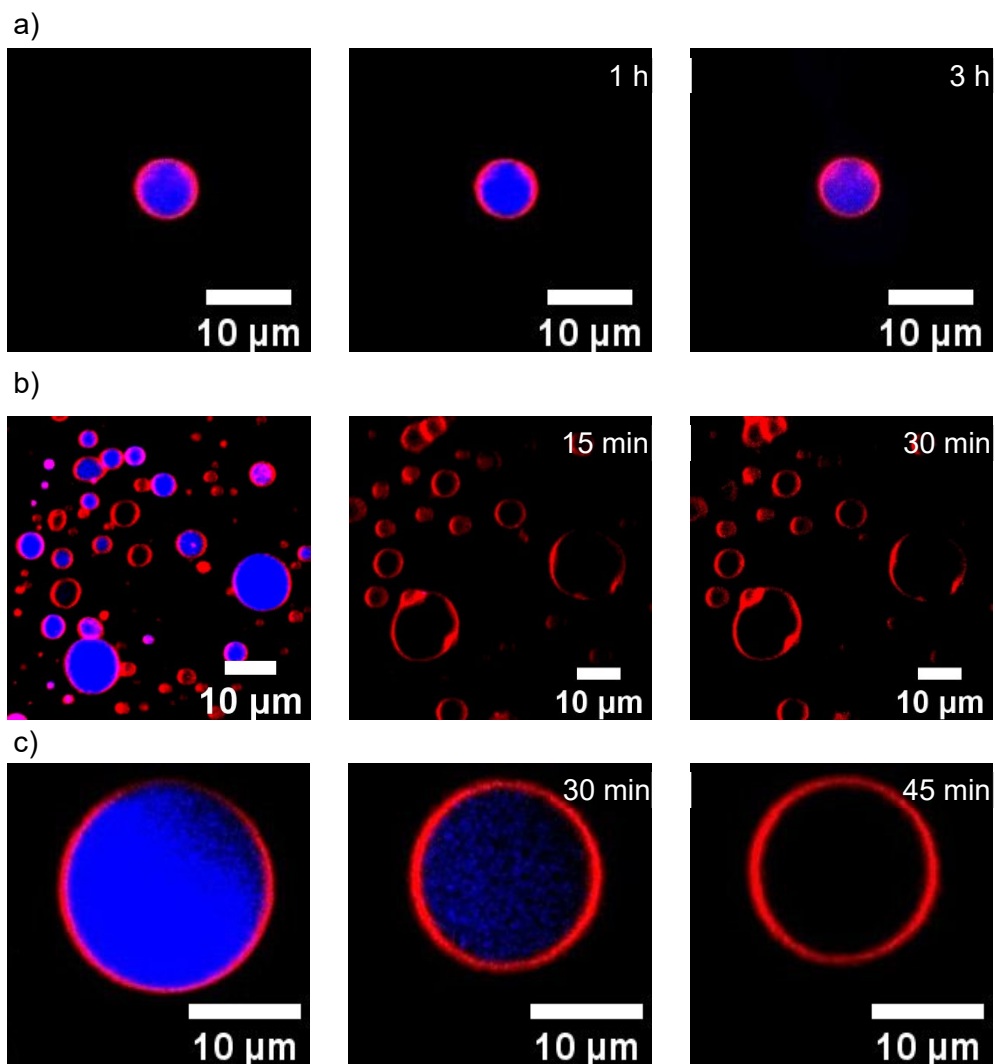


Abbildung 6.6: Fluoreszenzmikroskopiebilder von POPC:POPG (85:15) Vesikeln bei pH 7,4 vor (a) und nach Zugabe der Substanzen 2a (b) und 2b (c) nach bestimmten Zeitpunkten bei 25 °C.

Die Vesikel dieser Modellmembran in einem Größenbereich von 5 – 10 µm sind über mehrere Stunden sowohl topologisch als auch gegenüber der Diffusion des Farbstoffes aus dem Vesikelinneren stabil. Nach Zugabe von 6 µM Inducin (**2b**) tritt innerhalb von 30 Minuten ein deutlicher Verlust der Fluoreszenzintensität des Fluorophors, welcher sich innerhalb des Vesikels befindet, auf (s. Abb. 6.6 b)). Nach 45 Minuten wird ein vollständiger Verlust des eingekapselten Fluorophors beobachtet. Trotz dieses Diffusionsprozesses kann keine Veränderung der Morphologie des Vesikels erkannt werden. Ein ähnliches Ergebnis wird durch Zugabe der Verbindung **2a** erreicht, die mit Inducin strukturell sehr nahe verwandt ist. Die

anderen Substanzen, sowie das Medikament Siramesin, wurden ebenfalls zu den fluoreszenzmarkierten Vesikeln gegeben.

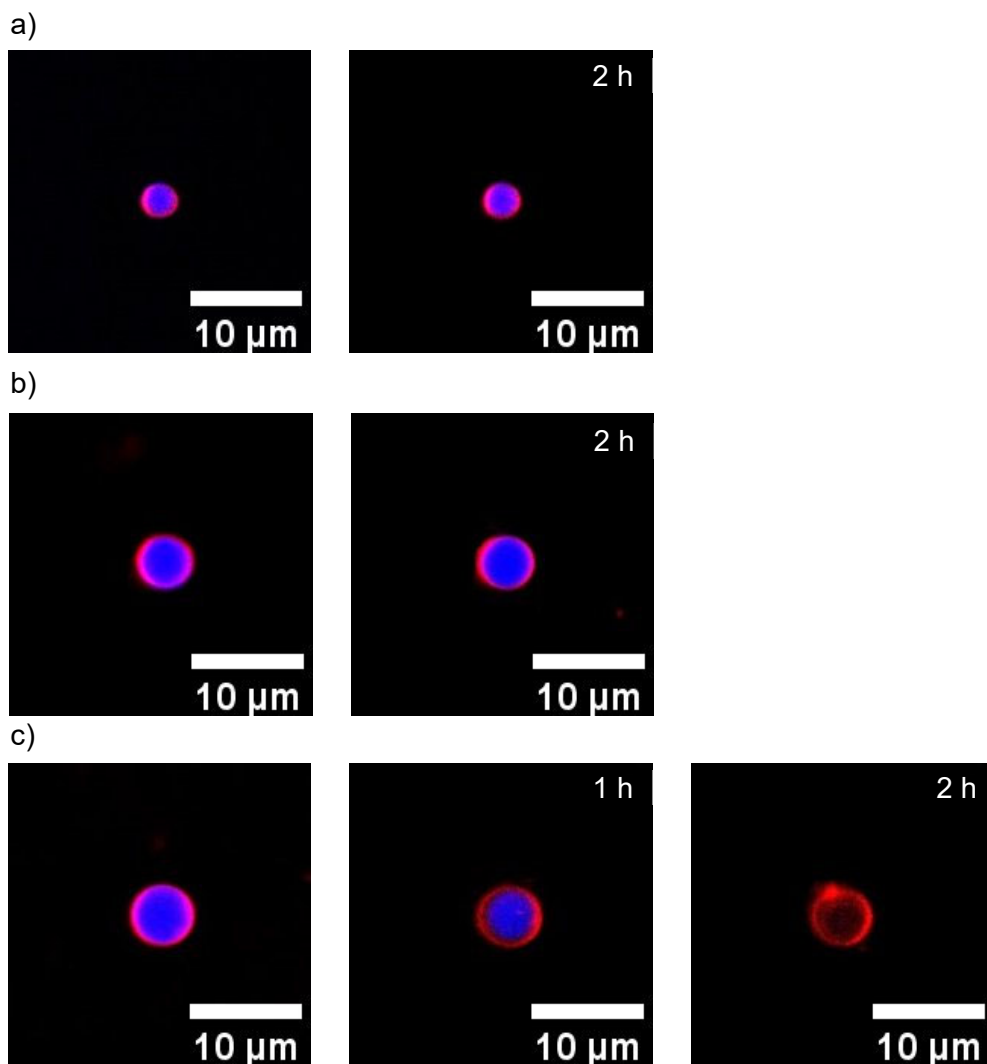


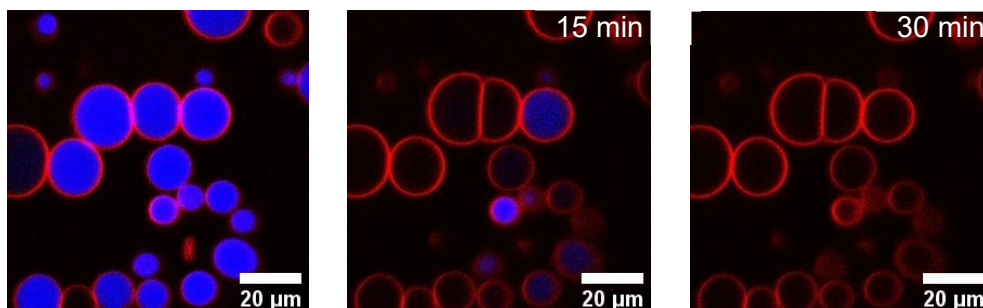
Abbildung 6.7: Fluoreszenzmikroskopiebilder von POPC:POPG (85:15) Vesikeln bei pH 7,4 vor und nach Zugabe der Substanzen (a) 1a (b) 1b und (c) Siramesin nach bestimmten Zeitpunkten bei 25 °C.

Die Verbindungen **1a** und **1b** verursachen selbst nach langen Inkubationszeiten von 2 Stunden keine Topologieänderungen oder ein Auslaufen der GUVs. Diese Ergebnisse zeigen, dass die zusätzlichen Methylgruppen am Benzolring und am Stickstoffatom essentiell für die Vesikelpermeabilisierung sind. Diese Substitutionen erhöhen die Hydrophobizität der Moleküle, sodass eine Diffusion der Verbindungen durch die Lipiddoppelschicht ermöglicht wird. Währenddessen können Wassermoleküle das Innere des Vesikels über kurzfristig gebildete Poren verlassen, die durch diese Substanzen innerhalb der Membran entstehen. In der Erforschung neuer lysosom-inhibierenden Medikamenten sind diese Eigenschaften von großer Bedeutung, da der intralysosomale pH-Wert nicht mehr konstant gehalten werden kann, wenn

solche Stoffe die Diffusion von kleinen Molekülen durch diese Organellen zulassen. Als Konsequenz sinkt die Aktivität der vom Lysosom eingekapselten Enzyme drastisch, sodass der intrazelluläre Abbau von Zellorganellen gehindert wird.<sup>[124–126]</sup> Die Kontrollsubstanz Siramesin zeigte ebenfalls dieses Verhalten, allerdings wies sie eine geringere Effektivität auf, da ein vollständiger Verlust der Fluorophorintensität erst nach einer zweistündigen Inkubationszeit auftrat. Vorherige Studien demonstrierten diesen Einfluss auf Lysosomen ebenfalls in lebenden Zellen.<sup>[134–136]</sup>

Das gleiche Experiment wurde auch bei einem pH-Wert von 5 durchgeführt (s. Abb. A4). Aufgrund des Fluoreszenzverlusts des eingekapselten Atto Fluorophors unter sauren Bedingungen konnten nur mögliche Veränderungen der Membranzmorphologie untersucht werden. Ähnlich wie bei pH 7,4 verursachte keine der getesteten Verbindungen topologischen Änderungen der Vesikel.

Schließlich wurden auch GUVs des komplexen 6-Komponentensystems mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops visualisiert. Bei der Untersuchung dieser Vesikel fiel eine hohe Diffusion durch die Membran auf, weshalb der von der Lipiddoppelschicht umschlossene Fluorophor innerhalb von wenigen Minuten nicht mehr in den Vesikel detektierbar war:



**Abbildung 6.8:** Fluoreszenzmikroskopiebilder von Vesikeln aus POPC:Cholesterin:SM:POPE:POPI:BMP bei pH 7,4 nach bestimmten Zeitpunkten bei 25 °C.

