

# Dissertation

zu der Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

---

## Biophysikalische Einblicke in heterogene Modellbiomembranen, G-Quadruplexe und Eigenschaften der Flüssig-Flüssig- Phasentrennung von Peptiden

---

vorgelegt an der  
Technischen Universität Dortmund  
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie  
von  
M. Sc. Magiliny Manisegaran  
geboren am 10.11.1993 in Lünen

**Dortmund, 2023**





---

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 2018 bis September 2023 am Lehrstuhl für Physikalische Chemie I der Technischen Universität Dortmund unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Roland Winter angefertigt.

Eingereicht am 15.09.2023

Prüfungskommission

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

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



---

Success isn't about how much money you make.  
It's about the difference you make in people's lives.

-Michelle Obama-



---

## Danksagung

---

An dieser Stelle möchte ich mich für die Ermöglichung und Unterstützung der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. ROLAND WINTER bedanken, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit im Lehrstuhl Physikalische Chemie I an der TU Dortmund anzufertigen. Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. STEFAN M. KAST für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Bei PROF. DR. CLAUS CZESLIK möchte ich mich für seine fachliche und technische Unterstützung bedanken. Ein großes Dankeschön geht an ANDREA JEWORREK, die immer eine große Hilfe bei bürokratischen und organisatorischen Angelegenheiten war sowie immer ein offenes Ohr für mich hatte. DR. ROSARIO OLIVA und DR. ROBERT DEC danke ich für die Möglichkeit der Zusammenarbeit bei den wissenschaftlichen Projekten. Außerdem möchte ich mich bei Herrn HOLGER KONOPKA und den Mitarbeitern der mechanischen Werkstatt für die schnelle und sorgfältige Ausführung der Reparaturen bedanken.

Ebenfalls danke ich allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Arbeitskreises der Physikalischen Chemie I für dessen Hilfsbereitschaft bei Problemen und Fragen. Ein besonderer Dank geht an meine Bürokollegin ZAMIRA FETAHAJ für die wissenschaftlichen Gespräche sowie für die motivierenden und aufbauenden Worte in den schwierigen Zeiten meiner Promotion. Danke für deine Freundschaft, liebe Zamira!

Außerdem möchte ich mich beim RESOLV Cluster of Excellence EXC 2033 für die Organisation vielfältiger Vorträge und Workshops bedanken. Dadurch konnte ich mich nicht nur auf wissenschaftlicher, sondern auch auf persönlicher Ebene weiterbilden. Ganz besonders möchte ich meinen Dank der Koordinatorin vom iGSS DR. SEDAKAT ALTINPINAR für ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht äußern.

Bei meinen Freunden, ob aus der Schule, dem Studium oder der Promotionszeit bedanke ich mich für die stetige Unterstützung, Hilfsbereitschaft, Geduld und aufmunternden Worte, aber auch für die wohlthuenden Ablenkungen mit Kochabenden, Backsessions, Zoobesuche oder Weihnachtsmarktbesuchen. Meiner ganzen Familie, besonders meinen Eltern RAJEE und MANISEGARAN, danke ich für Ihre Unterstützung und die Ermöglichung für diesen Lebensweg: அன்புள்ள பெற்றோருக்கு நன்றி!



---

*Für meine Großmutter Annam (\*13.03.1928-†25.09.2022)*

und meine Oma Annaluxmy (\*20.10.44)

- உங்கள் ஆசீர்வாதத்திற்கு நன்றி-



---

## Abkürzungsverzeichnis

---

&	und
22AG	menschliche telomere Sequenz
1KS	Einkomponentensystem
3KS	Dreikomponentensystem
5KS	Fünfkomponentensystem
25-OH	25-Hydroxycholesterol
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
A	Adenin
A / Ala	Alanin
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPS	<i>Aqueous two phase system</i> , dt. wässriges Zwei-Phasen-System
Berb	Berberin
bzw.	Beziehungsweise
$c$	Konzentration
C	Cytosin
C / Cys	Cystein
CD	<i>circular dichroismus</i> , dt. Zirkulardichroismus
CCP	kritischer Packungsparameter
Chol.	Cholesterol
$d$	lamellare Schichtdicke
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , dt. Desoxyribonukleinsäure
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPG	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)

---

DPPG	1,2-Dihexade-canoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1' <i>rac</i> glycerol)
E / Glu	Glutaminsäure
et al.	et alia, dt. unter anderem
FM	Fluoreszenzmikroskopie
FS	Fluoreszenzspektroskopie
G	Guanin
G / Gly	Glycin
G-4Q	Guanin-Quadruplex
GP	<i>generalized polarization</i> , dt. generalisierte Polarisation
GUV	<i>giant unilamellar vesicle</i> , dt. riesige unilamellare Vesikel
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HHP	<i>High hydrostatic pressure</i> , dt. hoher hydrostatischer Druck
I / Ile	Isoleucin
K / Lys	Lysin
$K_b$	Bindungskonstante
KCl	Kaliumchlorid
L / Leu	Leucin
$l_d$	<i>liquid disordered</i> , dt. flüssig ungeordnete Phase
$l_o$	<i>liquid ordered</i> , dt. flüssig geordnete Phase
$L_\alpha$	flüssig-kristalline Lipidphase
$L_\beta$	Gelphase
LLPS	<i>liquid liquid phase separation</i> , dt. Flüssig-Flüssig-Phasentrennung
LUCA	<i>Last Universal Common Ancestor</i> , dt. Urvorfahr
MLV	multilamellare Vesikel
NaCl	Natriumchlorid
NBD-DHPE	Nitrobenzooxadiazol-1,2-dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
N-Rh-DHPE	<i>N</i> -(Lissamin Rhodamin B Sulfonyl)-1,2-dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
$p$	Druck
$P_\beta$	Gelphase mit periodisch gewellter Überstruktur
PEG	Polyethylenglykol
PVA	Polyvinylalkohol
Q / Gln	Glutamin

---

RG-1	RNA Sequenz: GGCUGGCAAUGGCGG
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , dt. Ribonukleinsäure
S / Ser	Serin
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>
SAXS	<i>small angle X-ray scattering</i> , dt. RÖNTGENkleinwinkelstreuung
SUV	<i>small unilamellar vesicle</i> , dt. kleine unilamellare Vesikel
s <sub>0</sub>	<i>solid ordered</i> , dt. Gelphase
T	Thymin
<i>T</i>	Temperatur
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Uracil
ULV	unilamellare Vesikel
UV	Ultraviolett
V / Val	Valin
Vis	<i>visible</i> , dt. sichtbar
X <sub>y</sub>	Stoffmengenanteil von y

---

---

# Inhaltsverzeichnis

---

Kurzzusammenfassung .....	1
Abstract.....	3
1. Einleitung .....	5
1.1. Lipide .....	5
1.2. Nukleinsäuren .....	11
1.3. Proteine .....	13
2. Zielsetzung .....	15
3. Kapitel: Lipide und 25-Hydroxycholesterol.....	17
3.1. Einleitung.....	19
3.2. Material und Methoden.....	22
3.2.1. Material.....	22
3.2.2. Fluoreszenzspektroskopie (FS).....	23
3.2.3. RÖNTGENkleinwinkelstreuung (SAXS).....	24
3.2.4. Fluoreszenzmikroskopie (FM) .....	24
3.3. Ergebnisse und Diskussion .....	26
3.3.1. Fluoreszenzspektroskopie (FS) – Messungen .....	26
3.3.2. RÖNTGENkleinwinkelstreuung (SAXS) - Messungen .....	30
3.3.3. Fluoreszenzmikroskopie (FM) – Messungen .....	33
3.4. Zusammenfassung .....	38
4. Kapitel: G-Quadruplexe und Berberin .....	39
4.1. Einleitung.....	41
4.2. Material und Methoden.....	44
4.2.1. Material.....	44
4.2.2. UV/Vis - Spektroskopie .....	44

---

4.2.3.	Fluoreszenzspektroskopie im stationären Zustand .....	45
4.2.4.	Job's Plot.....	45
4.2.5.	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) – Experiment.....	46
4.2.6.	Zirkulardichroismus (CD) - Spektroskopie.....	46
4.3.	Ergebnisse und Diskussion.....	47
4.4.	Zusammenfassung .....	57
5.	Kapitel: Lipide und Flüssig-Flüssig-Phasentrennung .....	59
5.1.	Einleitung .....	61
5.2.	Material und Methoden .....	67
5.2.1.	Material (Lipide und Peptid ACC <sub>1-13</sub> K <sub>32</sub> & ATP).....	67
5.2.2.	Material (Lipide und PEG & Dextran) .....	68
5.2.3.	Fluoreszenzmikroskopie (FM).....	69
5.3.	Ergebnisse und Diskussion.....	71
5.4.	Zusammenfassung .....	83
6.	Literaturverzeichnis .....	85
7.	Anhang.....	I
7.1.	Weitere Abbildungen .....	I
7.2.	Abbildungsverzeichnis .....	IV

---

## Kurzzusammenfassung

---

Neben der Frage nach dem Leben unter extremen Bedingungen und auch nach dem Ursprung des Lebens verfolgen physikalisch-chemische Messungen an Biomolekülen weitere wissenschaftliche Interessen. Die biophysikalische Chemie ist eine Forschungsdisziplin, die aufgrund ihrer Überschneidung in Biologie, Chemie und Physik die Möglichkeit bietet, Antworten auf medizinische und biochemische Fragestellungen zu liefern. Es werden Modellsysteme von biologischen Makromolekülen verwendet, um biologische Prozesse unter kontrollierten Bedingungen und dem Einfluss verschiedener chemisch-physikalischer Parameter zu untersuchen. Dies fördert ein umfangreiches Verständnis der Prozesse, welches Ansätze zur Diagnose und Behandlung von Krankheiten liefern kann.

Das 25-Hydroxycholesterol, welches im menschlichen Körper als auch in Fischen bei einer Infektion beispielweise mit dem SARS-CoV-2 gebildet wird, hat Einfluss auf die Struktur von heterogenen Membransystemen. Durch die Erhöhung der lateralen Ordnung der Lipiddoppelschicht und Förderung der Bildung von Mikrodomänen kann die Fusion von Viren an die Zellmembranen blockiert werden. Die Wirkung erhöht sich dabei unter Druckeinfluss bei anionischen Membransystemen.

Die Untersuchung des Bindungsverhaltens von Berberin an RNA G-Quadruplexe in Anwesenheit verschiedener Kationen kann neue Entwicklungsansätze für antivirale Arzneimittel auf Grundlage der Berberinstruktur hervorbringen. Zwei Berberinmoleküle binden dabei an einen Quadruplex und bei der Komplexbildung wird eine Kompaktisierung der G-Quadruplexe beobachtet.

Heterogene Membransysteme weisen eine Phasenkoexistenz auf, was als eine Kompartimentierung der Zellmembran aufgefasst werden kann. Proteine und Nukleinsäuren können die Eigenschaft der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung aufweisen. Auf diese Weise entstehen (membranlose) Organellen. Anhand der Studien in dieser Arbeit kann die These aufgestellt werden, dass die Phasen der beiden Systeme, Zellinneres und Zellmembran, miteinander interagieren und damit für biologische Prozesse von hoher Relevanz ist.



---

## Abstract

---

In addition to the question of life under extreme conditions and the origin of life, physicochemical measurements on biomolecules pursue other scientific interests. Biophysical chemistry is a research discipline that, due to its overlap in biology, chemistry, and physics, offers the possibility of providing answers to medical and biochemical questions. Model systems of biological macromolecules are used to study biological processes under controlled conditions and the influence of various chemical-physical parameters. This promotes a comprehensive understanding of the processes, which could contribute approaches to the diagnosis and treatment of diseases.

The 25-hydroxycholesterole, which is formed in the human body as well as in fish during infection with, for example, SARS-CoV-2, has an influence on the condensation behavior of heterogeneous membrane systems. By increasing the lateral order of the lipid bilayer and promoting the formation of microdomains, the fusion of viruses at cell membranes could be blocked. The effect increases under the influence of pressure in anionic membrane systems.

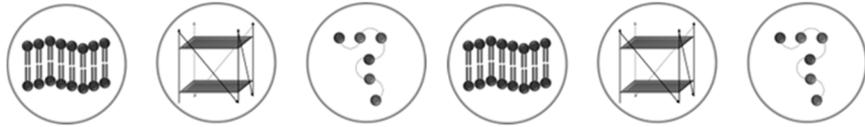
The study of the binding behavior of berberine to the RNA G-quadruplex in the presence of different cations can identify new development approaches for antiviral drugs based on the berberine structure. Two berberine molecules bind to one quadruplex. and upon complex formation, compaction of the G-quadruplexes is detected.