Höchstwahrscheinlich führt die Existenz von kleinen Heterogenitäten in der Membranstruktur, deren Größe in der Fluoreszenzmikroskopie nicht aufgelöst werden kann, zur Bildung von weniger dicht gepackten Domänen, durch welche kleine Moleküle leicht diffundieren können. Diese permeablen Bereiche in der Lipiddoppelschicht entstehen aufgrund der suboptimalen Mischbarkeit der unterschiedlichen Klassen von Lipidmolekülen. In lebenden Zellen wird ebenfalls die Existenz solcher Mikrodomänen angenommen, bei denen es zu ähnlichen Permeabilitätsstörungen kommen kann, die jedoch mithilfe von Protonenpumpen und



Transportern ausgeglichen werden können, sodass im Inneren der Lysosomen ein saurer pH-Wert stabilisiert wird.<sup>[140,141]</sup>

## 6.4 Zusammenfassung

Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf vernachlässigbare Auswirkungen der untersuchten Verbindungen auf die physikalischen Eigenschaften lysosomaler Modellmembranen hin. Trotz der gegenüber transversaler Membrandiffusion instabilen Struktur des 6-Komponentensystems konnte kein stabiler Einbau der Substanzen in die Lipiddoppelschicht beobachtet werden. Dieses Verhalten ist angesichts der sperrigen und hydrophoben Struktur des Grundgerüsts zu erwarten, welche die Interkalation in den Bereich der Kohlenwasserstoffketten erschwert. Stattdessen wird die Diffusion dieser Stoffe durch die Membran angenommen, wobei zuerst das schwach basische Stickstoffatom mit den anionischen Lipidkopfgruppen wechselwirkt. Darauf folgend bewegt sich das ansonsten hydrophobe Molekül durch die Acylgruppen, bis es auf der gegenüberliegenden Seite der Doppelschicht in den intravesikulären Raum eintreten kann. Abgesehen von diesen lysosomotropischen Eigenschaften könnten auch Aggregate des Inducins Lysosomen und Zellen schädigen. Eine erhöhte Zellsterblichkeit durch beschädigte Lysosomen konnte bereits bei Anwesenheit von Fibrillen und anderen supramolekulare Aggregaten beobachtet werden.<sup>[142-144]</sup> Da es sich bei dieser naturstoffähnlichen Verbindung um ein relativ hydrophobes Molekül handelt, ist eine Aggregation in polaren Lösungsmitteln bei hohen Konzentrationen aufgrund des hydrophoben Effekts thermodynamisch bevorzugt.

Zellbiologische Untersuchungen die derzeit durchgeführt werden, werden es erlauben, den Einfluss des Inducins auf zelluläre Prozesse *in vivo* zu verstehen. Beispielsweise kann der Lipidierungszustand des LC3 Proteins analysiert werden, welches als Marker für den Prozess der Autophagie in lebenden Zellen gilt.<sup>[145]</sup>

# Einfluss von lipidierten Imidazolen auf Lipidmodellmembranen

---

## 7.1 Einleitung

Ionische Flüssigkeiten, die aus alkylierten Imidazoliumsalzen bestehen, können für eine Vielzahl verschiedener Anwendungen verwendet werden. So wurden bestimmte Strukturen synthetisiert, die als Elektrokatalysatoren oder als Elektrolyte in Solarzellen fungieren.<sup>[146,147]</sup> Darüber hinaus ähnelt ihre Struktur derjenigen von Phospholipiden, die den Hauptbestandteil von Zellmembranen darstellen. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit können diese Salze als Lipidmimetika zur Manipulation lipidabhängiger biologischer Prozesse eingesetzt werden.<sup>[148–150]</sup> Aktuelle Studien zeigten ebenso potentielle Verwendung als antimikrobielle und antimykotische Arzneimittel.<sup>[151–153]</sup> Langkettige Derivate mit sperrigen Kopfgruppen wiesen eine hohe Aktivität gegenüber Krebszellen auf, während gesunde Zellen weitestgehend unbeeinträchtigt werden.<sup>[154]</sup> In Phospholipidmembranen integrierte Imidazoliumsalze verändern deren Fluidität und die Morphologie der Vesikel, sodass sie in *drug delivery* Systemen eingesetzt werden können.<sup>[155]</sup> Ein dikationisches Derivat wurde entwickelt, welches bereits erfolgreich als Gentransfermittel *in vitro* benutzt wurde.<sup>[156]</sup> Sogar künstliche Archaeosomen, deren Grundgerüst auf Imidazoliumbasis beruht, konnten synthetisiert und charakterisiert werden. Diese Salze führen zu einer erhöhten Temperatur- und Druckstabilität von Lipidmembranen, sofern sie in diese eingebaut werden.<sup>[157]</sup> Da veränderte Substitutionsmuster unterschiedliche biologische Wirkungen hervorrufen, wurden diverse Synthesewege eingeschlagen, um spezifische imidazolium-basierte Verbindungen zu entwickeln, die sich aufgrund ihrer Alkylkettenlänge und Kopfgruppenstruktur in Lipophilie, Hydrophilie und Größe unterscheiden.<sup>[152,153,158–160]</sup>

In diesem Projekt wird der Einfluss neuer, künstlicher Lipide auf Imidazolbasis mit methylierten und positiv geladenen Derivaten auf den Einbau in Phospholipidmembranen unter Verwendung verschiedener biophysikalischer Techniken untersucht. Imidazoliumsalze mit mittleren Kettenlänge als Lipidmimetika sind in den letzten Jahren ausgiebig charakterisiert

worden, während Derivate ungeladener *N*-heterocyclischer Carbene (NHC) aufgrund ihrer geringen Hydrophilie deutlich weniger Interesse auf sich zogen. Dabei wurde bereits von der erfolgreichen Interkalation einer solchen Verbindung in Phospholipiddoppelschichten berichtet. Die Struktur und biophysikalischen Eigenschaften der Membran werden dabei nicht wesentlich beeinflusst, weshalb sie beispielsweise als *drug delivery* System Anwendung finden könnten.<sup>[158]</sup> Zusätzlich werden in dieser Studie Cholesterinanaloga analysiert, um die Bildung von *lipid rafts* durch diese artifiziellen Moleküle zu simulieren. In Biomembranen spielen diese Domänen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und verschiedenen Membrantransportprozessen.<sup>[22,23]</sup> Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen dieser Prozesse sind oft nicht vollständig verstanden, sodass fluoreszenzmarkierte Cholesterinderivate dabei helfen können, biologische Mechanismen in lebenden Zellen zu verfolgen. Während das methylierte Imidazoliumsalz-Analogon kürzlich erforscht wurde, wird in diesem Projekt der Einfluss des Einbaus eines ungeladenen Derivats in Phospholipidmembranen im Vergleich zu natürlichem Cholesterin untersucht.<sup>[148,152]</sup> Zuletzt wurde ein carboxyliertes Imidazoliumsalz in Modellmembranen interkaliert, um seine Kompatibilität als zwitterionisches Phospholipid-Analogon zu studieren. Die Strukturen der untersuchten NHCs sowie der natürlichen Lipide DPPC und Cholesterin sind in Abbildung 7.1 dargestellt.

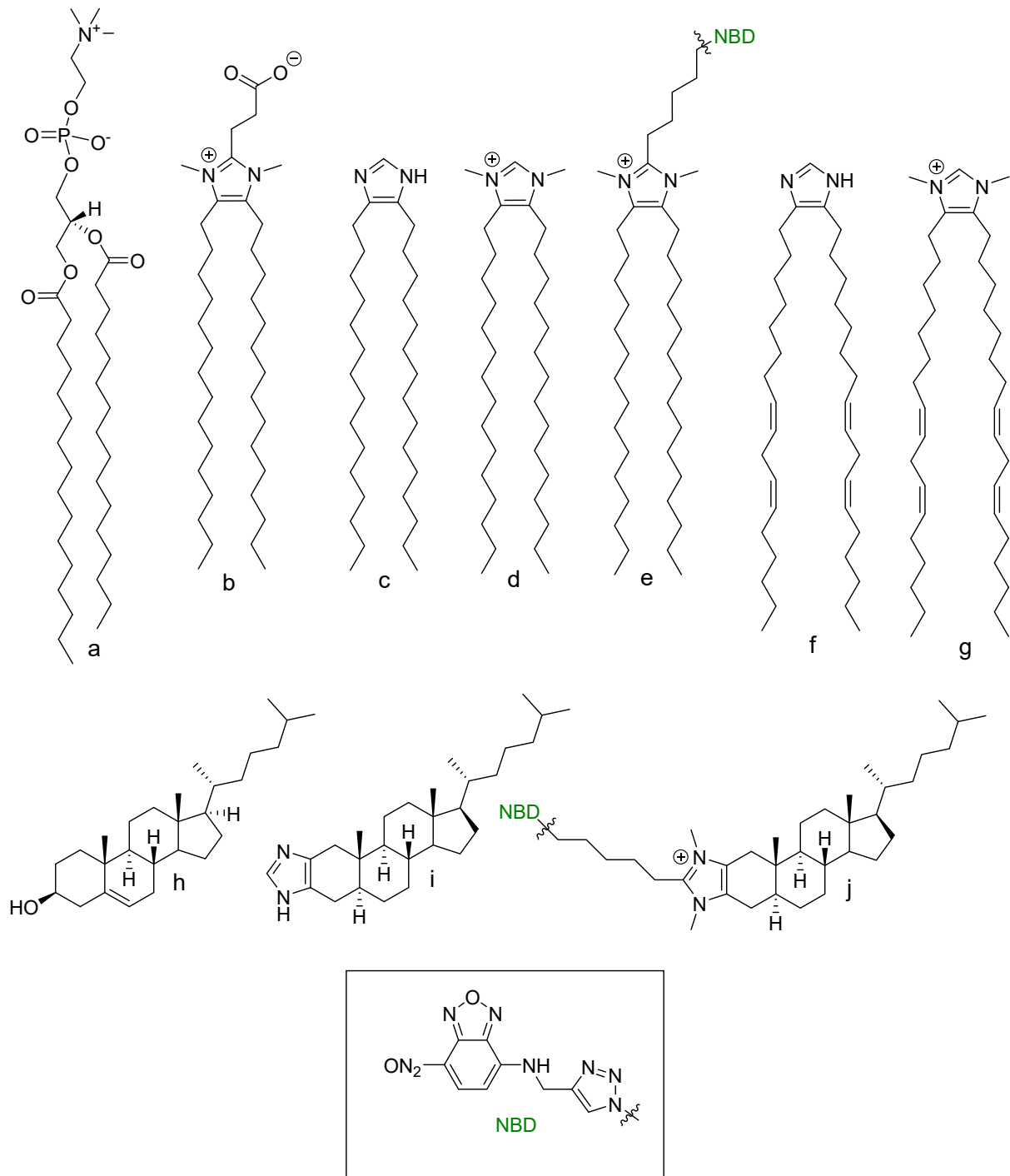


Abbildung 7.1: Strukturformeln von a) DPPC und h) Cholesterin sowie der auf Imidazol basierenden künstlichen Lipide b) C15Carboxy, c) C15, d) C15M, e) C15M-NBD, f) C17, g) C17M, i) Imidazolcholesterin und j) Imidazolcholesterinmethyl-NBD. (synthetisiert und zur Verfügung gestellt von AG GLORIUS, WWU Münster)

## 7.2 Materialien und Methoden

### 7.2.1 Materialien

Die für dieses Projekt verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen sind in Tabelle 7.1 aufgeführt.

Tabelle 7.1: Bezugsquellen der Chemikalien für die Untersuchung von lipidierten Imidazolen auf Biomembranen.

<b>Chemikalien</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Chloroform	Merck (Darmstadt, Deutschland)
DMPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPH	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DPPC	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
DPPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
HEPES	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Laurdan	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
MgCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
NBD-DHPE	Molecular Probes (Invitrogen, USA)
N-Rh-DHPE	Molecular Probes (Invitrogen, USA)
POPE	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
POPG	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)

### 7.2.2 Probenpräparation

Die Präparation der MLVs für die DSC-, AFM- und Fluoreszenzspektroskopiemessungen wurde wie in 5.2.2 beschrieben durchgeführt. Zum Einbau der verschiedenen artifiziellen Lipide wurden diese vor der Präparation in Chloroform gelöst und in entsprechenden Mengen der Lipidlösung hinzugefügt.

Die GUVs für die Fluoreszenzmikroskopie wurden wie in 3.2.2 mithilfe der Elektroformation oder wie in 4.2.2 auf einem PVA-Gel hergestellt. Für alle Membransysteme wurde bei der Elektroformation eine Frequenz von 500 Hz genutzt. Die angelegte Spannung wurde in folgenden Schritten erhöht: 1,4 V für 5 Minuten, 2,5 V für 20 Minuten und 3,5 V für 90 Minuten.

### 7.2.3 Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC)

Die DSC-Messungen wurden wie in 3.2.3 beschrieben durchgeführt.

#### **7.2.4 Fluoreszenzspektroskopie**

Für die Messungen der Fluoreszenzemission von Laurdan und der Fluoreszenzanisotropie von DPH wurden die gleichen Geräte und Rechnungen wie in 3.2.4 verwendet. Die Lipidkonzentration lag bei einem Gewichtsprozent mit einer Fluorophorkonzentration von 100  $\mu\text{M}$ .

#### **7.2.5 Fluoreszenzmikroskopie**

Mithilfe der in 3.2.7 beschriebenen Apparatur konnten GUVs der Membransysteme visualisiert werden. Die verwendeten Fluorophore *N*-Rhodamin-DHPE und NBD-DHPE lagen in einem molaren Verhältnis von 1:500 gegenüber der 1 mg/mL konzentrierten Lipidmischung vor. Zudem wurden zwei Laser mit Anregungswellenlängen von 488 und 561 nm (L4Cc-CSB-130, Oxxius Simply Light, Lannion, Frankreich) genutzt.

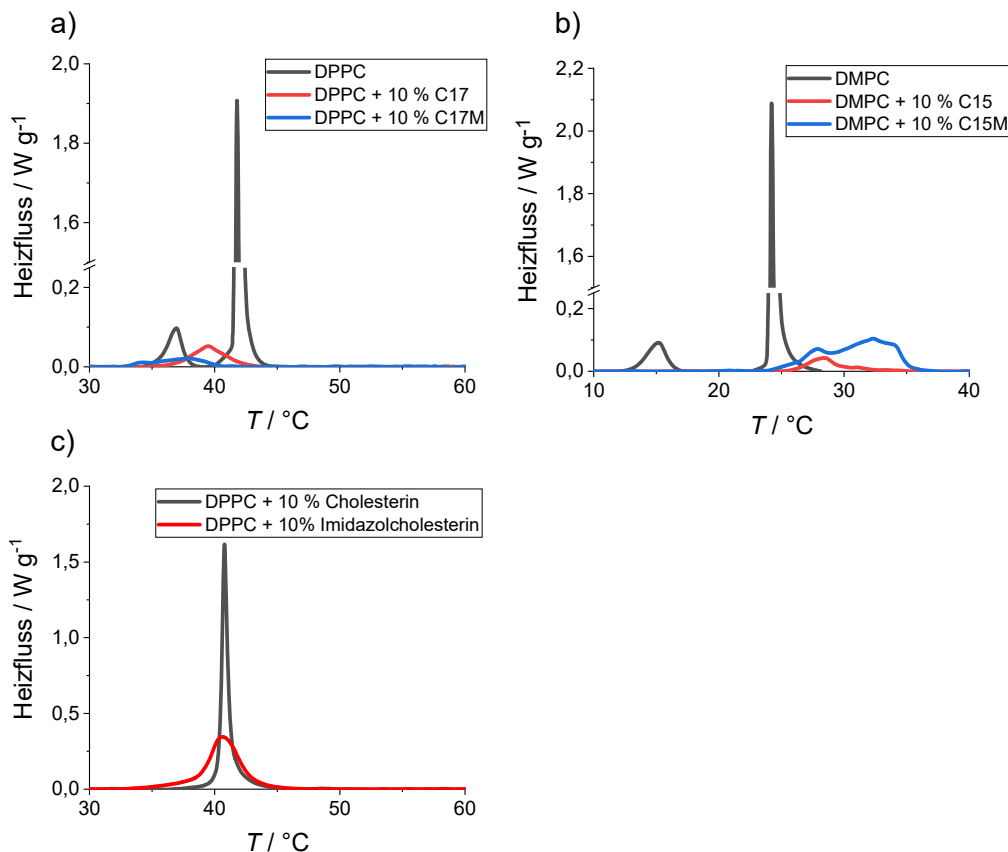
#### **7.2.6 Rasterkraftmikroskopie (AFM)**

Multilamellare Vesikel wurden mithilfe einer Extrusion durch eine Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 100 nm (Miniextruder, Avanti Lipids, Alabaster, USA) auf eine einheitliche Größe gefiltert, um große unilamellare Vesikel (LUVs) zu erhalten. Diese wurden auf eine Konzentration von 1,94 mg/mL in 10 mM HEPES-Puffer mit einer  $\text{MgCl}_2$  Konzentration von 5 mM und einem pH-Wert von 7,4 verdünnt und auf eine ebene Mica Platte gegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 60 °C wurde die entstandene Lipiddoppelschicht mit Puffer gewaschen und in eine MTFML Flüssigzelle der Firma Veeco aus Mannheim eingebaut. Ein MultiMode Mikroskop, gesteuert über ein NanoScope IIIa Controller und einem J-Scanner (Digital Instruments, Santa Barbara, USA), erzeugte die Aufnahmen der Doppelschichtoberfläche. Die verwendeten Cantilever mit einer nominellen Kraftkonstante von 0,35 N/m scannten die Probe mit einer Frequenz von 1 Hz.

## 7.3 Ergebnisse und Diskussion

### 7.3.1 Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC)

Um Einblicke in die thermodynamischen Parameter der Phasenübergänge von Modellmembranen in An- und Abwesenheit der eingefügten Imidazole und Imidazoliumsalze zu gewinnen, wurden DSC-Messungen durchgeführt. Für einen möglichst passenden Einbau der künstlichen Lipide in die Phospholipiddoppelschichten wurden entsprechend ähnliche Kettenlängen verwendet. In Abbildung 7.2 sind die resultierenden Thermogramme gezeigt.



**Abbildung 7.2:** DSC-Thermogramme von Vesikeln aus a) DPPC, b) DMPC und c) DPPC + 10 Molprozent Cholesterin in An- und Abwesenheit von 10 Molprozent der eingebauten Imidazolderivate.

Das Verschwinden des Vorübergangs aller Modellmembranen ist nach Einbau von 10 Molprozent eines Lipids auf Imidazolbasis erkennbar. Dieses Phasenverhalten ist auch dann zu beobachten, wenn sich Cholesterin in einer Membran befindet, da die effiziente Packung benachbarter Lipide verringert wird, die für die Bildung der P<sub>B'</sub>-Phase erforderlich ist (s. Abb. 7.2 c)). Die Hauptübergangstemperatur von DPPC wird um 2 °C gesenkt, wenn der Membran 10 Molprozent der C17-Derivaten zugesetzt werden, da deren sperrige Doppelbindungen das benötigte Volumen des hydrophoben Teils der Lipiddoppelschicht erhöhen und

somit die VAN-DER-WAALS-Kräfte zwischen den Ketten verringern, sodass die benötigte Energie in Form von Temperatur für den Übergang von der Gel- in die Flüssigphase sinkt.

Abbildung 7.2 b) zeigt einen gegenteiligen Effekt in den Thermogrammen von DMPC mit interkalierten C15-Derivaten. Beide künstliche Lipide führen zu einer Erhöhung der Phasenübergangstemperatur. Frühere Studien haben herausgefunden, dass die Einlagerung des Imidazoliumsalzes C15M DPPC-Doppelschichten versteift und daher auch die Schmelztemperatur erhöht.<sup>[149,158,160–162]</sup> Der Einbau dieser Variante führte zu breiten Maxima zwischen 25 und 35 °C, welche für Phasenkoexistenzen in diesen Temperaturbereichen sprechen. Außerdem durchlaufen Vesikel, die nur aus diesem künstlichen Lipid bestehen, in diesem Temperaturbereich einen Phasenübergang, sodass diese Peaks durch Übergänge von Lipiddomänen auf Imidazolbasis herrühren könnten.<sup>[149,158,162]</sup> Es liegt nahe, dass die polarere Kopfgruppe des Imidazoliumsalzes mit der negativ geladenen Phosphatgruppe des DMPCs interagiert, sodass die Doppelschicht noch stärker versteift wird als durch die Interkalation mit dem ungeladenen Molekül.

Der Einbau des auf Imidazol basierenden Cholesterins zeigte in der DSC-Messung eine ähnliche Wirkung wie natürliches Cholesterin auf DPPC. Beide Verbindungen führen zu einem breiteren Phasenübergang im Thermogramm durch die Bildung eines Phasenkoexistenzbereiches. Das positiv geladene Cholesterinderivat wies in jüngsten Studien ähnliche Ergebnisse auf, sodass von keinen ladungsinduzierten Auswirkungen auf die kalorimetrischen Parameter ausgegangen werden kann.<sup>[163]</sup>

### 7.3.2 Fluoreszenzspektroskopie

Umfangreiche fluoreszenzspektroskopische Messungen erlauben die Bestimmung des Lipidordnungsparameters der Phospholipidmodellmembranen unter dem Einfluss der Imidazole und Imidazoliumsalze. Dabei wurden die gleichen Systeme wie für die DSC-Messungen untersucht. Der *GP*-Wert des Fluoreszenzfarbstoffs Laurdan (s. Gleichung 3.1) beschreibt die laterale Ordnung der Membran im Grenzflächenbereich zwischen Kopfgruppe und Kohlenwasserstoffketten, während die Anisotropie des DPHs (s. Gleichung 3.2) die Fluidität im Membraninneren angibt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 7.3 präsentiert.