Heterogeneous membrane systems exhibit phase coexistence, which can be understood as compartmentalization of the cell membrane. Proteins and nucleic acids inside the cell may exhibit the property of liquid-liquid phase separation which supports the formation of (membranless) organelles. Based on the studies in this thesis, it can be concluded that the phases of the two systems, cell interior and cell membrane, interact with each other, which could be relevant for biological processes.



---

# 1. Einleitung



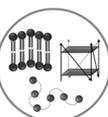
Das größte Habitat der Erde zeichnet sich durch eine Temperatur von -1 bis 4 °C, einem hohen Druck von bis zu 1000 bar, absolute Dunkelheit und geringe Nahrungsquellen aus. Da liegt die Vermutung nahe, dass es sich um einen unbelebten (azoischen) Ort handeln muss. Im Jahr 1860 wurde jedoch das Gegenteil bewiesen: Die Tiefsee ist ein Lebensraum von Organismen.<sup>1,2</sup>

Die Erforschung der Tiefsee erbrachte erste Erkenntnisse über Adaptionsmechanismen von Organismen an extreme Umweltbedingungen sowie die Entdeckung, dass im Umfeld von unterseeischen Vulkanen Grundbausteine des Lebens entstehen. Somit kann die fortführende Tiefseeforschung Beiträge für die fundamentale Frage „Wie ist das Leben entstanden?“ liefern, indem der Einfluss von physikalischen und chemischen Parametern auf Biomoleküle untersucht wird. Schließlich müssen drei Klassen von Biomolekülen zu der Entstehung einer ersten Zelle, LUCA (*Last Universal Common Ancestor*), vorhanden sein: (i) Lipide, (ii) Nukleinsäuren und (iii) Aminosäuren. In den folgenden Abschnitten werden diese Bestandteile und deren Funktionen, sowie ihr Vorkommen in den zellulär komplexeren eukaryotischen Zellen, die sich aus den ersten Zellen weiterentwickelt haben müssen, erläutert.<sup>3-5</sup>

## 1.1. Lipide

Biologische Membranen sind eine der unentbehrlichen Komponenten von allen Zellarten, welche die Grundeinheit aller lebenden Organismen – von Bakterien bis zu den Tieren - bilden. Die eukaryotische Zelle besteht aus einer Plasmamembran, die das Zellinnere von dem extrazellulären Bereich abgrenzt. Neben ihrer Schutzfunktion fungiert sie ebenfalls als Permeabilitätsbarriere, indem sie den Stoffaustausch mit der Zellumgebung kontrolliert.<sup>6-9</sup>

Die Zusammensetzung der Plasmamembran ist an ihre unterschiedlichen Funktionalitäten angepasst. Ihre Bestandteile sind Proteine, Kohlenhydrate, Steroide und Lipide. Letztere machen 40-60% an der Gesamtmasse aus und bilden somit den Hauptbestandteil. Lipide sind amphiphile Moleküle, denn sie bestehen aus einer polaren Kopfgruppe und hydrophoben Kohlenwasserstoffketten. Phospholipide sind die am häufigsten vorkommenden Membranlipide, die aus einem Glycerin- oder SphingosinGrundgerüst mit verschiedenen phosphorylierten Alkoholgruppen, wie zum Beispiel Phosphatidylglycerin (PG) und Phosphatidylcholin (PC), bestehen. Aufgrund dieser Modifikationen können unterschiedliche Kopfgruppen generiert werden (vgl. Abb. 1.1).<sup>10,11</sup>



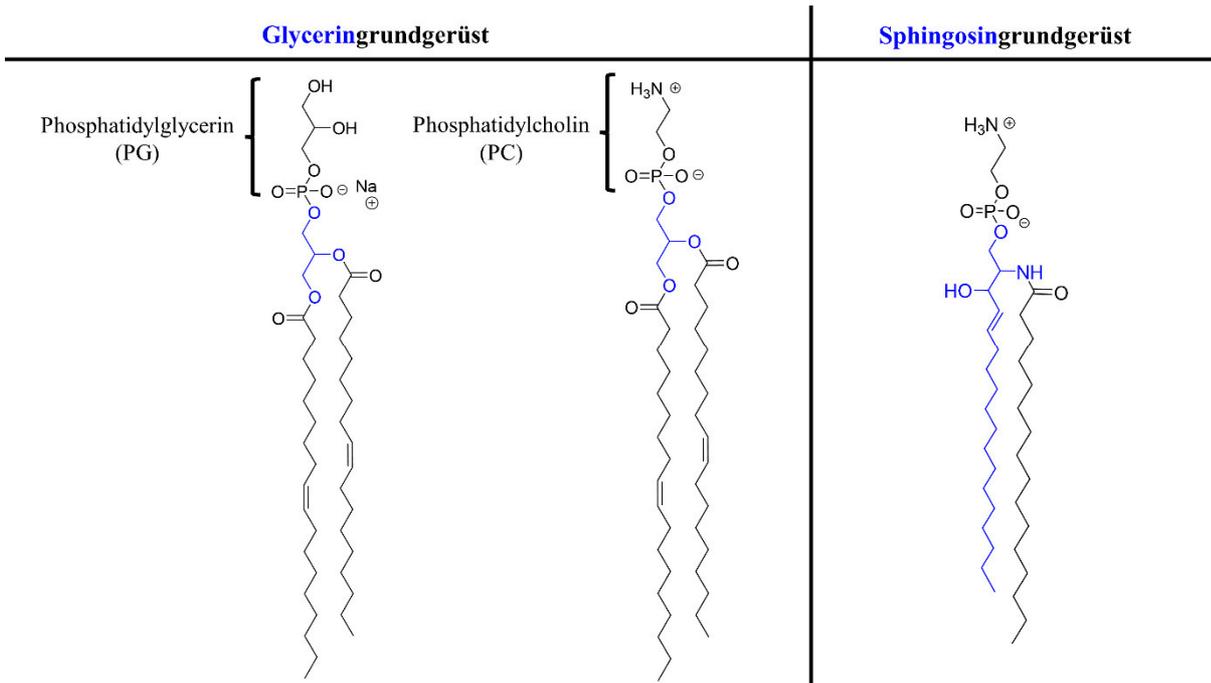
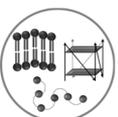


Abb. 1.1: Struktureller Aufbau der Membranlipide unterteilt in Phosphoglyceride und Phosphosphingo-lipide (Grundgerüst in blau). Die Variation der Kopfgruppen, als Beispiele Phosphatidylglycerin (PG) und Phosphatidylcholin (PC) dargestellt, fördert die strukturelle Diversität.

Ein weiterer Grund für die strukturelle Vielfalt der Lipide ist die Variation der Kohlenwasserstoffketten hinsichtlich ihrer Länge und ihrem Sättigungsgrad. Die gesättigten oder einfach wie mehrfach ungesättigten Ketten der Phosphoglyceride bestehen aus 12-24 Kohlenstoffatomen. Die Doppelbindungen liegen in der *cis* Konfiguration vor. Über die Esterbindung an der *sn*-1 oder *sn*-2 Position sind die Fettsäurereste am Glycerinrückgrat verbunden. Bei den Phospholipiden mit dem Sphingosingerüst können die Kohlenwasserstoffketten eine Länge von bis zu 36 Methylengruppen erreichen, welche über die Amidbindung mit dem Gerüst gebunden sind (vgl. Abb. 1.1). Wie zuvor erwähnt, führen die vielen unterschiedlichen Lipidbausteine zu einer Vielfalt von Lipiden, welche die Funktionalität der Membranen prägen, beispielsweise besitzt ein Eukaryot über 1000 unterschiedliche Lipidspezies.<sup>6,8,11-13</sup>

Aufgrund der Amphiphilie bilden Lipide in wässriger Lösung Aggregate, wobei die Kopfgruppe mit dem wässrigen Medium interagiert und der hydrophobe Bereich den Wassermolekülen abgewandt ist. Dieser Zusammenschluss wird von dem hydrophoben Effekt angetrieben. Die Form der Aggregate aus den Lipiden wird durch die Geometrie der Lipide bestimmt. Die Fähigkeit, unterschiedliche Aggregatformen auszubilden, wird Polymorphismus genannt.



Der bestimmende Geometrie-Parameter wird als kritischer Packungsparameter  $CCP$  bezeichnet.

$$CCP = \frac{V}{A \cdot l} \quad (\text{Gl. 1})$$

Der kritische Packungsparameter beschreibt das Verhältnis von dem Volumen der Kohlenwasserstoffketten  $V$  und dem Produkt aus der Kettelänge  $l$  und der Querschnittsfläche der Kopfgruppe  $A$ . Die Fläche der Kopfgruppe ist abhängig von dem pH-Wert, der Hydratation, dem Druck, der Ionenstärke und der Temperatur.<sup>14,15</sup>

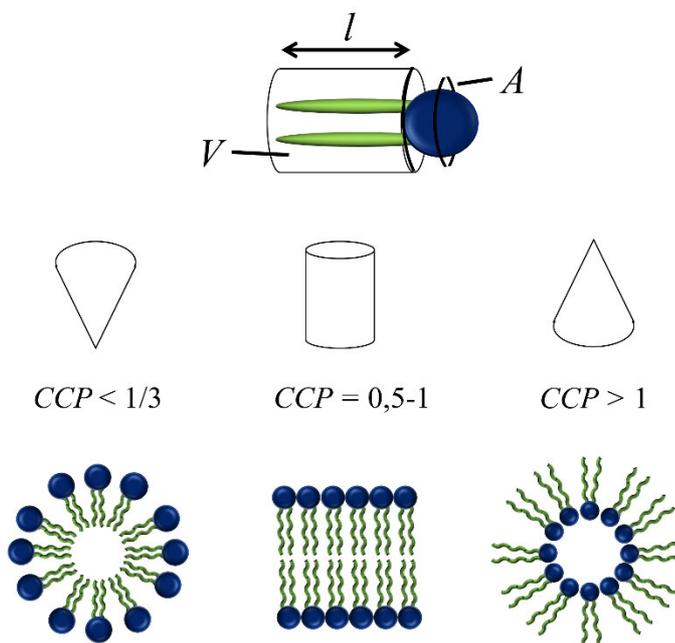
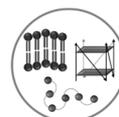


Abb. 1.2: Der kritische Packungsparameter  $CCP = \frac{V}{A \cdot l}$  bestimmt die Form der gebildeten Aggregate aus den Lipiden. Kegelförmige Lipide bilden Mizellen ( $CCP < 1/3$ ), zylinderförmige Lipide bilden planare Doppelschichten ( $CCP = 0,5-1$ ) und kegelförmige Lipide bilden inverse Mizellen ( $CCP > 1$ ) aus. Die Fähigkeit, unterschiedliche Aggregatformen auszubilden, wird Polymorphismus genannt. Aus [6] dargestellt und modifiziert.