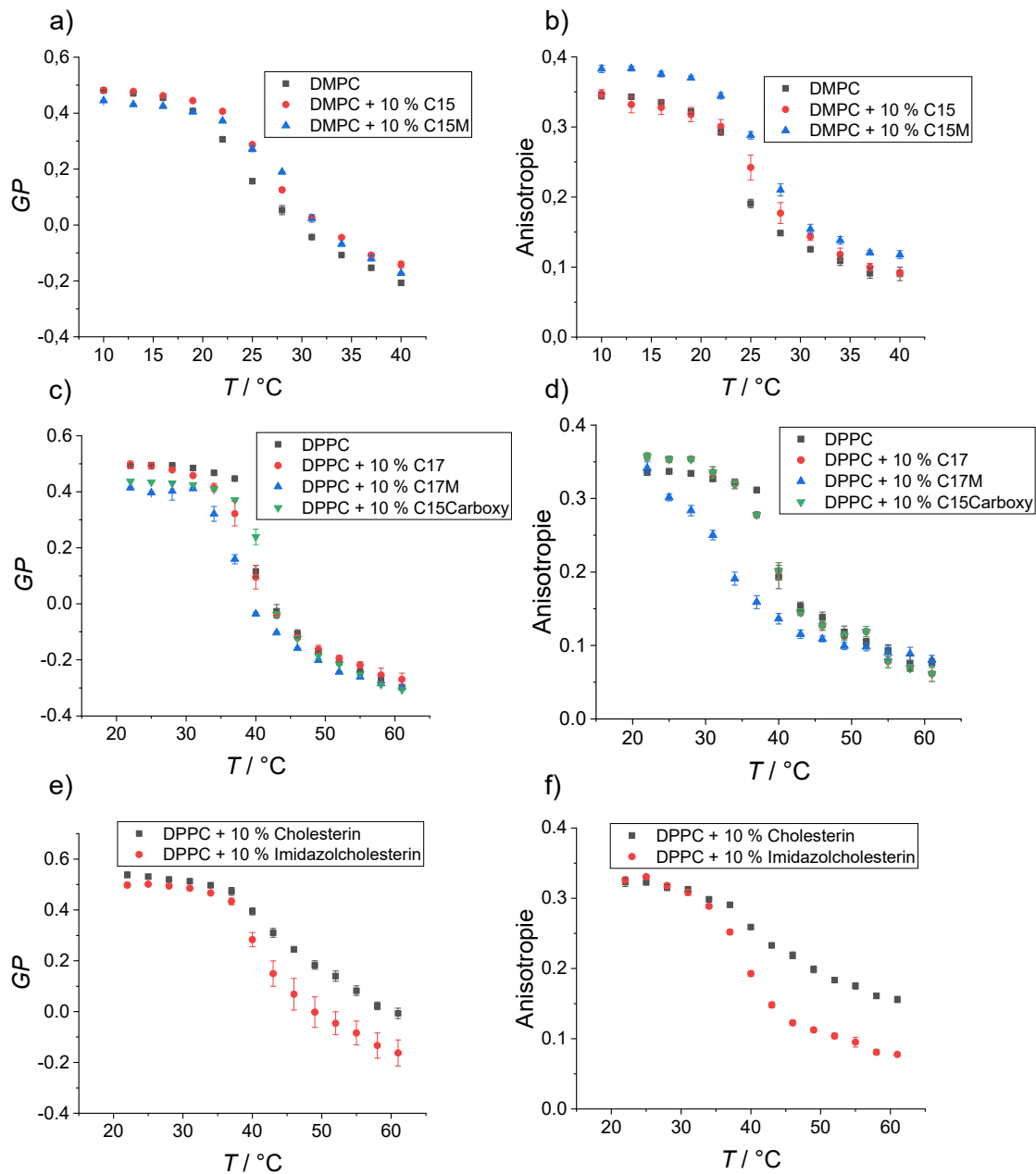


Abbildung 7.3: *GP*-Werte von Vesikeln aus a) DPPC, b) DMPC und e) DPPC + 10 Molprozent Cholesterin und Anisotropiewerte von Vesikeln aus c) DPPC, d) DMPC und f) DPPC + 10 Molprozent Cholesterin in der Ab- und Anwesenheit von 10 Molprozent der eingebauten Imidazolderivate in Abhängigkeit der Temperatur.

Das methylierte C17 Imidazoliumsals reduziert den *GP*-Wert sowie die Anisotropie der DPPC-Modellmembran im gesamten Temperaturbereich, wohingegen die ungeladene Variante nur zu einer signifikanten Senkung der Lipidordnungsparameter bei 37 °C führt. Dies weist auf eine Erniedrigung der Hauptphasenübergangstemperatur hin. Da die Alkylketten der C17-Derivate ungesättigt sind, benötigen diese Moleküle mehr Volumen, was die Packungseffizienz der Lipidketten innerhalb der Doppelschicht verringert. Auch die Möglichkeit elektrostatischer Wechselwirkungen mit den benachbarten DPPC-Phosphaten kann aufgrund der durch die Doppelbindungen induzierten Knicke im Alkylkettenbereich begrenzt sein. Die drastische

Abnahme der Lipidordnung kann durch die abstoßende Interaktion zwischen den positiv geladenen Stickstoffatomen des Imidazols und der Aminkopfgruppe der Phospholipide erklärt werden.

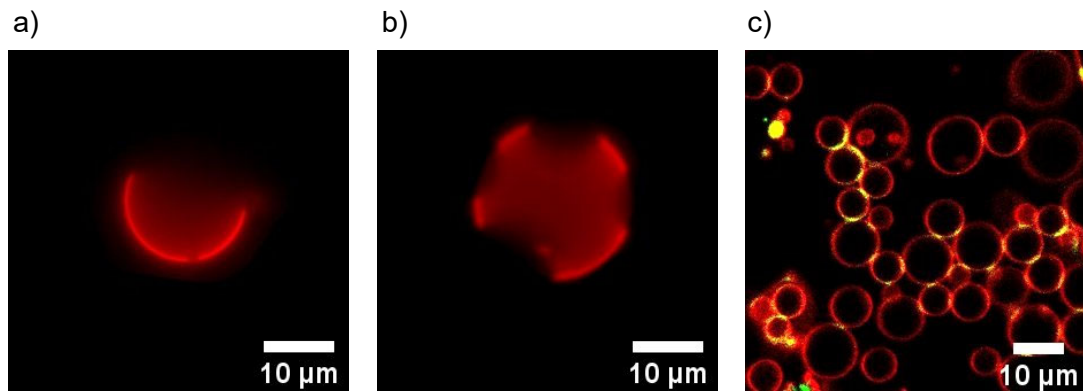
Das carboxylierte Derivat hat keinen signifikanten Einfluss auf die Lipidpackung der DPPC-Membran, sodass ein störungsfreier Einbau in die Lipiddoppelschicht gewährleistet ist. Wahrscheinlich entstehen günstige Wechselwirkungen mit der Kopfgruppe des Phospholipids, da beide Moleküle negativ und positiv geladene funktionelle Gruppen enthalten.

Die künstlichen Lipide mit der kürzeren Alkylkette (C15) erhöhen sowohl den *GP*-Wert des Laurdans als auch die Anisotropie von DPH in der DMPC-Membran. Diese Ergebnisse stimmen mit den in Abb. 7.2 gezeigten DSC-Daten überein.

Der Einbau eines imidazolbasierten Cholesterins führt zu einer höheren Fluidität in der *l<sub>d</sub>*-Phase bei hohen Temperaturen, während bei niedrigen Temperaturen weiterhin eine rigidere *l<sub>o</sub>*-Phase ausgebildet wird. MD-Simulationen sagen diese Auswirkungen auch für ein methyliertes Imidazolcholesterin voraus und zeigen keinen unterschiedlichen Einfluss auf die Ordnungsparameter durch die beiden Kopfgruppen.<sup>[148]</sup>

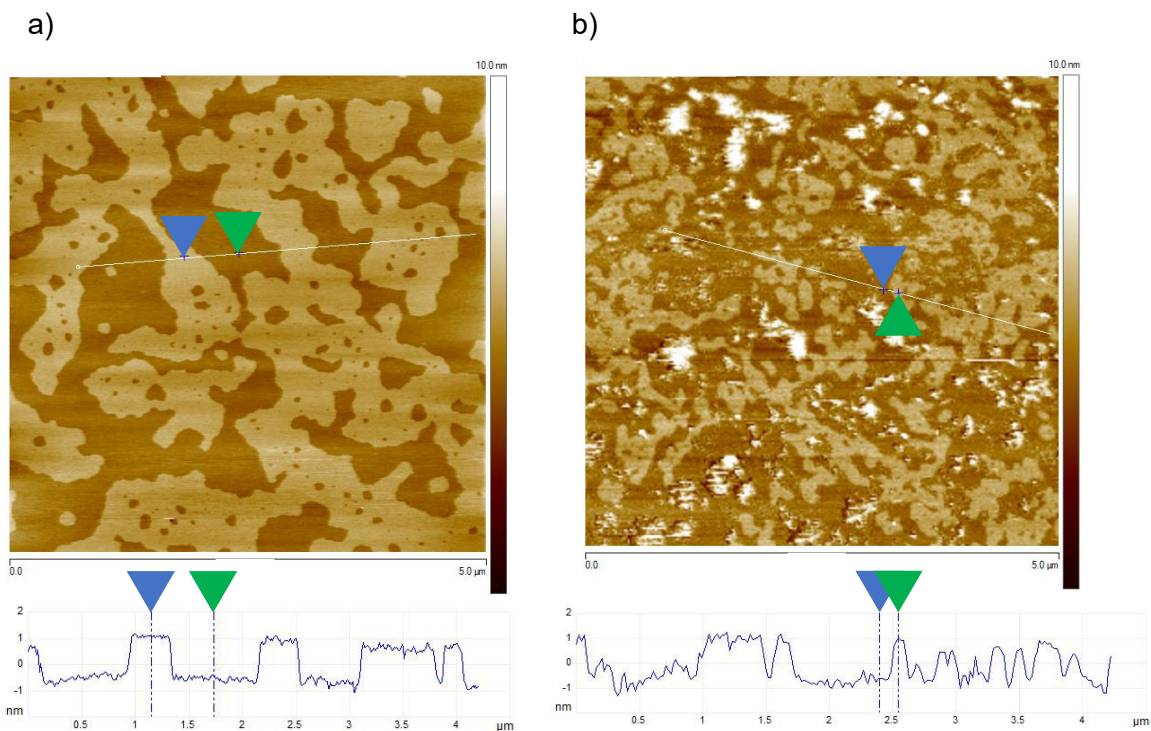
### **7.3.3 Fluoreszenz- & Rasterkraftmikroskopie (AFM)**

Der Effekt der künstlichen Lipide auf die Topologie von GUVs bestehend aus einem bereits charakterisiertem Modellbiomembransystem (DPPC:DOPC:Cholesterin 2:1:1 aus <sup>[42]</sup>) wurde mithilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Der verwendete Farbstoff *N*-Rhodamin-DHPE verteilt sich aufgrund seiner sperrigen Kopfgruppe vorzugsweise in der *l<sub>d</sub>*-Phase, sodass die fluiden Domänen innerhalb der Membran markiert werden. Abbildung 7.4 a) demonstriert die *l<sub>o</sub>*-*l<sub>d</sub>*-Phasenseparation der Modellmembran bei Raumtemperatur durch ausschließliche Markierung der fluiden Phase, welche in Übereinstimmung mit Literaturdaten steht.<sup>[42,155]</sup>



**Abbildung 7.4:** Fluoreszenzmikroskopiebilder des 3-Komponentensystems bestehend aus a) DPPC:DOPC:Cholesterin, b) DPPC:DOPC:Imidazolcholesterin und c) DPPC:DOPC:Imidazolcholesterinmethyl-NBD (2:1:1) markiert mit 0,1 mol% *N*-Rh-DHPE (rot) bei 25 °C.

Beim Austausch des natürlichen Cholesterins gegen das neutral geladene Imidazolderivat ist die Phasentrennung weiterhin sichtbar. Lediglich die Größenverteilung der Domänen erwies sich als weniger homogen. Das gleiche Phänomen kann bei dem Einbau des methylierten Cholesterinderivats beobachtet werden, welches mit dem grünen Farbstoff NBD markiert ist (s. Abb. 7.4 b)). In den phasenseparierten Vesikeln wachsen Domänen mit der Zeit aufgrund der ungünstigen Linienspannung an kleinen Domänengrenzflächen. Dieser Prozess spielt sich normalerweise in einem Zeitraum von wenigen Minuten ab und kann bei Membranen, welche in der  $l_d$ -Phase vorliegen und durch eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks oder durch Reduzieren der Temperatur  $l_o$ - $l_d$ -Phasenkoexistenzgebiete ausbilden, zeitabhängig analysiert werden (s. Abschnitt 4.3). Da die Bilder der Vesikel in Abbildung 7.4 eine Stunde nach der Präparation aufgenommen wurden, ist eine mögliche Erklärung des langsamen Domänenwachstums, dass das imidazolbasierte Cholesterin nicht so schnell durch die Lipiddoppelschicht diffundieren kann wie das natürliche Molekül. Die Linienspannung zwischen der  $l_d$ - und  $l_o$ -Phase sollte für beide Cholesterinvarianten ähnlich sein, da der gleiche Höhenunterschied ( $\sim 1,6$  nm) zwischen den Domänen mithilfe eines Rasterkraftmikroskops bestimmt wurde (s. Abb. 7.5). Ebenso zeigt die Lipiddoppelschicht auf der mica-Platte nach Einbau des Imidazolcholesterins eine stärker disperse, phasenseparierte laterale Organisation.

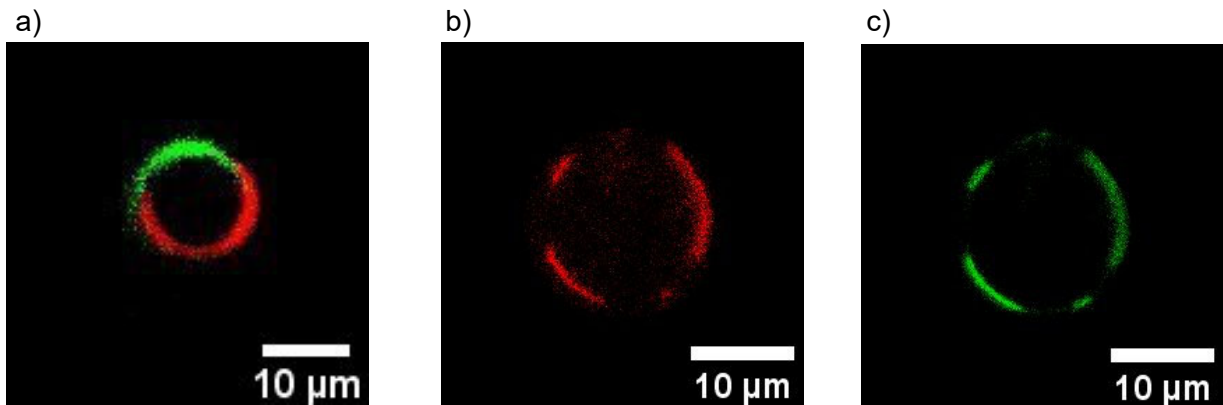


**Abbildung 7.5:** AFM-Aufnahme eines 3-Komponentensystems bestehend aus a) DPPC:DOPC:Cholesterin und b) DPPC:DOPC:Imidazolcholesterin (2:1:1) inklusive der passenden Höhenanalyse der Membran.

Durch Ersetzen der Phospholipidgehalte von DPPC oder DOPC mit den Imidazolipiden C17, C17M oder C15 wurden nur kleine elliptische Vesikel in geringer Ausbeute gebildet (s. Abb. A5). Außerdem zeigten diese Vesikel keine Phasenkoexistenz. Es scheint, dass der Einbau größerer Anteile der künstlichen Lipide die Packungsdichte und das Biegemodul großer unilamellarer Vesikel deutlich verändert. Auch der Einsatz unterschiedlicher Präparationsmethoden führte nicht zur Bildung von Vesikeln, die ausschließlich aus Imidazol-Lipiden bestanden. Hingegen wurden aus verschiedenen Imidazoliumsalzen bereits Vesikel gebildet und visualisiert.<sup>[149]</sup> Da ihre Kopfgruppe eine höhere Polarität aufweist als ihr Gegenstück in einer Verbindung auf Imidazolbasis, verhalten sich diese ionischen Flüssigkeiten in wässriger Lösung ähnlich wie natürliche Lipide.

Das NBD-markierte Derivat von methyliertem C15 konnte auch erfolgreich in das 3-Komponentenlipidsystem integriert werden (s. Abb. 7.6 a)). Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass sich das imidazolbasierte Lipid bei Umgebungstemperatur von der flüssigen  $l_a$ -Phase (rot markiert) trennt. Diese imidazolreichen Domänen könnten durch günstige Interaktionen der künstlichen Lipide untereinander oder mit Cholesterin entstehen, da beide aromatische Ringsysteme enthalten, die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen ausbilden könnten. Durch die Änderung der Membranzusammensetzung von einem neutralen 3-Komponentensystem mit *lipid rafts* zu einem negativ geladenen Doppelschichtsystem

(POPE:POPG 80:20 mol%) wurde das imidazolbasierte Lipid eher in die flüssige  $l_d$ -Phase integriert als in die geordnetere Gelphase (s. Abb. 6 b),c)). Eine Erklärung für dieses Verhalten ist die elektrostatische Wechselwirkung zwischen negativ geladenen PG-Kopfgruppen mit dem positiv geladenen methylierten Imidazol, die einer möglichen Bevorzugung des Imidazoliumsalzes für den Einbau in geordnetere Lipiddomänen entgegenwirkt.



**Abbildung 7.6:** Fluoreszenzmikroskopiebilder a) eines 4-Komponentensystems bestehend aus DPPC:DOPC:Cholesterin:C15M-NBD (40:25:25:10 mol%) bei 25 °C und b), c) eines 3-Komponentensystems bestehend aus POPE:POPG:C15M-NBD (70:20:10 mol%) markiert mit 0,1 mol% *N*-Rh-DHPE (rot) bei 10 °C. Während in a) beide Fluoreszenzkanäle sichtbar sind, zeigt b) ausschließlich den roten Kanal (Anregung bei 561 nm) und c) ausschließlich den grünen Kanal (Anregung bei 488 nm). (Messung durchgeführt von A. VICKUS in ihrer Bachelorarbeit „Der Einfluss von Imidazolen auf bakterielle Membranen“ (2023) unter Anleitung von S. KRIEGLER)

## 7.4 Zusammenfassung

In diesem Projekt wurde der Einfluss neuer ungeladener Lipide auf Imidazolbasis auf die biophysikalischen Eigenschaften von Phospholipidmembranen im Vergleich zu Imidazoliumsalzen untersucht. Die Derivate mittlerer Kettenlänge sind in der Lage, die Kohlenwasserstoffketten der Phospholipide ähnlicher Länge zu versteifen, d. h. sie führen zu einer Erhöhung des Lipidordnungsparameters sowie der Hauptphasenübergangstemperatur. Die Bildung von GUVs wird durch die geringe Größe der Kopfgruppe behindert, welche eine effiziente Lipidpackung stört und die Biegesteifigkeit der Membran drastisch verändert. Das Hinzufügen der sperrigeren Methylgruppen sowie einer positiven Ladung in der Kopfgruppe des imidazolbasierten Lipidmoleküls führt jedoch zu einer geordneteren Lipiddoppelschicht, die in der Lage ist, GUVs zu bilden.

Die ungesättigten Imidazollipide fluidisieren Phospholipidmembranen, da ihre Doppelbindungen das Volumen des hydrophoben Bereichs der Lipiddoppelschicht vergrößern, indem sie durch die Ausbildung von Knicken die Lipidpackungsdichte verringern. Ein Einbau in große unilamellare Vesikel destabilisiert diese, da sie wie die C15-Varianten das Biegemodul der

Membran verändern. Die Wirkung der methylierten geladenen Version unterscheidet sich nicht wesentlich von der des ungeladenen Lipids auf Imidazolbasis.

Fluoreszenzspektroskopische Messungen eines carboxylierten Imidazoliumsalzes ergaben ein vielseitiges Strukturderivat zur Nachahmung von Phospholipiden. Schließlich wurde bewiesen, dass das imidazolbasierte Cholesterin im Vergleich zur natürlichen Verbindung ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften aufweist, einschließlich seiner Neigung Phasenseparation unter Bildung von *lipid rafts* zu induzieren. Die laterale Membranorganisation und Domänenstruktur werden dabei nur geringfügig beeinflusst. Das neuartige ungeladene Imidazolcholesterin-Derivat kann als verbesserte Variante angesehen werden, da es keine unnatürliche positiv geladene Gruppe enthält, die in *in vivo* Experimenten zu unerwünschten Wechselwirkungen führen könnte. Wie neuere Studien nahelegen, kann ein solches Analogon verwendet werden, um die wenig erforschte dynamische Visualisierung der Cholesterinverteilung und -funktion in lebenden Zellen zu untersuchen.<sup>[148,163]</sup> Zukünftige Arbeiten könnten auch andere mögliche Anwendungen untersuchen, wie etwa die Entwicklung modifizierter Vesikelsysteme, die als Arzneimitteltransporter dienen, da die imidazolbasierte Kopfgruppe nicht von Lipasen angegriffen wird und daher den Verdauungsprozess überleben kann.<sup>[164]</sup>

# Fazit

---

In dieser Arbeit wurden mehrere Projekte bearbeitet, die sich mit dem Studium von Biomembranen und dem Einfluss physikalischer und chemischer Parameter auf deren Eigenschaften befassen. Dabei wurden wichtige Erkenntnisse erhalten, die sowohl die Grundlagenforschung an Zellmembranen bereichern als auch mehrere Anwendungsfelder im Arzneimitteldesign und der Nahrungsmittelkonservierung eröffnen. Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Projekte zusammengefasst:

(I) EINFLUSS VERSCHIEDENER MARSSALZE AUF DIE STRUKTUR VON MODELLBIOMEMBRANEN

Mithilfe kalorimetrischer, spektroskopischer und mikroskopischer Methoden konnten Modellmembranen aus Phospholipiden unter der Einwirkung auf dem Mars vorkommender Salze analysiert werden. Dabei zeigten kosmotrope Sulfatsalze einen deutlich geringeren Einfluss auf die biophysikalischen Parameter der Membran als die chaotropen Perchlorate. Vesikel aus ungesättigten Lipiden tolerieren die Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen und scheinen daher am geeignetsten als Hauptbestandteil von Zellmembranen, die solch harschen Umweltbedingungen ausgesetzt sind.

(II) LEBEN UNTER EXTREMEN BEDINGUNGEN IN HINBLICK AUF BIOMEMBRANSYSTEME

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen erlaubten die Untersuchung von Adaptionenmechanismen von Zellmembranen an verschiedene Umweltbedingungen. Durch Konformationsänderungen und Domänenbildung bleiben Membranen selbst unter hohen hydrostatischen Drücken im Kilobarbereich stabil. Komplexere Lipidsystemen gleichen große osmotische Druckdifferenzen in hypotonischen Lösungen über oszillierende Phasenseparationen und transiente Porenbildungen aus. Hypertonische Bedingungen führen zur Ausbildung mehrerer kleinerer Vesikel, die als primitiver Prozess der Zellteilung angesehen werden könnten.

(III) EINFLUSS EINES ANTIMIKROBIELLEN PEPTIDS AUF BAKTERIELLE MEMBRANEN UNTER HOCHDRUCK

Messungen der lateralen Ordnung und der kalorimetrischen Eigenschaften bakterieller Modellmembranen in Kombination mit dem antimikrobiellen Peptid (P)GKY20 demonstrierten die Wechselwirkung des cAMPs mit der Membranoberfläche. Die gleichzeitige Analyse druckabhängiger FT-IR-Spektren der Lipide und des Peptids ließ Rückschlüsse auf diese Interaktion unter Hochdruck zu. Durch die Ausbildung einer helikalen Konformation interagiert GKY20 mit den Lipidkopfguppen und reduziert dabei die Repulsion zwischen den verschiedenen Lipiden innerhalb der Doppelschicht. Aufgrund des antimikrobiellen Charakters des Peptids, gepaart mit der Lebensmittelkonservierung durch Hochdruck, kann ein Konzept erarbeitet werden, um Nahrungsmittel schonend zu sterilisieren, sodass eine längere Haltbarkeit erreicht werden kann.

(IV) WIRKUNG VON INDUCIN AUF LYSOSOMALE MODELLMEMBRANEN

Fluoreszenzspektroskopische und -mikroskopie Untersuchungen zeigten die lysosomotropischen Eigenschaften verschiedener pseudo-Naturstoffe an einem komplexen Modellsystem. Die Diffusion durch Lysosomen erlaubt es den Verbindungen, den katalysierenden pH-Wert des Zellorganells zu erhöhen, womit es zu drastischen Einschränkungen der Verdauung von Biopolymeren in der Zelle kommt. Die vielversprechendste Substanz könnte aufgrund dieser Fähigkeiten in Zukunft als Arzneistoff für bestimmte Krebsarten verwendet werden, die sich den Prozess der Autophagie zu Nutze machen.

(V) EINFLUSS VON LIPIDIERTEN IMIDAZOLEN AUF LIPIDMODELMEMBRANEN

Kalorimetrische, spektroskopische und mikroskopische Verfahren wurden genutzt, um den Einfluss von eingebauten lipidierten Imidazolen in Modellmembranen zu untersuchen. Diese im Vergleich zu bereits charakterisierten Imidazoliumsalzen ungeladenen Verbindungen ließen sich teilweise unter Veränderung der Membranfluidität interkalieren, sodass diese gezielt für die Manipulation von Membraneigenschaften verwendet werden können. Ein Cholesterinanalogen verhielt sich ähnlich wie die natürlich in Biomembranen vorkommende Verbindung, weswegen



ein markiertes Mimetikum Einblicke in bisher unbekannte cholesterinabhängige zelluläre Prozesse ermöglichen könnte.