Kegelförmige Lipide, die Mizellen ausbilden, sind definiert durch einen kritischen Packungsparameter von kleiner als  $1/3$ . Kegelförmige Lipide haben einen  $CCP$ -Wert über  $1$  und bilden inverse Mizellen aus. Diese Formen kommen in nicht-lamellaren Phasen wie invers hexagonal  $H_{II}$  oder kubischen Phasen  $Q_{II}$  vor. Ein  $CCP$ -Wert von  $0,5 - 1$  beschreibt zylinderförmige Lipide, wie phosphatidylcholinhaltige Lipide, die planare Doppelschichten ausbilden, welche die relevante Geometrie zur Ausbildung von Zellmembranen ist (vgl. Abb. 1.2). Die Lipiddoppelschicht hat eine Dicke von  $4-5$  nm und innerhalb der zweidimensionalen Membran herrscht eine hohe Fluidität, welche die Voraussetzung für die optimale Funktion biologischer



## 1.1 Lipide

---

Membranen ist. Die Diffusion in lateraler Richtung beträgt ca.  $10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ . Eine transversale Diffusion (*flip-flop*) innerhalb der Doppelschicht ist langsamer und unwahrscheinlicher.<sup>6,7,11,16</sup>

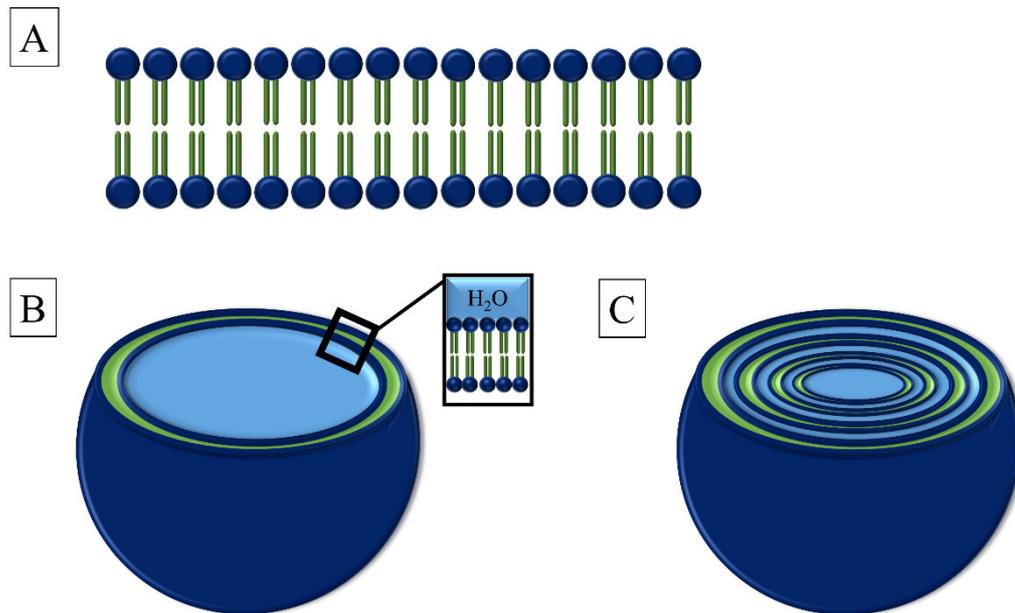
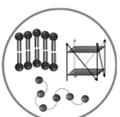


Abb. 1.3: Schematische Übersicht über Makrostrukturen der Lipidsysteme. A) Lipiddoppelschicht, B) unilamellare Vesikel, die nach ihrer Größe klassifiziert werden können und C) multilamellare Vesikel, die aus vielen lamellaren Lipidschichten bestehen. Aus <sup>[6]</sup> dargestellt und modifiziert.

Der Wassergehalt der Membranen entscheidet dabei über die übergeordneten Makrostrukturen. Übereinander gelagerte parallele Doppelschichten bilden sich bei einem 30 w% Wassergehalt aus (vgl. Abb. 1.3; A), bei einem höheren Wassergehalt bilden sich hingegen multilamellare Vesikel (MLV) (vgl. Abb. 1.3; C). Bei einer sehr verdünnten Lösung sind hingegen unilamellare Vesikel (ULV) stabil (vgl. Abb. 1.3; B). Je nach verwendeter Methode werden verschiedene Membran- und Vesikelvariationen angewendet. In der Analytik werden verschiedene Vesikel eingesetzt: in der Rasterkraftmikroskopie (AFM) werden planare Doppelschichten verwendet, riesige unilamellare Vesikel (*giant unilamellar vesicle*, GUV (Durchmesser  $> 1 \mu\text{m}$ )) werden in der Fluoreszenzmikroskopie benötigt, und multilamellare Vesikel kommen bei der RÖNTGENkleinwinkelstreuung (SAXS) zum Einsatz.<sup>17,18</sup>



Die Lipidmembranen durchlaufen verschiedene lamellare Phasen, welche abhängig von der Temperatur und dem Druck sind (vgl. Abb. 1.4).

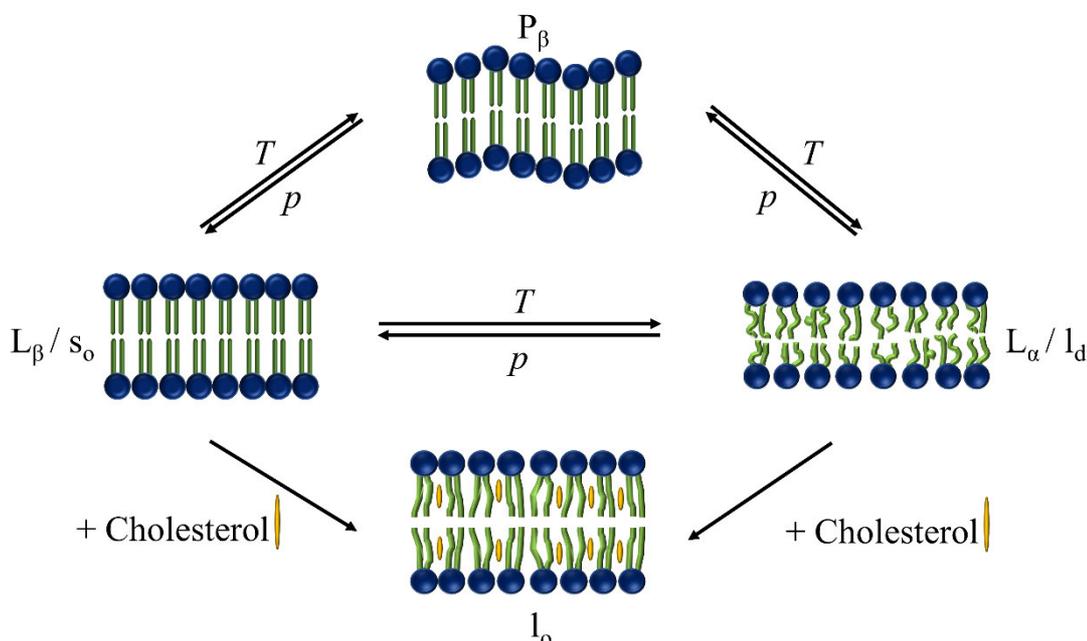
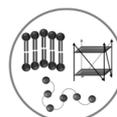


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der temperatur- und druckabhängigen lamellaren Lipidphasen in wässrigem Medium. Bei niedriger Temperatur liegt die Doppelschicht in der Gelphase  $L_{\beta}$ , auch  $s_o$  (*solid ordered*) genannt, vor. Bei einer Erhöhung der Temperatur gelangt die Doppelschicht in die Phase  $P_{\beta}$ , eine periodisch gewellte Gelphase. Eine weitere Temperaturerhöhung führt beim Hauptübergang in die fluide Phase  $L_{\alpha}$  Phase, auch  $l_d$  (*liquid disordered*) genannt. Der Zusatz von Cholesterin führt zu einer Verbreiterung des Hauptphasenübergangs; es erfolgt die Ausbildung einer weiteren Phase  $l_o$  (*liquid ordered*) bei hohen Cholesterolkonzentrationen. Aus <sup>[6]</sup>dargestellt und modifiziert.

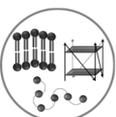
Die Phasenzustände besitzen charakteristische Eigenschaften. Bei niedriger physiologischer Temperatur liegen sie in der Gelphase  $L_{\beta}$ , auch  $s_o$  (*solid ordered*) genannt, vor. Die Alkylketten befinden sich in der gestreckten *all-trans* Konformation. Je nach Temperatur und Hydrationsgrad können sie in einem Winkel von bis zu  $30^{\circ}$  gegen die Membrannormale geneigt sein, wobei die Neigung auf den jeweiligen Flächenbedarf der Kopfgruppen sowie der gesättigten Alkylketten zurückzuführen ist. Die geneigte Phase wird mit dem Symbol  $L_{\beta}$  gekennzeichnet. Bei der Erhöhung der Temperatur findet der Vorübergang von der  $L_{\beta}$  Phase zu der Phase  $P_{\beta}$  statt. Diese Gelphase ist durch ihre periodisch gewellte Überstruktur und höhere Schichtdicke charakterisiert. Eine Steigerung der Temperatur führt zu dem Hauptübergang der Phase  $P_{\beta}$  zu der  $L_{\alpha}$  Phase, bei einem zusätzlichen geringen Gehalt von Cholesterin auch  $l_d$  (*liquid disordered*) genannt. Die fluide Phase weist eine hohe Fluidität und hohe Diffusionsgeschwindigkeiten auf und die Alkylketten liegen oft in der *gauche*-Konformation vor. Aufgrund der



Konformationsfreiheit und der geringen Packungsdichte ist die Hydratation der Kopfgruppen höher als in den Gelphasen (vgl. Abb. 1.4).

Die Zusammensetzung der Lipide beeinflusst die Übergangstemperaturen, da kürzere oder ungesättigte Alkylketten zu einer Abnahme der Gel-Fluid Phasenübergangstemperatur führen. Die intermolekularen Wechselwirkungen wie zum Beispiel die VAN-DER-WAALS Wechselwirkungen sind abgeschwächt, wodurch die fluide Phase bei hohen Drücken und niedrigen Temperaturen instabiler ist. Bei konstanter Temperatur und Druckerhöhung verhalten sich die Phasenübergänge gegensätzlich zu den thermotropen Phasenübergängen. Nach dem Prinzip von LE CHATELIER reagiert ein System im Gleichgewicht unter Druckeinfluss mit einer Volumenverringerung. Die Gelphase wird daher bevorzugt, da sie ein geringeres Volumen besitzt. Das spezifische Volumen der  $P_{\beta}$  Phase ist um 3,5% geringer als das der  $L_{\alpha}$  Phase.<sup>6,19-21</sup>

Die Konzentration des Steroids Cholesterol in der natürlichen Plasmamembran beträgt ungefähr 10-15%, wobei sie zellspezifisch variieren kann. Die intermolekulare Wechselwirkung zwischen Cholesterol und den Kohlenwasserstoffketten der benachbarten Lipide induziert eine *all-trans* Konformation der Ketten. Die Erhöhung der Sterolkonzentration führt zu einer Verbreiterung des Hauptphasenübergangs; es erfolgt die Ausbildung einer weiteren Phase  $l_o$  (*liquid ordered*) (vgl. Abb. 1.4). Bei einer mittleren Cholesterolkonzentration bilden sich sowohl  $l_d$  als auch  $l_o$  Domänen aus, wodurch eine Phasenkoexistenz vorherrscht. Die Rotation der Alkylketten sowie die Diffusionsgeschwindigkeit in der  $l_o$  Phase ähnelt der in der  $l_d$  Phase, jedoch liegen die Kohlenwasserstoffketten in der *all-trans* statt *gauche* Konformation vor. Cholesterol besitzt die Eigenschaft die Ordnung in einer fluiden Phase zu erhöhen, d.h. der Ordnungsparameter der Alkylketten nimmt zu, wobei die Fluidität und Diffusionsrate in der Membran sich nicht drastisch ändert.<sup>22-24</sup>



## 1.2. Nukleinsäuren

Zu der Bildung und der Erhaltung von Organismen müssen genetische Informationen gespeichert und übertragen werden. Die Funktion wird bei jeder Zelle, ob prokaryotisch oder eukaryotisch, von den Desoxyribonukleinsäure- (*deoxy-ribonucleic acid*, DNA) bzw. Ribonukleinsäure- (*ribonucleic acid*, RNA) Molekülen übernommen. Diese beiden Nukleinsäuren bestehen aus mehreren Nucleotiden. Jedes Nucleotid besteht wiederum aus drei Bausteinen: einem Phosphatrest der Phosphorsäure, einem Fünffachzucker und einer von vier Basen. Der Fünffachzucker der DNA ist 2'-Desoxyribose, der der RNA Ribose. Die Basen der DNA sind die Purine Adenin (A) und Guanin (G), sowie die Pyrimidine Thymin (T) und Cytosin (C). In der RNA wird das Thymin durch das Uracil (U) ersetzt. Zu der Benennung werden die Kohlenstoffatome des Zuckers von 1' bis 5' durchnummeriert.<sup>6,25,26</sup>

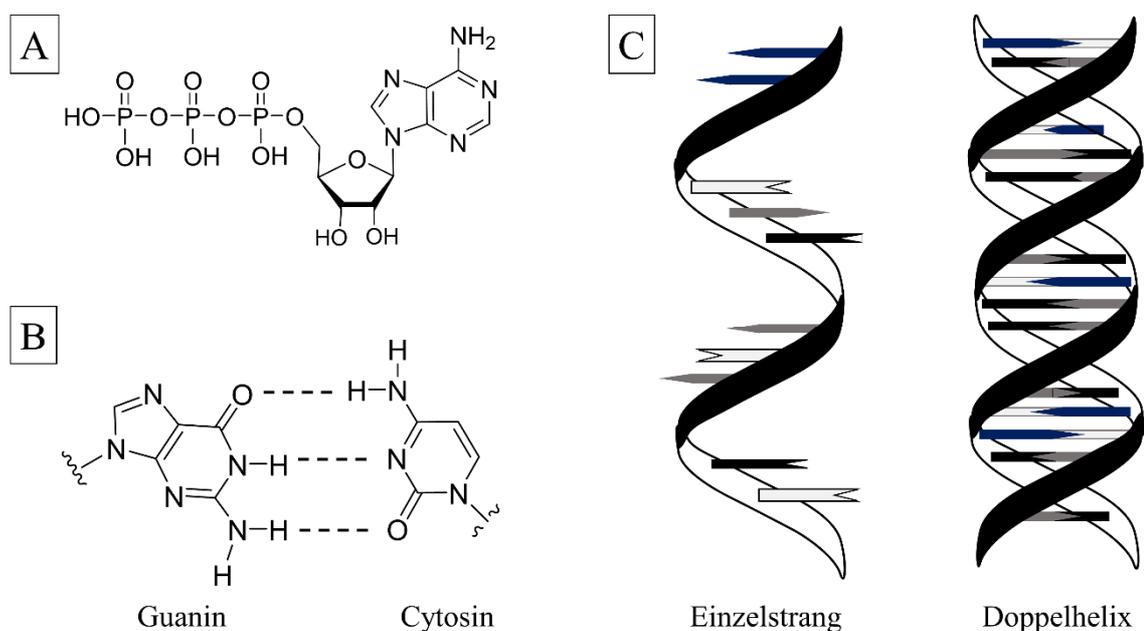
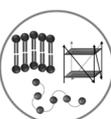


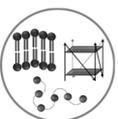
Abb. 1.5: A) Chemische Struktur von dem Nucleotid Adenosin-5'-triphosphat, ATP, mit den drei Bausteinen: einem Phosphatrest der Phosphorsäure, einem Fünffachzucker (2'-Desoxyribose) und einer von vier Basen (Adenin). B) Das Basenpaar Guanin und Cytosin, die durch Wasserstoffbrückenbindungen miteinander wechselwirken. C) Die schematische Darstellung eines Einzelstrangs und einer Doppelhelix, welche durch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen Adenin (A)  und Thymin (T)/Uracil (U)  und den Basen Guanin (G)  und Cytosin (C)  stabilisiert wird. Aus <sup>[6]</sup> dargestellt und modifiziert.

Ein Beispiel für ein Nucleotid ist Adenosin-5'-triphosphat, kurz ATP (vgl. Abb. 1.5, A), welches nicht nur ein Baustein der DNA und RNA ist, sondern auch Aufgaben im Energiestoffwechsel und in der Signaltransduktion übernimmt. Die Verknüpfung der Nucleotide erfolgt



über die 3'-OH-Gruppe eines Nucleotids mit dem Phosphatrest am 5'-C-Atom eines anderen Nucleotids, wodurch sich eine Nukleinsäure ausbildet. Die eigentlichen genetischen Informationsträger sind die Basen der DNA und RNA. Ihre Abfolge oder Sequenz beinhaltet die Erbinformation. Die Sequenz wird mit dem 5'-Phosphat voran (5'-Ende) in Richtung der 3'-OH-Gruppe (3'-Ende) angegeben, zum Beispiel 5'-GGUGGCAAUGGCGG-3'.<sup>26,27</sup>

Die beiden Nukleinsäuren unterscheiden sich außerdem in ihrer Raumstruktur. Die DNA besteht aus zwei Einzelsträngen, die sich zu einer Doppelhelix winden (vgl. Abb. 1.5, C), wobei die Basen nach innen gekehrt sind und die Phosphorsäure- und Zuckerreste nach außen ragen. Die Stabilisierung der Helix erfolgt neben  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen durch Wasserstoffbrückenbindungen (vgl. Abb. 1.5, B), die sich jeweils zwischen den Basen Adenin und Thymin und den Basen Guanin und Cytosin ausbilden. Die Basenpaare liegen fast senkrecht zu der Helixachse, wodurch es zu einer stabilisierenden Stapelwechselwirkung der übereinanderliegenden Basen kommt. Die RNA besteht hingegen hauptsächlich aus einem Einzelstrang (vgl. Abb. 1.5, C), wobei in einigen Viren auch doppelsträngige RNA vorkommt. Es sind verschiedene Typen von RNA-Molekülen bekannt, die anhand ihrer Funktionen gekennzeichnet werden, wie zum Beispiel die Messenger-RNA (mRNA), die verantwortlich für die Codierung von Information für die Proteinsynthese ist, oder die Mikro-RNA (miRNA), die zuständig für die Regulation der Translation ist. Neben der doppelhelikalen oder Einzelstrang-Struktur kommen in der Natur auch andere Strukturen vor, wie beispielsweise die G-Quadruplexe<sup>25,26,28</sup>, welche im Kapitel 4.1 beschrieben werden.



## 1.3. Proteine

Proteine kommen in großer Vielfalt und Menge als Biomoleküle vor – in unsere Zellen, unserer Nahrung und in Medikamenten. Sie sind an allen Vorgängen der Zelle mit unterschiedlichen Funktionen beteiligt: Strukturproteine, Katalysatoren, Rezeptoren, Signalmoleküle, Hormone, Antikörper und Transportmoleküle. Die unterschiedliche Funktion ist abhängig von ihrer intra- beziehungsweise extrazellulären Lokalisation, sowie von Wechselwirkungen mit anderen Molekülen oder Komplexen.<sup>6,29,30</sup>

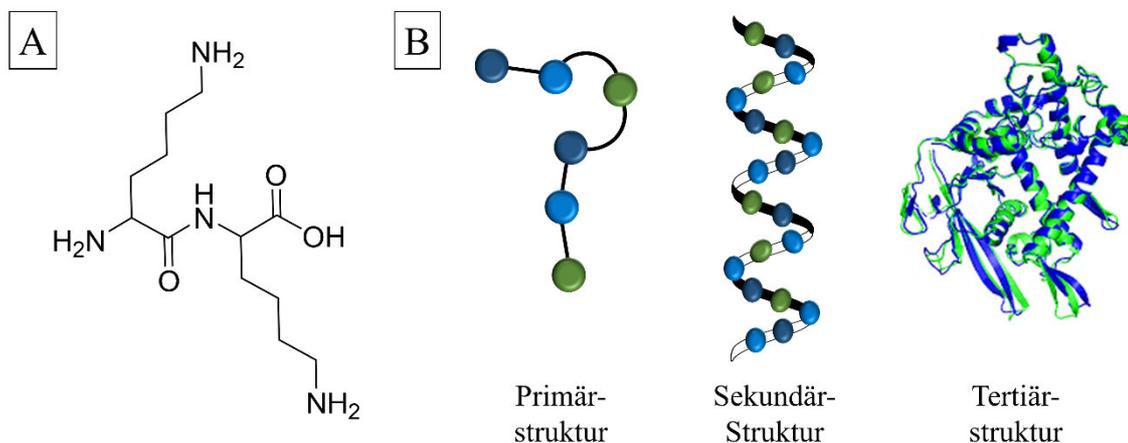
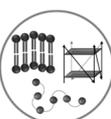
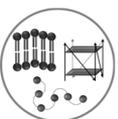


Abb. 1.6: A) Dipeptid aus zwei Aminosäuren, in diesem Beispiel zwei Lysinen. B) Übersicht der Proteinstrukturen; die Reihenfolge der Aminosäuren (Darstellung als Kreise) definiert die Primärstruktur, räumliche Strukturen eines lokalen Bereichs im Protein sind Sekundärstrukturen, in diesem Beispiel eine  $\alpha$ -Helix und die Zusammenlagerung mehrerer Sekundärstrukturen bildet die Tertiärstruktur<sup>31</sup> der Proteine.

Die Proteine bestehen aus Aminosäuren, die durch eine Peptidbindung zu einer linearen Kette verknüpft sind. Die Verknüpfung findet zwischen der  $\alpha$ -Carboxylgruppe einer Aminosäure und der  $\alpha$ -Aminogruppe einer zweiten Aminosäure statt. Es gibt 20 essenzielle Aminosäuren, die durch die unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten die Vielfalt der Proteine erklärt. Wenn eine Kette aus zwei oder wenigen Aminosäuren besteht, wird dieses Peptid zum Beispiel als Dipeptid, Tripeptid, Tetrapeptid oder im Allgemeinen als Oligopeptid bezeichnet. Eine Sequenz von bis zu 50 Aminosäuren zählt dann zu den Polypeptiden. Ein Protein besteht aus 50 bis 2000 Aminosäuren, wobei die Reihenfolge der Aminosäuren die Primärstruktur der Proteine definiert. Die Faltung der Polypeptidkette aufgrund der chemischen Bindung und den Wechselwirkungen der Aminosäuren bestimmt die native, spezifische, dreidimensionale Struktur von Proteinen. Diese Struktur kann in die Sekundär- und Tertiärstruktur unterteilt werden. Dabei wird die Zusammenlagerung mehrerer Sekundärstrukturen als Tertiärstrukturen bezeichnet. Je



nach der Bindungsart (Sulfidbrücken, Wasserstoffbrücken, elektrostatische Wechselwirkungen, VAN-DER-WAALS-Wechselwirkungen) zwischen den Aminosäuren können sich verschiedene Sekundärstrukturen wie zum Beispiel,  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblätter, Schleifen oder ungeordnete Strukturen, ausbilden. Die dreidimensionale Proteinstruktur definiert dabei die Funktionalität. Somit würde eine Entfaltung der Polypeptidkette, auch als Denaturierung bezeichnet, zu dem Verlust der Funktion führen. Jedoch weisen auch Peptide, wie beispielsweise das C-Peptid, ein Molekül aus 31 Aminosäuren, Funktionen auf. Das C-Peptid verbindet die beiden Polypeptidketten, A-Kette und B-Kette, von Insulin.<sup>32,33</sup>



---

## 2. Zielsetzung



---

Neben der Frage nach dem Leben unter extremen Bedingungen verfolgen physikalisch-chemische Messungen an Biomolekülen weitere wissenschaftliche Interessen. Die biophysikalische Chemie ist eine Forschungsdisziplin, die aufgrund ihrer Überschneidung der Biologie, Chemie und Physik die Möglichkeit bietet, Antworten auf medizinische und biochemische Fragestellungen zu liefern. Es werden Modellsysteme, die sich in ihrer Komplexität unterscheiden, mit einzelnen Komponenten einer Zelle verwendet, um biologische Prozesse unter kontrollierten Bedingungen und dem Einfluss verschiedener chemisch-physikalischer Parameter zu untersuchen. Dadurch können Gesetzmäßigkeiten gefunden werden, wodurch es möglich ist biologische Vorgänge besser zu verstehen. Die daraus resultierenden Ansätze könnten zur Diagnose und Behandlung von Krankheiten beitragen.<sup>34</sup> Es werden Ansätze, welche dem Menschen zu mehr Lebensqualität verhelfen, in der Medikamentenentwicklung für bis jetzt unheilbare Krankheiten, aber auch für neu auftretende Krankheiten, wie COVID im Jahre 2019, benötigt, wofür das Verständnis der Wechselwirkungen und Verhalten der verschiedenen biomolekularen Systeme und deren Komponenten essenziell sind.

In dem ersten Projekt wird der Einfluss von 25-Hydroxycholesterol auf Lipide, die Hauptkomponenten der Zellmembran, untersucht. Das 25-Hydroxycholesterol soll antivirale Eigenschaften gegenüber verschiedenen Krankheiten besitzen, aber auch Zellwände verdicken. Durch die Untersuchung soll ein besseres Verständnis des Verhaltens der Zellmembranen während einer Immunreaktion erlangt werden.

Für die Ansätze zu der Entwicklung von oralen Medikamenten gegen die Krankheit COVID-19 werden im zweiten Projekt die Wechselwirkungen zwischen Berberin, als mögliches Medikament, und dem G-Quadruplex der RG-1 Sequenz der viralen RNA studiert.

Die Interaktion zwischen der Zellmembran und dem Zellinneren ist für biologische Prozesse besonders relevant. Die Zellmembran bildet aufgrund ihrer heterogenen Zusammensetzung Domänen in der Zellmembran aus. Es bildet also ein phasensepariertes System aus. Das Zellinnere besteht aus Proteine und Nukleinsäuren, die oftmals in der Lage sind, Flüssig-Flüssig-Phasentrennung auszubilden, wodurch im Zellinneren ebenfalls ein Mehrphasensystem entsteht. Die Studie des Verhalten eines Phasenkoexistenzsystems in Abhängigkeit des anderen Mehrphasensystems kann das Verständnis der biologischen Abläufe in und an der Zelle erweitern.