# Literaturverzeichnis

---

- [1] R. Winter, F. Noll, C. Czeslik, *Methoden Der Biophysikalischen Chemie*, Vieweg+Teubner, Wiesbaden, **2011**.
- [2] E. Sackmann, *Biomembranen: Physikalische Prinzipien Der Selbstorganisation Und Funktion Als Integrierte Systeme Zur Signalerkennung, -Verstärkung Und -Übertragung Auf Molekularer Ebene*, Westdt. Ver., Opladen, **1988**.
- [3] W. Dowhan, *Annu Rev Biochem* **1997**, *66*, 199–232.
- [4] G. L. Nicolson, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2014**, *1838*, 1451–1466.
- [5] R. Lipowsky, E. Sackmann, in *Handbook of Biological Physics*, Elsevier/North Holland, Amsterdam, **1995**, pp. 1–63.
- [6] G. van Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**, *9*, 112–124.
- [7] G. van Meer, A. I. P. M. de Kroon, *J Cell Sci* **2011**, *124*, 5–8.
- [8] Ü. Coskun, K. Simons, *Structure* **2011**, *19*, 1543–1548.
- [9] A. H. Merrill, *Chem Rev* **2011**, *111*, 6387–6422.
- [10] M. Sinensky, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1974**, *71*, 522–525.
- [11] C. Tanford, *Science (1979)* **1978**, *200*, 1012–1018.
- [12] P. R. Cullis, B. De Kruijff, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1979**, *559*, 399–420.
- [13] J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, B. W. Ninham, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2* **1976**, *72*, 1525.
- [14] J. M. Seddon, R. H. Templer, in *Handbook of Biological Physics*, Elsevier/North Holland, Amsterdam, **1995**, pp. 97–160.
- [15] H. Heerklotz, R. M. Epand, *Biophys J* **2001**, *80*, 271–279.
- [16] P. T. T. Wong, D. J. Siminovitch, H. H. Mantsch, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1988**, *947*, 139–171.
- [17] M. Kogut, *Trends Biochem Sci* **1980**, *5*, 47–50.
- [18] M. B. Sankaram, T. E. Thompson, *Biochemistry* **1990**, *29*, 10676–10684.
- [19] M. Nielsen, L. Miao, J. H. Ipsen, M. J. Zuckermann, O. G. Mouritsen, *Phys Rev E* **1999**, *59*, 5790–5803.
- [20] J. Hjort Ipsen, G. Karlström, O. G. Mouritsen, H. Wennerström, M. J. Zuckermann, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1987**, *905*, 162–172.
- [21] E. Sezgin, I. Levental, S. Mayor, C. Eggeling, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2017**, *18*, 361–374.
- [22] K. Simons, E. Ikonen, *Nature* **1997**, *387*, 569–572.
- [23] K. Simons, D. Toomre, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2000**, *1*, 31–39.
- [24] N. Merino, H. S. Aronson, D. P. Bojanova, J. Feyhl-Buska, M. L. Wong, S. Zhang, D. Giovannelli, *Front Microbiol* **2019**, *10*, DOI 10.3389/fmicb.2019.00780.
- [25] J. Li, X. Xiao, M. Zhou, Y. Zhang, *Appl Environ Microbiol* **2023**, *89*, DOI 10.1128/aem.01304-22.
- [26] L. J. Rothschild, R. L. Mancinelli, *Nature* **2001**, *409*, 1092–1101.
- [27] I. Daniel, P. Oger, R. Winter, *Chem Soc Rev* **2006**, *35*, 858.
- [28] J. Kallmeyer, R. Pockalny, R. R. Adhikari, D. C. Smith, S. D'Hondt, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109*, 16213–16216.
- [29] C. Magnabosco, L.-H. Lin, H. Dong, M. Bomberg, W. Ghiorse, H. Stan-Lotter, K. Pedersen, T. L. Kieft, E. van Heerden, T. C. Onstott, *Nat Geosci* **2018**, *11*, 707–717.

- [30] R. Orosei, C. Ding, W. Fa, A. Giannopoulos, A. Hérique, W. Kofman, S. E. Lauro, C. Li, E. Pettinelli, Y. Su, S. Xing, Y. Xu, *Life* **2020**, *10*, 120.
- [31] R. Orosei, S. E. Lauro, E. Pettinelli, A. Cicchetti, M. Coradini, B. Cosciotti, F. Di Paolo, E. Flamini, E. Mattei, M. Pajola, F. Soldovieri, M. Cartacci, F. Cassenti, A. Frigeri, S. Giuppi, R. Martufi, A. Masdea, G. Mitri, C. Nenna, R. Noschese, M. Restano, R. Seu, *Science (1979)* **2018**, *361*, 490–493.
- [32] C. S. Cockell, *Astrobiology: Understanding Life in the Universe*, Blackwell Publ., Oxford, **2020**.
- [33] S. M. Clifford, J. Lasue, E. Heggy, J. Boisson, P. McGovern, M. D. Max, *J Geophys Res* **2010**, *115*, E07001.
- [34] M. H. Hecht, S. P. Kounaves, R. C. Quinn, S. J. West, S. M. M. Young, D. W. Ming, D. C. Catling, B. C. Clark, W. V. Boynton, J. Hoffman, L. P. DeFlores, K. Gospodinova, J. Kapit, P. H. Smith, *Science (1979)* **2009**, *325*, 64–67.
- [35] V. J. Laye, S. DasSarma, *Astrobiology* **2018**, *18*, 412–418.
- [36] S. Lenton, N. H. Rhys, J. J. Towey, A. K. Soper, L. Dougan, *Nat Commun* **2017**, *8*, 919.
- [37] S. Gault, M. W. Jaworek, R. Winter, C. S. Cockell, *Commun Biol* **2020**, *3*, 550.
- [38] M. I. Angelova, D. S. Dimitrov, *Faraday Discuss Chem Soc* **1986**, *81*, 303.
- [39] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, MA, **2006**.
- [40] C. Bernsdorff, A. Wolf, R. Winter, E. Gratton, *Biophys J* **1997**, *72*, 1264–1277.
- [41] G. Cevc, Ed. , *Phospholipids Handbook*, CRC Press, **2018**.
- [42] R. Winter, C. Jeworrek, *Soft Matter* **2009**, *5*, 3157.
- [43] J. W. Bye, R. J. Falconer, *Protein Science* **2013**, *22*, 1563–1570.
- [44] J. R. Rydall, P. M. Macdonald, *Biochemistry* **1992**, *31*, 1092–1099.
- [45] G. Basaiez, J. L. Nieva, E. Rivas, A. Alonso, F. M. Goni, *Biophys J* **1996**, *70*, 2299–2306.
- [46] C. V. Kulkarni, W. Wachter, G. Iglesias-Salto, S. Engelskirchen, S. Ahualli, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 3004–3021.
- [47] B. Tenchov, R. Koynova, *Chem Phys Lipids* **2017**, *208*, 65–74.
- [48] J. M. Seddon, R. H. Templer, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Physical and Engineering Sciences* **1993**, *344*, 377–401.
- [49] J. Erbes, C. Czeslik, W. Hahn, R. Winter, M. Rappolt, G. Rapp, *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **1994**, *98*, 1287–1293.
- [50] V. Teixeira, M. J. Feio, M. Bastos, *Prog Lipid Res* **2012**, *51*, 149–177.
- [51] R. Kataoka, S. Aruga, S. Mitaku, K. Kinoshita, A. Ikegami, *Biophys Chem* **1985**, *21*, 277–284.
- [52] R. Zorn, G. Nimtz, *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **1990**, *94*, 573–578.
- [53] B. Tenchov, E. M. Vescio, G. D. Sprott, M. L. Zeidel, J. C. Mathai, *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 10016–10023.
- [54] A. M. Hyde, S. L. Zultanski, J. H. Waldman, Y.-L. Zhong, M. Shevlin, F. Peng, *Org Process Res Dev* **2017**, *21*, 1355–1370.
- [55] C. Cui, Y. Deng, L. Han, *Sci China Mater* **2020**, *63*, 686–702.
- [56] S. Hyde, Z. Blum, T. Landh, S. Lidin, B. W. Ninham, S. Andersson, K. Larsson, *The Language of Shape*, Elsevier, Amsterdam, **1997**.
- [57] J. C. S. Ho, P. Rangamani, B. Liedberg, A. N. Parikh, *Langmuir* **2016**, *32*, 2151–2163.
- [58] N. Wongsirojkul, N. Shimokawa, P. Opaprakasit, M. Takagi, T. Hamada, *Langmuir* **2020**, *36*, 2937–2945.
- [59] R. Phillips, J. Kondev, J. Theriot, H. G. Garcia, N. Orme, *Physical Biology of the Cell*, Garland Science, **2012**.

- [60] U. Seifert, K. Berndl, R. Lipowsky, *Phys Rev A (Coll Park)* **1991**, *44*, 1182–1202.
- [61] J. Käs, E. Sackmann, *Biophys J* **1991**, *60*, 825–844.
- [62] W.-C. Tsai, G. W. Feigenson, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2019**, *1861*, 478–485.
- [63] K. Bucher, I. Stober, *Geofluids* **2010**, *10*, 241–253.
- [64] R. Winter, *Annu Rev Biophys* **2019**, *48*, 441–463.
- [65] C. R. Robinson, S. G. Sligar, *Methods Enzymol* **1995**, *259*, 395–427.
- [66] R. Winter, D. Lopes, S. Grudzielanek, K. Vogtt, *Journal of Non-Equilibrium Thermodynamics* **2007**, *32*, 41–97.
- [67] C. Roffay, G. Molinard, K. Kim, M. Urbanska, V. Andrade, V. Barbarasa, P. Nowak, V. Mercier, J. García-Calvo, S. Matile, R. Loewith, A. Echard, J. Guck, M. Lenz, A. Roux, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2021**, *118*, DOI 10.1073/pnas.2103228118.
- [68] E. Bremer, R. Krämer, *Annu Rev Microbiol* **2019**, *73*, 313–334.
- [69] N. Empadinhas, M. S. da Costa, *Int Microbiol* **2008**, *11*, 151–161.
- [70] A. Weinberger, F.-C. Tsai, G. H. Koenderink, T. F. Schmidt, R. Itri, W. Meier, T. Schmatko, A. Schröder, C. Marques, *Biophys J* **2013**, *105*, 154–164.
- [71] N. L. C. McCarthy, O. Ces, R. V. Law, J. M. Seddon, N. J. Brooks, *Chemical Communications* **2015**, *51*, 8675–8678.
- [72] D. L. Worcester, M. Weinrich, *J Phys Chem Lett* **2015**, *6*, 4417–4421.
- [73] R. Winter, C. Czeslik, *Z Kristallogr Cryst Mater* **2000**, *215*, 454–474.
- [74] C. Czeslik, O. Reis, R. Winter, G. Rapp, *Chem Phys Lipids* **1998**, *91*, 135–144.
- [75] C. Nicolini, J. Kraineva, M. Khurana, N. Periasamy, S. S. Funari, R. Winter, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2006**, *1758*, 248–258.
- [76] S. Kapoor, A. Werkmüller, C. Denter, Y. Zhai, J. Markgraf, K. Weise, N. Opitz, R. Winter, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2011**, *1808*, 1187–1195.
- [77] S. L. Veatch, S. L. Keller, *Biophys J* **2003**, *85*, 3074–3083.
- [78] L. A. Turkevich, J. A. Mann, *Langmuir* **1990**, *6*, 445–456.
- [79] G. Wiegand, E. U. Franck, *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **1994**, *98*, 809–817.
- [80] P. W. Bridgman, *The Physics of High Pressure*, G. Bell And Sons, London, **1931**.
- [81] R. Fettiplace, D. A. Haydon, *Physiol Rev* **1980**, *60*, 510–550.
- [82] M. Chabanon, J. C. S. Ho, B. Liedberg, A. N. Parikh, P. Rangamani, *Biophys J* **2017**, *112*, 1682–1691.
- [83] K. Oglęcka, P. Rangamani, B. Liedberg, R. S. Kraut, A. N. Parikh, *Elife* **2014**, *3*, DOI 10.7554/eLife.03695.
- [84] U. Seifert, R. Lipowsky, *Structure and Dynamics of Membranes* **1995**, *1*, 403–463.
- [85] S. Nayab, M. A. Aslam, S. ur Rahman, Z. ud D. Sindhu, S. Sajid, N. Zafar, M. Razaq, R. Kanwar, Amanullah, *Int J Pept Res Ther* **2022**, *28*, 46.
- [86] R. Oliva, S. K. Mukherjee, Z. Fetahaj, S. Möbitz, R. Winter, *Chemical Communications* **2020**, *56*, 11577–11580.
- [87] R. Oliva, S. K. Mukherjee, L. Ostermeier, L. A. Pazurek, S. Kriegler, V. Bader, D. Prumbaum, S. Raunser, K. F. Winklhofer, J. Tatzelt, R. Winter, *Chemistry – A European Journal* **2021**, *27*, 11845–11851.
- [88] Y. Huan, Q. Kong, H. Mou, H. Yi, *Front Microbiol* **2020**, *11*, DOI 10.3389/fmicb.2020.582779.
- [89] Y. L. Vishweshwaraiah, A. Acharya, V. Hegde, B. Prakash, *NPJ Sci Food* **2021**, *5*, 26.
- [90] Y. Liu, D. E. Sameen, S. Ahmed, J. Dai, W. Qin, *Trends Food Sci Technol* **2021**, *112*, 471–483.
- [91] M. Rai, R. Pandit, S. Gaikwad, G. Kövics, *J Food Sci Technol* **2016**, *53*, 3381–3394.