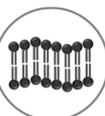
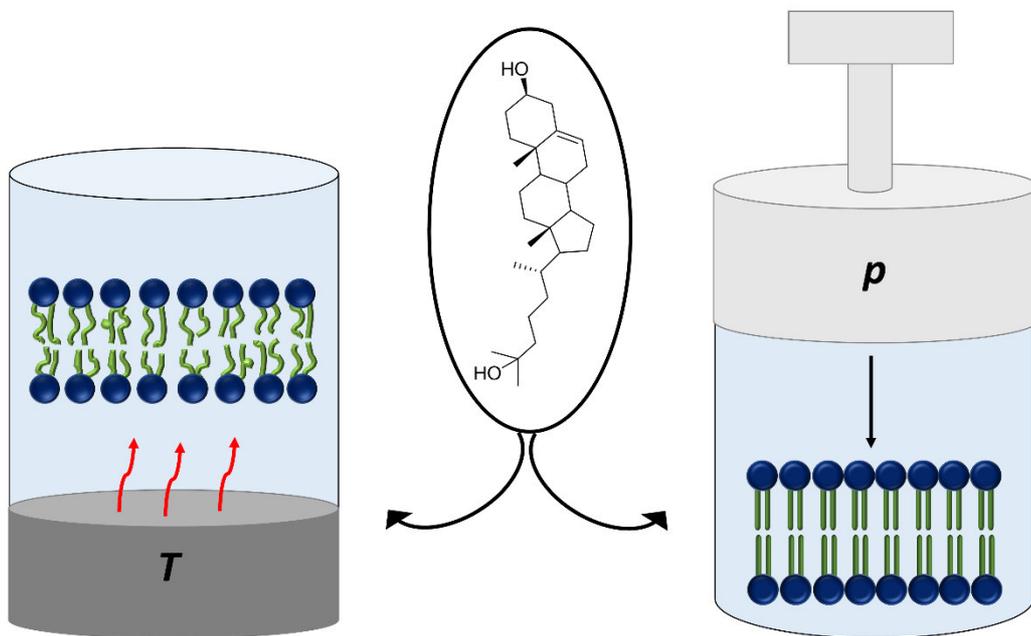


---

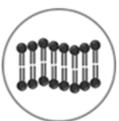
### 3. Kapitel: Lipide und 25-Hydroxycholesterol

---

## Einfluss des Immunregulators 25-Hydroxycholesterol auf das thermotrope und barotrope Phasenverhalten und die Struktur von Modellbiomembranen



---



## 3.1. Einleitung

Cholesterol ist ein wichtiger Baustein für die Bildung von Domänen, den so genannten *rafts*, in den Lipidmembranen. Die Domänenbildung ist essenziell für biologische Funktionen, da an den *liquid ordered* Bereichen Proteine andocken können, um mit der Zellmembran in Wechselwirkung zu treten.<sup>24,35,36</sup> Eines der Oxidationsprodukte aus Cholesterol sind Oxysterole (vgl. Abb. 3.1), die sich durch Ketone, Epoxy- und Hydroxygruppen am Ring oder durch Hydroxygruppen an der Seitenkette von dem Edukt unterscheiden.<sup>37-40</sup> Diese Oxidationsprodukte entstehen sowohl endogen durch enzymatische Oxidation und Autooxidation, als auch exogen durch die Nahrungsaufnahme.<sup>41-43</sup>

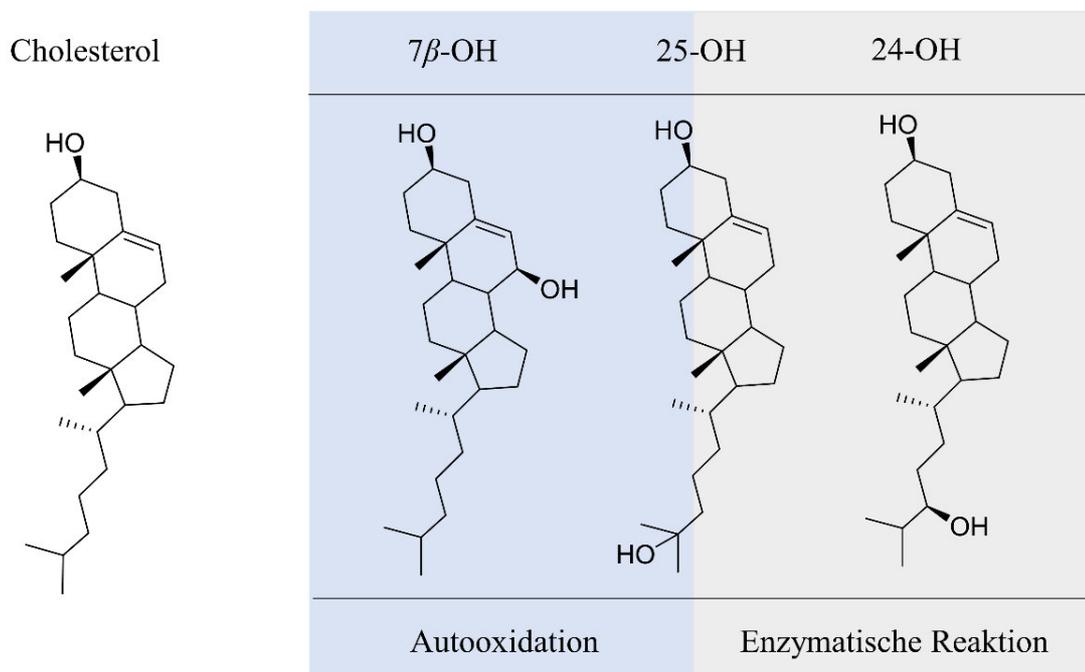
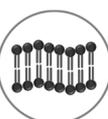


Abb. 3.1: Die chemische Strukturen der Oxidationsprodukte von Cholesterol:  $7\beta$ -Hydroxycholesterol ( $7\beta$ -OH), 25-Hydroxycholesterol (25-OH) und 24S-Hydroxycholesterol (24-OH). Die Oxidationsprodukte entstehen sowohl durch enzymatischen Reaktionen, wie z.B. 24-OH als auch durch Autooxidation, wie z.B. ( $7\beta$ -OH). Das 25-OH kann aus beiden Reaktionswegen hervorgehen.

In menschlichen Geweben ist die Konzentration von Oxysterol um ein Tausendstel geringer als von Cholesterol.<sup>44,45</sup> Von dort wandern die Sterole, wie zum Beispiel  $7\alpha$ -Hydroxycholesterol ( $7\alpha$ -OH), durch Zellmembranen weiter zu der Leber, wo sie zu der Synthese von Gallensäure beitragen können. Das lediglich im Gehirn vorkommende Oxysterol 24S-Hydroxycholesterol (24-OH) (vgl. Abb. 3.1), gebildet durch Cytochrom P-450, kann durch die Blut-Hirn-Schranke in die Blutbahn gelangen.<sup>46,47</sup> Das 24S-Hydroxycholesterol dient ebenfalls als einer der



### 3.1. Einleitung

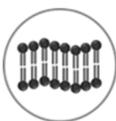
---

Liganden der Kernrezeptoren LXR $\alpha$  und - $\beta$ , die den Stoffwechsel von Lipiden wie Cholesterol regulieren.<sup>48,49</sup>

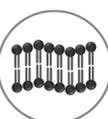
Diese bioaktiven Moleküle stehen außerdem im Verdacht bei neurodegenerativen und kardiovaskulären Krankheiten, wie Alzheimer und Arteriosklerose, eine Rolle zu spielen, da der Konzentrationsgehalt der jeweiligen Oxysterole sich zwischen den erkrankten und gesunden Probanden unterscheidet.<sup>45,46,50,51</sup> *In vitro* Experimente weisen darauf hin, dass Oxysterole Gewebeschädigungen und Entzündungen aufgrund ihrer Zytotoxizität verursachen.<sup>52,53</sup> Die höchste zytotoxische Wirkung besitzen Oxysterole, die aus nicht enzymatischen Reaktionen hervorgehen, wie 7 $\beta$ -Hydroxycholesterol (7 $\beta$ -OH) (vgl. Abb. 3.1). Dieses Oxysterol lässt sich neben anderen 7-Oxysterolen in cholesterolreicher Nahrung, wie Eiern, Milch und Fisch finden, da aufgrund von Verarbeitungs- und Lagerungsverhältnissen Cholesterol autooxidiert wird.<sup>41,42,54</sup> Bisher bekannte *in vivo* Studien zeigen im Plasma keine Oxysterol Konzentration mit zytotoxischer Wirkung. Daher ist der direkte Zusammenhang zwischen Oxysterolen und Krankheiten, wie Arteriosklerose, bisher ungeklärt. Jedoch könnten Oxysterole lokale Effekte auf die Arterienwände haben und somit zu der Bildung von Läsionen beitragen.<sup>43,48,55</sup>

Das Oxidationsprodukt 25-Hydroxycholesterol (25-OH) (vgl. Abb. 3.1) kann sowohl aus der enzymatischen als auch nicht-enzymatischen Reaktion entstehen. Bei einer bakteriellen oder viralen Infektion produziert das Enzym 25-Hydroxylase als Immunreaktion in Makrophagen 25-Hydroxysterol, welches zusätzlich zu der Position 3 auch an der Position 25, am Ende der Isooktylkette, eine Hydroxygruppe besitzt.<sup>38,56,57</sup> Die antivirale Aktivität wurde bei einer Infektion durch Ebola, HIV, Hepatitis C, Zika und ebenfalls durch SARS-CoV-2, welches im Jahr 2019 eine Pandemie ausgelöst hat, festgestellt.<sup>58-62</sup> Da Oxysterole amphiphile Eigenschaften besitzen, können sie sich in Zellmembranen einbauen. Dadurch können die Fluidität, Permeabilität, Phasenübergänge und Phasenkoexistenz der Membranen verändert werden, was eine gezielten Modifizierung der Interaktion zwischen den Membrankomponenten hervorrufen kann.<sup>63-66</sup> Auf dieser Eigenschaft könnte die antivirale Eigenschaft von 25-Hydroxycholesterol beruhen, da sie die Fusion zwischen Viren und Zellen blockieren und somit die virale Verbreitung stören könnte.<sup>64,66,67</sup> Diese Immunreaktion auf Basis von 25-Hydroxycholesterol wurde ebenfalls auch in Fischen beobachtet.<sup>68</sup> Um ein besseres Verständnis für diese Forschung zu bekommen, wurde der Einfluss vom 25-Hydroxycholesterol auf Lipidvesikeln ebenfalls in Abhängigkeit des Druckes untersucht.

Das Oxysterol 25-Hydroxycholesterol besitzt, wie angeführt, antivirale Eigenschaften, die zu der Bekämpfung von Krankheiten wie beispielsweise COVID genutzt werden könnte. In der bisherigen Literatur wurde experimentell der Einfluss von Oxysterolen auf Lipidmonolayer



beschrieben.<sup>66,67</sup> Außerdem wurden Computersimulationen zu der Identifizierung der Wechselwirkungen zwischen Modellbiomembranen und 25-Hydroxycholesterol durchgeführt. In diesem Teil der Arbeit wird der Effekt von 25-Hydroxycholesterol auf das thermotrope und barotrope Phasenverhalten von Modellbiomembranen, die sich der Komplexität und Form einer Biomembran nähern, experimentell untersucht, um einen weiteren Einblick in die Wechselwirkung des Immunregulators 25-Hydroxycholesterol auf Lipiddoppelmembran von eukaryotischen Zellen zu erhalten.



## 3.2. Material und Methoden

---

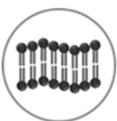
### 3.2. Material und Methoden

#### 3.2.1. Material

Für die Untersuchungen wurde ein Einkomponentensystem aus 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DMPC), sowie ein Dreikomponentensystem aus 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC), 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC) und Cholesterol im Verhältnis von 1:2:1 und ein Fünfkomponentensystem aus DPPC, DOPC, Cholesterol, 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (DOPG) und 1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*glycerol) (DPPG) im Verhältnis von 45:20:25:5:5 verwendet. Zu den jeweiligen Lipidsystemen wurde 25-Hydroxycholesterol ( $X_{25-OH} = 0,1$  und  $0,3$ ) hinzugegeben. Die Lipide sowie das 25-Hydroxycholesterol wurden von Avanti Polar Lipids [Alabaster; USA] bezogen.

Die Systeme wurden als multilamellare Vesikel für die Fluoreszenzspektroskopie (FS) und RÖNTGENkleinwinkelstreuung (SAXS) sowie als riesige unilamellare Vesikel für die Fluoreszenzmikroskopie (FM) eingesetzt. Zu den Proben für die Messungen am Fluoreszenz-Spektrometer wurde zusätzlich zu den  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  Gesamtlipidlösungen  $4,43 \text{ }\mu\text{L}$  Laurdanlösung ( $c = 1 \text{ mM}$ , in Dimethyltryptamin gelöst) [Sigma Aldrich, St.Louis, USA] hinzugefügt. Für die Herstellung der multilamellaren Vesikel wurden die benötigten Volumina aus den jeweiligen  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  Stammlösungen, die aus dem Lipid/Sterol in Chloroform [Merck, Darmstadt, DE] gelöst bestand, entnommen. Nach der Entnahme wurde das Chloroform mit einem Gasstrom, bestehend aus Druckluft, verdampft und der entstandene Lipidfilm in einem Lyophilisator über Nacht getrocknet. Danach wurden zu den Lipidfilmen ein  $10 \text{ mM}$  Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)-Puffer [Sigma-Aldrich, Steinheim, DE] mit einem pH-Wert von  $7,4$  hinzugegeben (FS:  $500 \text{ }\mu\text{L}$  und SAXS:  $50 \text{ }\mu\text{L}$ ). Nach dem Ablösen des Lipidfilms von der Gefäßwand wurden die Systeme für  $15$  Minuten bei  $65 \text{ }^\circ\text{C} - 70 \text{ }^\circ\text{C}$  im Ultraschallbad gelöst. Im Anschluss wurde fünfmal der Tau- und Einfrierzyklus durchgeführt. Dieser bestand aus dem Einfrieren der Proben in flüssigem Stickstoff und dem Wiederauftauen im  $65 \text{ }^\circ\text{C} - 70 \text{ }^\circ\text{C}$  heißen Wasserbad.

Für die Herstellung von riesigen unilamellaren Vesikeln des Dreikomponentensystems sowie des Fünfkomponentensystems wurde eine  $100 \text{ }\mu\text{L}$  Lösung mit einer Gesamtlipidkonzentration von  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  angesetzt. Zu diesen Lösungen wurde  $0,1 \text{ mol}\%$  *N*-(Lissamin Rhodamin B sulfonyl)-1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (*N*-Rhodamine(Rh)-DHPE) [Invitrogen, California, USA] hinzugegeben. Die Vesikel wurden nach der

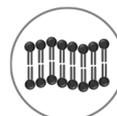


PVA(Polyvinylalkohol)-Methode<sup>17,69</sup> hergestellt. Dafür wurden 150  $\mu\text{L}$  einer 5 w% PVA-Lösung [Merck, Darmstadt, DE] auf einen runden Objektträger mittels einem Spincoater bei  $1800 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$  für 60 s verteilt. Danach wurden die Objektträger bei  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  für 45 min getrocknet. Nach der Trocknung wurden 20  $\mu\text{L}$  der Lipidlösung mit  $800 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$  für 60 s auf die PVA-Schicht gespreitet. Eine zweistündige Gefriertrocknung unter Vakuum soll eine komplette Lösungsmittelentfernung garantieren. Der letzte Schritt beim Herstellungsprozess erfolgte durch die Zugabe eines HEPES-Puffers ( $\text{pH} = 7,4$ ) und Erwärmung für 45 Minuten bei einer Temperatur von  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  für das Dreikomponentensystem beziehungsweise  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  für das Fünfkomponentensystem.

### 3.2.2. Fluoreszenzspektroskopie (FS)

Die Messungen erfolgten am Multifrequenz Phasen- und Modulationsfluorometer Typ K2 [ISS, IL, USA] mit dem Programm *Vinci 2*. Als Strahlungsquelle diente eine Xenon-Kurzbogenlampe, die eine hohe Strahlungsintensität über größere Wellenlängenbereiche besitzt. Für die temperaturabhängigen Messungen wurden QS (Quarzglas-SUPRASIL) Küvetten mit einer Schichtdicke von 3 mm verwendet. Die druckabhängigen Messungen wurden mit einer zylindrischen Hochdruckzelle mit vier Öffnungen [ISS, IL, USA] durchgeführt. Drei Öffnungen befanden sich in äquatorialer Position. Sie wurden jeweils mit einer Schraube, in deren Mitte sich ein Quarzglasfenster befindet, verschlossen. Die Fenster dienten zu einer Durchlassung des eingestrahlten Lichts in den Probenraum und zu einer Weiterleitung des Fluoreszenzlichts zu dem Detektor. Durch die vierte, obere Öffnung wurde die Probenküvette eingeführt. Sie bestand aus einem synthetischen Quarzglasprisma und wurde mit DuraSeal™-Laborstretchfolie und einem Gummiring verschlossen. Danach wurde die Hochdruckzelle mit dem Druckmedium Wasser befüllt. Der Druck wurde mithilfe einer Handspindelpresse aufgebaut und die Temperatur mit einem externen Wasserbad eingestellt sowie mit einem digitalen Thermometer vermessen.

Die Vermessung des Einkomponentensystems erfolgte temperaturabhängig in einem Temperaturbereich von  $5\text{-}85 \text{ }^\circ\text{C}$  und druckabhängig in einem Druckbereich von  $1\text{-}2000 \text{ bar}$  bei  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Das Dreikomponentensystem wurde in einem Temperaturbereich von  $5\text{-}70 \text{ }^\circ\text{C}$  und in einem Druckbereich von  $1\text{-}2000 \text{ bar}$  bei  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  untersucht.



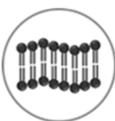
### 3.2.3. RÖNTGENkleinwinkelstreuung (SAXS)

Die Untersuchung der lamellaren Schichtdicke  $d$  wurde temperaturabhängig an der RÖNTGENkleinwinkelapparatur Anton Paar SAXSess mc<sup>2</sup> [Anton Paar, Graz, AUT] mit einer Kupfer-Röntgenröhre vorgenommen. Das Probenvolumen von 20  $\mu\text{L}$  wurde in eine Quarzglaskapillare gefüllt und in den temperierbaren Probenhalter des Geräts eingeführt. Dort wurde die Probe unter Vakuum mit RÖNTGENstrahlung bestrahlt. Vor jeder Messreihe wurde der zugehörige Puffer als Blindprobe vermessen. Die jeweiligen Systeme mit DMPC wurden im Temperaturbereich von 5-50 °C in 5 °C Schritten bestimmt. Bei dem Dreikomponenten Membransystem wurden die Messungen von 10-70 °C in 5 °C Schritten vorgenommen. Die Belichtungszeit betrug jeweils 30 Minuten. Danach wurden die Image Plates, welche die gestreute Strahlung von der Probe detektiert haben, mit einem Scanner ausgelesen und mit dem Programm *2D-SAXSquant* als Streukurven ausgewertet. Die weitere Auswertung erfolgte mit dem Programm *SAXS Quant*, in dem die Spektren normiert, das normierte Pufferspektrum von der normierten Messung subtrahiert und bezüglich des breiten Strahls korrigiert wurden.

### 3.2.4. Fluoreszenzmikroskopie (FM)

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop Biorad MRC 1024 [Zeiss, Oberkochen, DE], gekoppelt mit dem invertierten Nikon Eclipse TE-300 Mikroskop [Nikon, Tokio, JPN], aufgenommen.

Die temperaturabhängigen Messungen erfolgten in einem Bereich von 20-50 °C und die druckabhängigen Messungen in einem Bereich von 1-800 bar in 100 bar Schritten bei einer Temperatur von 50 °C für das Dreikomponentensystem und von 45 °C für das Fünfkomponentensystem. Die Aufnahmen wurden mit der CCD Kamera Andor iXon Ultra [Acal BFi, Dietzenbach, DE] und mit einem Objektiv des Typs LU Plan ELWD 50x/0,55 B, OFN 25, WD 10.1 [Nikon, Tokio, JPN] aufgenommen. Die Wellenlänge von 560 nm, zur Anregung von *N-Rh-DHPE*, wurde unter Verwendung einer Quecksilberdampfampe Hg 100 W und einem Anregungsfilter eingestellt. Die Aufnahmen wurde mit dem Programm *NIS Elements BRV.4.50.00* [Nikon, Tokio, DE] erstellt und mit dem Programm *ImageJ* bearbeitet. Für alle Systeme wurden Messungen an verschiedenen Stellen jeder einzelnen Probe durchgeführt. Außerdem wurden separat voneinander präparierte Proben untersucht. Als Probenhalter diente eine selbst gebaute Mikroskopie-Hochdruckzelle<sup>70</sup>. Die Hochdruckzelle (vgl. Abb. 3.2) ist von beidem Seiten mit einem Diamantfenster verschlossen. Für die Befüllung der Zelle wurde eine Seite geöffnet und auf das



gegenüberliegende Fenster ein PTFE-Ring, dessen innerer Durchmesser 3 mm und äußerer Durchmesser 8 mm beträgt, gelegt. In den Inneren des Ringes wurden 20  $\mu\text{L}$  Probenlösung pipettiert und darüber ein rundes Deckgläschen mit einem Durchmesser von 8 mm platziert. Für die temperaturabhängigen Messungen wurde die Hochdruckzelle verschlossen und ein Heizblock daran angeschraubt, der mithilfe eines zirkulierendes Wasserbad [Julabo, Seelbach, DE] temperiert wurde. Für die Druckmessungen wurde das Fenster fest verschlossen und eine Druckkapillare daran angeschraubt. Die Druckkapillare war an eine Druckpumpe [Nova Swiss, Effretikon, CHE] angeschlossen, über welche der Druck hydrostatisch aufgebaut wurde.

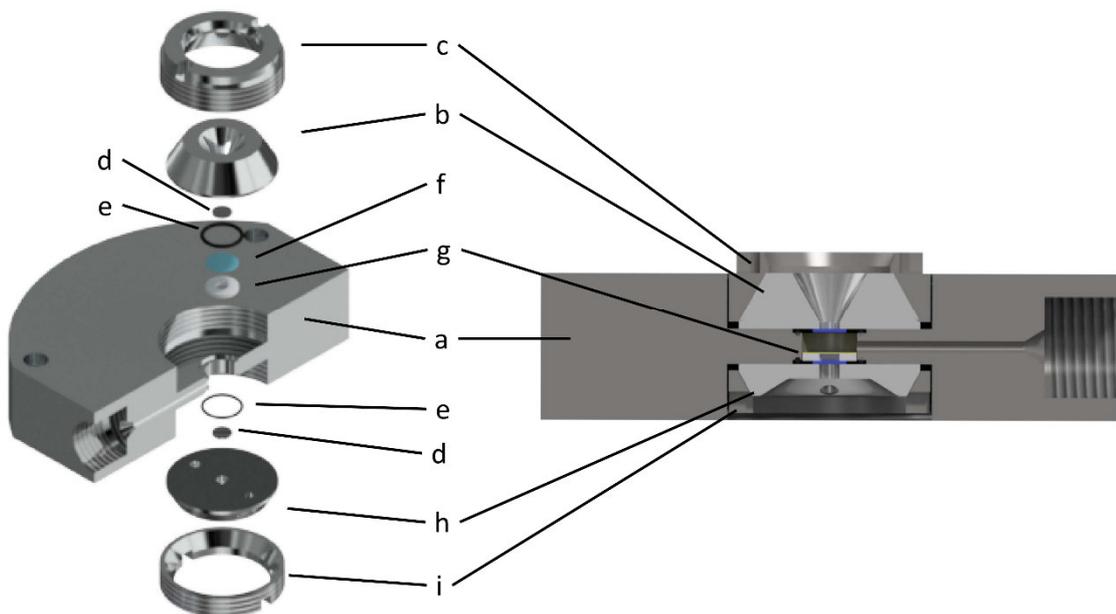
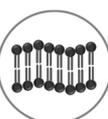


Abb. 3.2 Explosionsdarstellung (links) und Querschnitt (rechts) der Mikroskopie-Hochdruckzelle ( a : Zellkörper; b : Oberer Stempel; c : Obere Stempelmutter; d : Diamantfenster; e : O-Ring; f : Deckglas; g : PTFE-Ring; h : Unterer Stempel und i : Untere Stempelmutter). Aus <sup>[71]</sup> dargestellt und modifiziert.