- [92] M. Rahnamaeian, A. Vilcinskas, *Appl Microbiol Biotechnol* **2015**, *99*, 8847–8855.
- [93] J. L. Romero, M. J. Grande Burgos, R. Pérez-Pulido, A. Gálvez, R. Lucas, *Front Microbiol* **2017**, *8*, DOI 10.3389/fmicb.2017.01650.
- [94] M. van Boekel, V. Fogliano, N. Pellegrini, C. Stanton, G. Scholz, S. Lalljie, V. Somoza, D. Knorr, P. R. Jasti, G. Eisenbrand, *Mol Nutr Food Res* **2010**, *54*, 1215–1247.
- [95] H. M. Ulmer, H. Herberhold, S. Fahsel, M. G. Gänzle, R. Winter, R. F. Vogel, *Appl Environ Microbiol* **2002**, *68*, 1088–1095.
- [96] Q. Xia, Q. Liu, G. I. Denoya, C. Yang, F. J. Barba, H. Yu, X. Chen, *Front Nutr* **2022**, *9*, DOI 10.3389/fnut.2022.878904.
- [97] K. Koutsoumanis, A. Alvarez-Ordóñez, D. Bolton, S. Bover-Cid, M. Chemaly, R. Davies, A. De Cesare, L. Herman, F. Hilbert, R. Lindqvist, M. Nauta, L. Peixe, G. Ru, M. Simmons, P. Skandamis, E. Suffredini, L. Castle, M. Crotta, K. Grob, M. R. Milana, A. Petersen, A. X. Roig Sagués, F. Vinagre Silva, E. Barthélémy, A. Christodoulidou, W. Messens, A. Allende, *EFSA Journal* **2022**, *20*, DOI 10.2903/j.efsa.2022.7128.
- [98] D. A. Holdbrook, S. Singh, Y. K. Choong, J. Petrlova, M. Malmsten, P. J. Bond, N. K. Verma, A. Schmidtchen, R. Saravanan, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2018**, *1860*, 2374–2384.
- [99] G. Kasetty, P. Papareddy, M. Kalle, V. Rydengård, M. Mörgelin, B. Albiger, M. Malmsten, A. Schmidtchen, *Antimicrob Agents Chemother* **2011**, *55*, 2880–2890.
- [100] R. Oliva, P. Del Vecchio, A. Grimaldi, E. Notomista, V. Cafaro, K. Pane, V. Schuabb, R. Winter, L. Petraccone, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2019**, *21*, 3989–3998.
- [101] P. T. T. Wong, D. J. Moffat, *Appl Spectrosc* **1989**, *43*, 1279–1281.
- [102] P. B. Tooke, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **1988**, *7*, 130–136.
- [103] A. Adochitei, G. Drochioiu, *Revue Roumaine de Chimie* **2011**, *56*, 783–791.
- [104] S. Lopes, C. S. Neves, P. Eaton, P. Gameiro, *Anal Bioanal Chem* **2010**, *398*, 1357–1366.
- [105] B. Pozo Navas, K. Lohner, G. Deutsch, E. Sevcsik, K. A. Riske, R. Dimova, P. Garidel, G. Pabst, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2005**, *1716*, 40–48.
- [106] O. Reis, R. Winter, T. W. Zerda, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1996**, *1279*, 5–16.
- [107] A. Blume, W. Huebner, G. Messner, *Biochemistry* **1988**, *27*, 8239–8249.
- [108] R. N. Lewis, R. N. McElhaney, W. Pohle, H. H. Mantsch, *Biophys J* **1994**, *67*, 2367–2375.
- [109] P. Garidel, A. Blume, *European Biophysics Journal* **2000**, *28*, 629–638.
- [110] K. Murzyn, T. Róg, M. Pasenkiewicz-Gierula, *Biophys J* **2005**, *88*, 1091–1103.
- [111] T. Parasassi, E. Gratton, *J Fluoresc* **1995**, *5*, 59–69.
- [112] R. Saravanan, D. A. Holdbrook, J. Petrlova, S. Singh, N. A. Berglund, Y. K. Choong, S. Kjellström, P. J. Bond, M. Malmsten, A. Schmidtchen, *Nat Commun* **2018**, *9*, 2762.
- [113] T. Takekiyo, T. Imai, M. Kato, Y. Taniguchi, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2006**, *1764*, 355–363.
- [114] Y. Mori, H. Okumura, *J Phys Chem Lett* **2013**, *4*, 2079–2083.
- [115] Y. Mori, H. Okumura, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2014**, *82*, 2970–2981.
- [116] J. Eisenblätter, M. Zein, R. Winter, *Progress in Biotechnology* **2002**, *19*, 131–138.
- [117] C. García-Graells, B. Masschalck, C. W. Michiels, *J Food Prot* **1999**, *62*, 1248–1254.
- [118] A. Del Olmo, J. Calzada, M. Nuñez, *Lett Appl Microbiol* **2011**, *52*, 9–14.
- [119] N. Mizushima, Y. Ohsumi, T. Yoshimori, *Cell Struct Funct* **2002**, *27*, 421–429.
- [120] N. S. Castrejón-Jiménez, K. Leyva-Paredes, J. C. Hernández-González, J. Luna-Herrera, B. E. García-Pérez, *Biosci Trends* **2015**, *9*, 149–159.
- [121] B. Levine, N. Mizushima, H. W. Virgin, *Nature* **2011**, *469*, 323–335.

- [122] T. Eisenberg, H. Knauer, A. Schauer, S. Büttner, C. Ruckenstuhl, D. Carmona-Gutierrez, J. Ring, S. Schroeder, C. Magnes, L. Antonacci, H. Fussi, L. Deszcz, R. Hartl, E. Schraml, A. Criollo, E. Megalou, D. Weiskopf, P. Laun, G. Heeren, M. Breitenbach, B. Grubeck-Loebenstern, E. Herker, B. Fahrenkrog, K.-U. Fröhlich, F. Sinner, N. Tavernarakis, N. Minois, G. Kroemer, F. Madeo, *Nat Cell Biol* **2009**, *11*, 1305–1314.
- [123] C. G. Towers, A. Thorburn, *EBioMedicine* **2016**, *14*, 15–23.
- [124] R. Ashoor, R. Yafawi, B. Jessen, S. Lu, *PLoS One* **2013**, *8*, e82481.
- [125] M. Stark, T. F. D. Silva, G. Levin, M. Machuqueiro, Y. G. Assaraf, *Cells* **2020**, *9*, 1082.
- [126] O. F. Kuzu, R. Gowda, A. Sharma, G. P. Robertson, *Mol Cancer Ther* **2014**, *13*, 1690–1703.
- [127] D. Casares, P. V. Escribá, C. A. Rosselló, *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, 2167.
- [128] H. D. Gallala, K. Sandhoff, *Neurochem Res* **2011**, *36*, 1594–1600.
- [129] Z. Z. Zhao, Z. T. Liang, H. Zhou, Z. H. Jiang, Z. Q. Liu, Y. F. Wong, H. X. Xu, L. Liu, *Biol Pharm Bull* **2005**, *28*, 105–109.
- [130] M. Akbarzadeh, J. Flegel, S. Patil, E. Shang, R. Narayan, M. Buchholzer, N. S. Kazemian Jasemi, M. Grigalunas, A. Krzyzanowski, D. Abegg, A. Shuster, M. Potowski, H. Karatas, G. Karageorgis, N. Mosaddeghzadeh, M. Zischinsky, C. Merten, C. Golz, L. Brieger, C. Strohmam, A. P. Antonchick, P. Janning, A. Adibekian, R. S. Goody, M. R. Ahmadian, S. Ziegler, H. Waldmann, *Angewandte Chemie International Edition* **2022**, *61*, DOI 10.1002/anie.202115193.
- [131] C. Davies, L. Dötsch, M. G. Ciulla, E. Hennes, K. Yoshida, R. Gasper, R. Scheel, S. Sievers, C. Strohmam, K. Kumar, S. Ziegler, H. Waldmann, *Angewandte Chemie International Edition* **2022**, *61*, DOI 10.1002/anie.202209374.
- [132] M. Grigalunas, S. Brakmann, H. Waldmann, *J Am Chem Soc* **2022**, *144*, 3314–3329.
- [133] M. Grigalunas, A. Burhop, S. Zinken, A. Pahl, J.-M. Gally, N. Wild, Y. Mantel, S. Sievers, D. J. Foley, R. Scheel, C. Strohmam, A. P. Antonchick, H. Waldmann, *Nat Commun* **2021**, *12*, 1883.
- [134] M. S. Ostefeld, N. Fehrenbacher, M. Høyer-Hansen, C. Thomsen, T. Farkas, M. Jäättelä, *Cancer Res* **2005**, *65*, 8975–8983.
- [135] L. Groth-Pedersen, M. S. Ostefeld, M. Høyer-Hansen, J. Nylandsted, M. Jäättelä, *Cancer Res* **2007**, *67*, 2217–2225.
- [136] M. Hafner Česen, U. Repnik, V. Turk, B. Turk, *Cell Death Dis* **2013**, *4*, e818.
- [137] U. Wanderlingh, C. Branca, C. Crupi, V. Conti Nibali, G. La Rosa, S. Rifici, J. Ollivier, G. D’Angelo, *J Chem* **2017**, *2017*, 1–8.
- [138] B. Gironi, R. Oliva, L. Petraccone, M. Paolantoni, A. Morresi, P. Del Vecchio, P. Sassi, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2019**, *1861*, 183052.
- [139] D. Marsh, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2010**, *1798*, 688–699.
- [140] K. J. Parra, S. R. Hayek, *Journal of Biological Chemistry* **2018**, *293*, 9124–9125.
- [141] P. Dell’Antone, *Biochem Biophys Res Commun* **1979**, *86*, 180–189.
- [142] G. Üner, Ö. Tağ, Y. Erzurumlu, P. B. Kirmizibayrak, E. Bedir, *Chem Res Toxicol* **2020**, *33*, 2880–2891.
- [143] G. Üner, E. Bedir, O. Serçinoğlu, P. B. Kirmizibayrak, *Sci Rep* **2022**, *12*, 13834.
- [144] O. Julien, M. Kampmann, M. C. Bassik, J. A. Zorn, V. J. Venditto, K. Shimbo, N. J. Agard, K. Shimada, A. L. Rheingold, B. R. Stockwell, J. S. Weissman, J. A. Wells, *Nat Chem Biol* **2014**, *10*, 969–976.
- [145] I. Tanida, T. Ueno, E. Kominami, in *Methods in Molecular Biology*, **2008**, pp. 77–88.
- [146] K. S. Egorova, E. G. Gordeev, V. P. Ananikov, *Chem Rev* **2017**, *117*, 7132–7189.
- [147] A. Benedetto, *Biophys Rev* **2017**, *9*, 309–320.

- [148] A. L. L. Matos, F. Keller, T. Wegner, C. E. C. del Castillo, D. Grill, S. Kudruk, A. Spang, F. Glorius, A. Heuer, V. Gerke, *Commun Biol* **2021**, *4*, DOI 10.1038/s42003-021-02252-5.
- [149] P. Drücker, A. Rühling, D. Grill, D. Wang, A. Draeger, V. Gerke, F. Glorius, H.-J. Galla, *Langmuir* **2017**, *33*, 1333–1342.
- [150] T. Wegner, R. Laskar, F. Glorius, *Curr Opin Chem Biol* **2022**, *71*, 102209.
- [151] S. N. Riduan, Y. Zhang, *Chem Soc Rev* **2013**, *42*, 9055.
- [152] T. Wegner, R. Elias, L. Roling, N. Raj, V. Gerke, M. Fridman, F. Glorius, *ACS Infect Dis* **2022**, *8*, 1815–1822.
- [153] C. M. Mahalakshmi, M. Karthick, M. Shanmugam, V. Chidambaranathan, *Der Pharma Chemica* **2015**, *7*, 14–19.
- [154] D. Wang, C. Richter, A. Rühling, S. Hüwel, F. Glorius, H.-J. Galla, *Biochem Biophys Res Commun* **2015**, *467*, 1033–1038.
- [155] S. Bornemann, M. Herzog, L. Roling, T. O. Paulisch, D. Brandis, S. Kriegler, H. J. Galla, F. Glorius, R. Winter, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2020**, *22*, 9775–9788.
- [156] T. O. Paulisch, S. Bornemann, M. Herzog, S. Kudruk, L. Roling, A. L. Linard Matos, H. Galla, V. Gerke, R. Winter, F. Glorius, *Chemistry – A European Journal* **2020**, *26*, 17176–17182.
- [157] S. Kriegler, T. O. Paulisch, T. Wegner, F. Glorius, R. Winter, *Langmuir* **2021**, *37*, 11996–12006.
- [158] A. Rühling, D. Wang, J. B. Ernst, S. Wulff, R. Honeker, C. Richter, A. Ferry, H.-J. Galla, F. Glorius, *Chemistry - A European Journal* **2017**, *23*, 5920–5924.
- [159] L. Rakers, F. Glorius, *Biophys Rev* **2018**, *10*, 747–750.
- [160] D. Wang, C. Richter, A. Rühling, P. Drücker, D. Siegmund, N. Metzler-Nolte, F. Glorius, H. Galla, *Chemistry – A European Journal* **2015**, *21*, 15123–15126.
- [161] D. Wang, H.-J. Galla, P. Drücker, *Biophys Rev* **2018**, *10*, 735–746.
- [162] 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.
- [163] L. Rakers, D. Grill, A. L. L. Matos, S. Wulff, D. Wang, J. Börgel, M. Körsgen, H. F. Arlinghaus, H.-J. Galla, V. Gerke, F. Glorius, *Cell Chem Biol* **2018**, *25*, 952-961.e12.
- [164] R. Zechner, R. Zimmermann, T. O. Eichmann, S. D. Kohlwein, G. Haemmerle, A. Lass, F. Madeo, *Cell Metab* **2012**, *15*, 279–291.

# Anhang

---

## Weitere Abbildungen

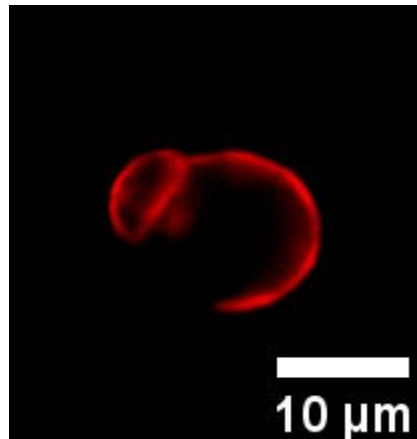


Abbildung A1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von GUVs bestehend aus DPPC mit 0,1 mol% *N*-Rh-DHPE in einer 0,5 molaren  $\text{MgSO}_4$ -Lösung bei 20 °C. (Messung durchgeführt von M. HERZOG)

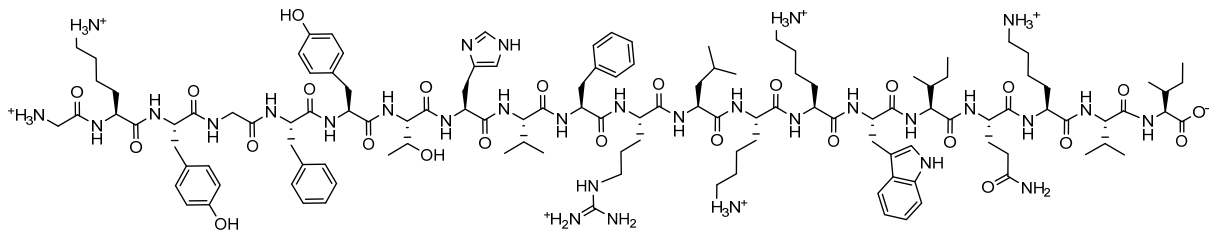


Abbildung A2: Chemische Struktur des Peptids GKY20 bei pH 7,4 (GKYGFYTHVFRLLKWKVI).



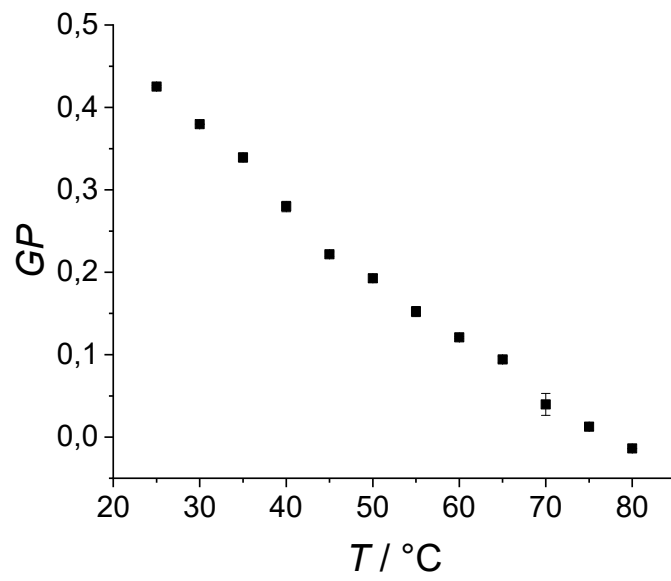


Abbildung A3: *GP*-Werte von Laurdan in unilamellaren Vesikeln aus POPC:Cholesterin:SM:POPE:POPI:BMP in Abhängigkeit der Temperatur bei pH 7,4.

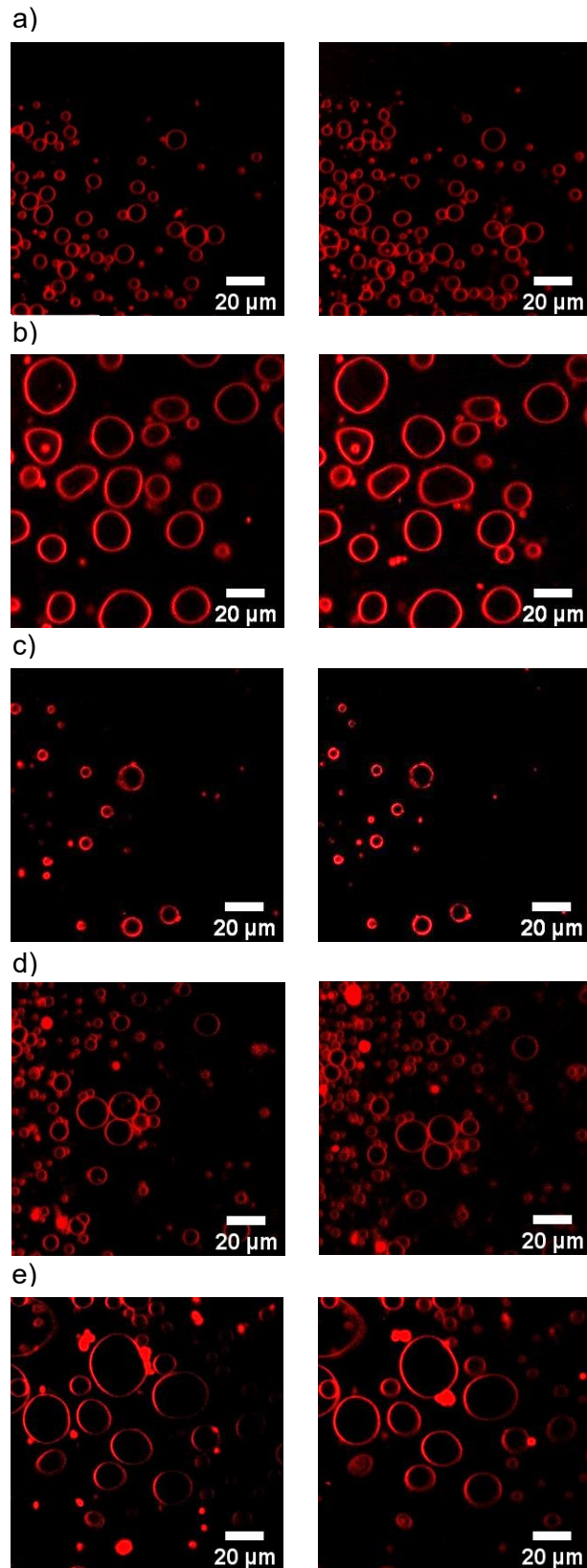


Abbildung A4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GUVs aus POPC:POPG (85:15) bei pH 5 vor und nach Zugabe der Substanz (a) 1a (b) 1b (c) 2a (d) 2b und (e) Siramesin nach bestimmten Zeitpunkten bei 25 °C.

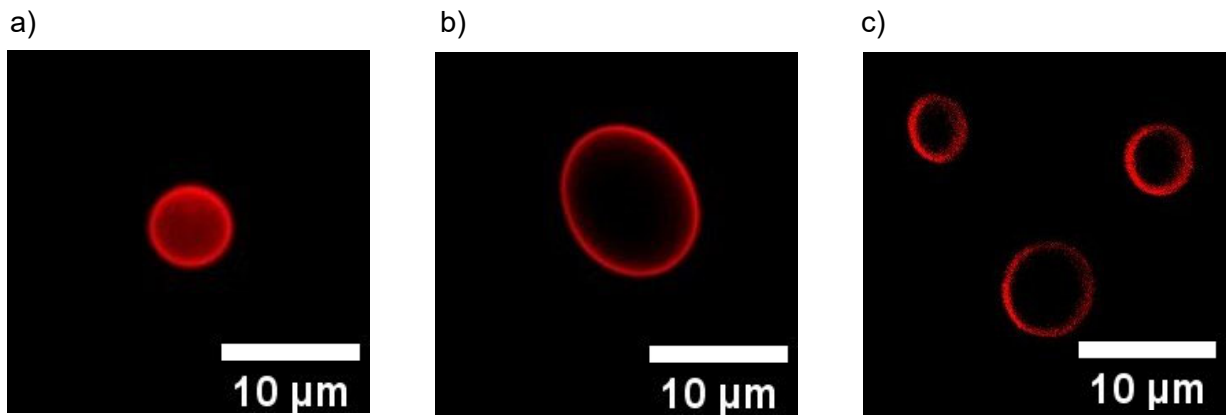


Abbildung A5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Vesikeln bestehend aus a) DPPC:DOPC:Cholesterin:C15 b) DPPC:DOPC:Cholesterin:C17 und c) DPPC:DOPC:Cholesterin:C17M (40:25:25:10 mol%) bei 25 °C.