#### 3.3. Ergebnisse und Diskussion

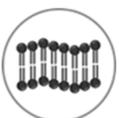
Zu den untersuchten Modellbiomembranen zählt ein einfaches Einkomponentensystem aus DMPC, ein Dreikomponentensystem aus DOPC:DPPC:Cholesterol (1:2:1) und ein anionisches Fünfkomponentensystem aus DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Cholesterol (20:5:45:5:25), in welche jeweils ein Stoffmengenanteil von 0,3 und 0,1 des 25-Hydroxycholesterol zusätzlich zu dem vorhandenem Cholesterol eingebaut wurde. Für die Untersuchung der Wechselwirkung von Oxysterol mit den Lipidsysteme wurden Fluoreszenzspektroskopie, RÖNTGENkleinwinkelstreuung- und Fluoreszenzmikroskopie-Messungen durchgeführt.

##### 3.3.1. Fluoreszenzspektroskopie (FS) – Messungen

Mithilfe der Fluoreszenzspektroskopie lässt sich die Phasenkoexistenz, der Phasenübergang und der laterale Lipidordnungsparameter quantitativ ermitteln. Zu diesem Zweck wird das geräteunabhängige Konzept der verallgemeinerten Polarisation (*generalized polarization, GP*) angewandt. Dieses beruht auf dem Fluorophor Laurdan, dessen Emissionsmaximum sich in Abhängigkeit der Polarität der Umgebung ändert. Der GP-Wert ist definiert nach der folgenden Gleichung:

$$GP = \frac{I_{440nm} - I_{490nm}}{I_{440nm} + I_{490nm}} \quad (\text{Gl. 2})$$

Das Laurdan lagert sich zwischen die Lipide an und zeigt über einen Wellenlängenshift an, in welcher Phase diese vorliegen. In der Gelphase sind die Lipide weniger hydratisiert, wodurch das Laurdan in einer unpolaren Umgebung vorliegt. In der flüssig-kristallinen Phase hingegen befinden sich die Moleküle in einer polaren Umgebung. Durch die erhöhte Anzahl an *gauche*-Konformeren weist die Lipiddoppelschicht eine höhere Fluidität auf, wodurch Wassermoleküle in die Kopfgruppenregion diffundieren können. Laurdan besitzt je nach Polarität seiner Umgebung das Emissionsmaximum bei 440 nm (unpolar) oder bei 490 nm (polar).<sup>6</sup>



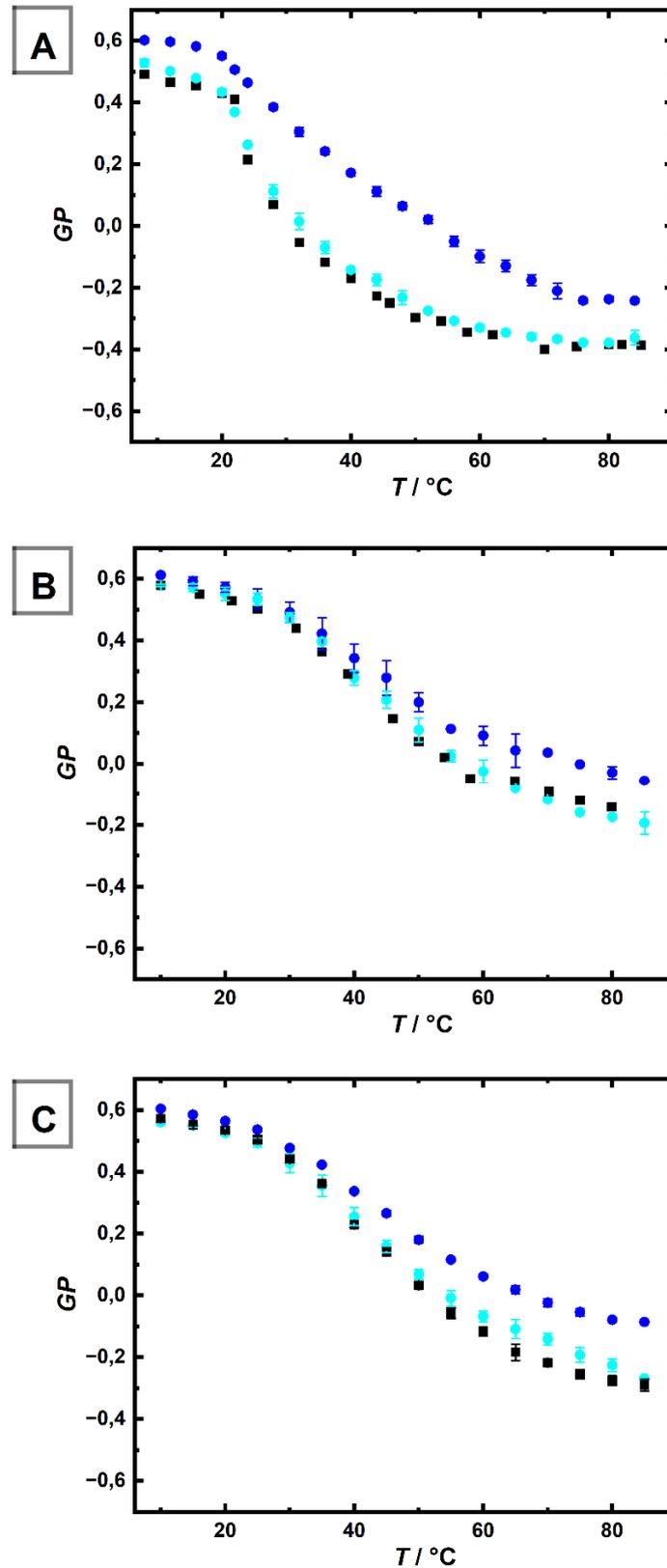
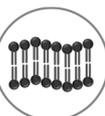


Abb. 3.3: Einfluss der Temperatur auf die generalisierte Polarisation  $GP$  des A) Einkomponentensystems DMPC, B) Dreikomponentensystems DOPC:DPPC:Chol. (1:2:1) und C) Fünfkomponentensystems DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Chol. (45:20:25:5:5) [ab 60 °C Messdaten von Kurve  $X_{25-OH} = 0$  von Bornemann et al.<sup>40]</sup> mit verschiedenen Stoffmengenanteilen von 25-Hydroxycholesterol  $X_{25-OH} = 0$  (schwarz), 0,1 (hellblau) und 0,3 (dunkelblau).



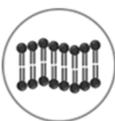
### 3.3. Ergebnisse und Diskussion

---

Bei den temperaturabhängigen FS - Messungen zeigt sich, dass die Werte der generalisierten Polarisierung mit steigender Temperatur abfallen, welches auf die Absenkung der lateralen Ordnungsparameter hindeutet. Bei dem Einkomponentensystem wird ein relativ scharfer Phasenübergang sowie ein nahezu sigmoidaler Kurvenverlauf beobachtet, wohingegen die komplexen Systeme einen stetigeren Anstieg der lateralen Unordnung aufzeigen, da sie einen größeren Phasenkoexistenzbereich durchlaufen (vgl. Abb. 3.3).

Der Verlauf der gemessenen reinen DMPC-Kurve und die ermittelte Hauptübergangstemperatur von 24 °C entspricht den literaturbekannten Werten.<sup>72,73</sup> Die Zusätze von 25-Hydroxycholesterol bei einem Stoffmengenanteil  $X_{25-OH}$  von 0,1 und 0,3 verändern die Kurvenform der Lipidsysteme. Bei einem Stoffmengenanteil  $X_{25-OH}$  von 0,1 des 25-Hydroxycholesterols wird die laterale Ordnung und der Hauptphasenübergang der DMPC-Modellbiomembran nicht signifikant beeinflusst, wohingegen der Stoffmengenanteil von 0,3 eine Erhöhung der  $GP$ -Werte hervorruft (vgl. Abb. 3.3, A). Dies lässt darauf schließen, dass sowohl in der Gelphase als auch in der fluiden Phase die Konformationsordnung erhöht ist und somit die Hydratation der Kopfgruppenregion reduziert wird und die DMPC-Modellbiomembran insgesamt rigider wird. Dieser Effekt scheint schwächer in der reinen Gelphase und Fluidphase als im Zweiphasengebiet auszufallen. Beginnend bei 20 °C bis zu einem Temperaturbereich von 30-40 °C verstärkt sich der Einfluss von 25-Hydroxycholesterol, welches sich durch die relativ gestiegenen  $GP$ -Werte verdeutlicht. Somit kann die Aussage getroffen werden, dass der Effekt von 25-Hydroxycholesterol sich am ausgeprägtesten im Phasenübergangsbereich darstellt, wo die Lipidketten sowohl in der *gauche*- als auch in der *all trans*-Konformation vorliegen. Dies weist darauf hin, dass 25-Hydroxycholesterol wie Cholesterol den Bereich der Phasenkoexistenz vergrößert.<sup>17</sup>

Bei den komplexeren Modellbiomembranen verlaufen die jeweiligen Kurven ähnlich den entsprechenden Referenzmessungen. Der Stoffmengenanteil von 0,1 des 25-Hydroxycholesterols hat wie bei dem Einkomponentensystem keinen signifikanten Effekt. Die Erhöhung des Stoffmengenanteils auf 0,3 veranschaulicht, dass sich die  $GP$ -Werte in der Gelphase im gleichen Bereich befinden. Ab einer Temperatur von 40 °C liegen die  $GP$ -Werte des Dreikomponentensystems mit einem 25-Hydroxycholesterol Stoffmengenanteil von 0,3 deutlich höher als die  $GP$ -Werte der anderen beiden Kurven (vgl. Abb. 3.3, B). Bei der Fünfkomponenten Modellbiomembran wird dieser Trend ab einer Temperatur von 35 °C beobachtet (vgl. Abb. 3.3, C). Der Effekt des Oxysterols ist somit, wie erwartet, in der fluiden Phase am stärksten und bewirkt eine Erhöhung der lateralen Lipidordnung in dieser Phase.



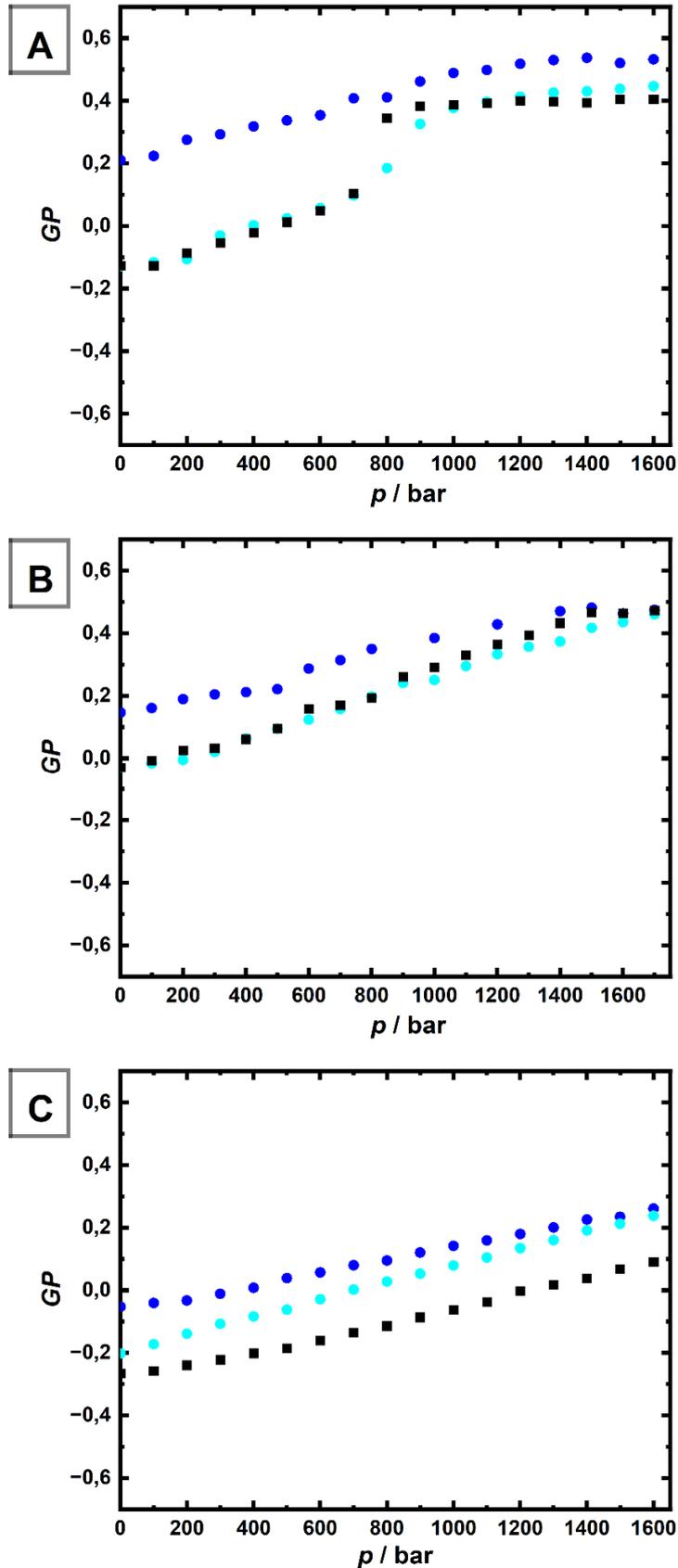
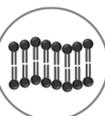


Abb. 3.4: Analyse des Einflusses des Drucks auf den  $GP$ -Wert von A) dem Einkomponentensystem DMPC bei  $T = 40$  °C, B) dem Dreikomponentensystem DOPC:DPPC:Chol. bei  $T = 60$  °C und C) dem Fünfkomponentensystem bei  $T = 80$  °C mit verschiedenen Stoffmengenanteilen an 25-Hydroxycholesterol  $X_{25-OH} = 0$  (schwarz), 0,1 (hellblau) und 0,3 (dunkelblau).



### 3.3. Ergebnisse und Diskussion

---

Die barotropen Messungen bestätigen den Trend, der bei den thermotropen Messungen beobachtet werden konnte. Die generalisierten Polarisationswerte liegen bei einem Stoffmengenanteil von 0,3 höher als bei den anderen Stoffmengenanteilen (0,1 und 0), womit die Aussage getroffen werden kann, dass das Oxysterol die laterale Ordnung der Lipide in der fluiden Phase erhöht (vgl. Abb. 3.4). Dieser Effekt ist bei dem Einkomponentensystem am ausgeprägtesten. Der Fluid-zu-Gelphase Übergangsdruck scheint sich verbreitert zu haben, welches auf eine Phasenkoexistenz hindeutet (vgl. Abb. 3.4, A). Diese Aussage entspricht auch den Ergebnissen der temperaturabhängigen Messungen. Der Einfluss des Druckes bei der Fünfkomponentensystem Modellbiomembran scheint den Effekt des 25-Hydroxycholesterol auch in der Gelphase zu verstärken, da bei hohen Drücken die Werte der Kurve des Fünfkomponentensystems mit dem Oxysterol deutlich über der Referenzkurve liegen (vgl. Abb. 3.4, C). Dies kann bei den temperaturabhängigen Messungen nicht beobachtet werden.

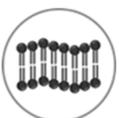
#### 3.3.2. RÖNTGENkleinwinkelstreuung (SAXS) - Messungen

Mithilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung können nicht nur die Form und Größe von Proteinen, sondern auch die lamellare Schichtdicke  $d$  einer Membran in multilamellaren Vesikeln untersucht werden. Die lamellare Schichtdicke besteht aus der Lipiddoppelschichtdicke  $d_L$  und der angrenzenden Wasserschicht  $d_W$ . Anhand der BRAGG-Gleichung lässt sich die lamellare Schichtdicke  $d$  der multilamellaren Vesikel über die Beugungsordnung  $n$  und den Streuvektorbetrag  $Q$  mit

$$d = \frac{2 \cdot \pi \cdot n}{Q} \quad (\text{Gl. 3})$$

bestimmen. Die Reflexionen treten als Beugungsmaxima in den gemessenen Streukurven auf, wobei die Intensität gegen den Streuvektor  $Q$  aufgetragen wird. Somit ist die Position der Reflexsignale reziprok zu den periodischen Abständen  $d$  der Lipiddoppelschichten.<sup>6</sup>

In der Abbildung 3.5 werden die ermittelten lamellaren Schichtdicken in Abhängigkeit der Temperatur für die multilamellaren Vesikel des Einkomponentensystems und des Dreikomponentensystems dargestellt.



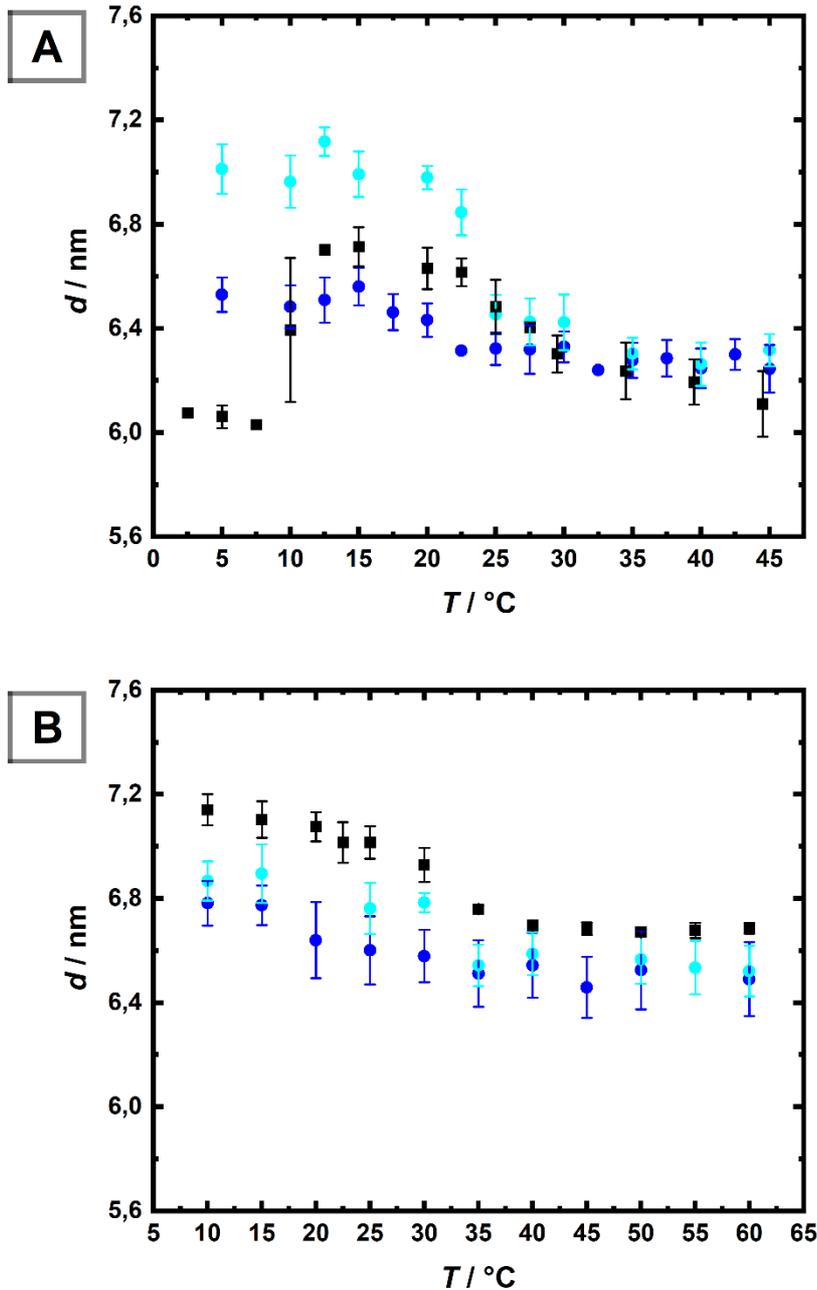
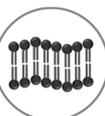


Abb. 3.5: Auftragung der lamellaren Schichtdicke  $d$  gegen die Temperatur A) des Einkomponentensystems DMPC und B) des Dreikomponentensystems DOPC:DPPC:Chol. mit verschiedenen Stoffmengenanteilen an 25-Hydroxycholesterol:  $X_{25-OH} = 0$  (schwarz), 0,1 (hellblau) und 0,3 (dunkelblau).

Die gemessene Kurve für das reine DMPC entspricht der Literatur.<sup>73</sup> Der erste Wendepunkt definiert die Vorphasenübergangstemperatur ( $L_{\beta}$  zu  $P_{\beta}$ ) und der zweite Wendepunkt die Hauptphasenübergangstemperatur ( $P_{\beta}$  zu  $L_{\alpha}$ ) bei 24 °C, welche ebenfalls aus der Messung der Fluoreszenzspektroskopie zu entnehmen ist. Der Zusatz von 25-Hydroxycholesterol weist einen Einfluss sowohl auf die lamellare Schichtdicke als auch auf die Phasen auf. Der Phasenübergang scheint sich verbreitert zu haben. Wie bei der Zugabe von Cholesterol entsteht eine Phase,

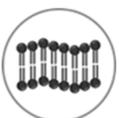


### 3.3. Ergebnisse und Diskussion

---

welche die Eigenschaften einer fluiden Phase mit hoher lateraler Ordnung besitzt. Dieses Resultat spiegelt sich auch in den Ergebnissen aus den Messungen der Fluoreszenzspektroskopie wieder. Im Vergleich zu der Referenzmessung wird die lamellare Schichtdicke unter 25 °C bei einem Zusatz von einem Stoffmengenanteil von 0,1 erhöht, wohingegen sie bei einem Stoffmengenanteil von 0,3 verringert wird. Ab einer Temperatur von 25 °C wird dagegen kein signifikanter Unterschied mehr beobachtet (vgl. Abb. 3.5, A). Somit ist der Einfluss von 25-Hydroxycholesterol auf den Phasenkoexistenzbereich am stärksten. Die Zugabe von Oxysterol führt zu einer Zunahme der Dicke, da es sich zwischen die Lipidketten des DMPC einbaut und die laterale Ordnung steigert.<sup>74,75</sup> Eine Erhöhung der Oxysterolkonzentration induziert dagegen eine Kontraktion der Dicke. Aufgrund der erhöhten Oxysterolkonzentration in der *bulk*-Wasser könnten die Wassermoleküle aus der Wasserschicht in die *Bulk*-phase diffundieren, wodurch die Dicke der interlamellaren Wasserschicht kleiner wird. Die Verringerung der lamellaren Schichtdicke könnte dementsprechend auf die kleinere Schichtdicke der Wasserschicht beruhen. Bei einer Temperatur über 25 °C wird aufgrund der Fluidität die Einlagerung einer höheren Oxysterolkonzentration in die Membran ermöglicht, wodurch es bei dieser Konzentration zu keinem Ausgleich zwischen interlamellaren Wasserschicht und *Bulk*-phase kommt.

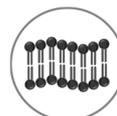
Bei dem Dreikomponentensystem verringert sich bei beiden 25-Hydroxycholesterol Konzentrationen die lamellare Schichtdicke, bei der höheren Konzentration ist der Effekt stärker ausgeprägt (vgl. Abb. 3.5, B). Der Einfluss ist wie bei den Vesikeln aus DMPC bei tieferen Temperaturen am ausgeprägtesten und ab 40 °C am schwächsten. Die Lipide in der Phasenkoexistenz aus der  $l_o$  und  $l_d$  Phase scheinen dichter gepackt zu sein. Studien von *Olsen et al.* beschreiben, dass 25-Hydroxycholesterol durch die Verkleinerung der Dicke die Durchlässigkeit der Membranen für Ionen und kleine Osmolyte erhöhen.<sup>74,76,77</sup>



### 3.3.3. Fluoreszenzmikroskopie (FM) – Messungen

Mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen können die verschiedenen physikalischen und chemischen Einflüsse auf Modellbiomembranen visuell betrachtet werden, schließlich ergänzen sich Mikroskopie Aufnahmen und Spektroskopie Daten. In den folgenden Abbildungen wird die Temperatur- und Druckabhängigkeit der komplexen Modellbiomembranen, die Domänen ausbilden, mit den verschiedenen 25-Hydroxycholesterol Stoffmengenverhältnissen dargestellt. Die Domänenbildung beruht auf der Phasenkoexistenz der  $l_d$  und  $l_o$  Phase.<sup>36,78</sup> Mit dem Fluorophor Rhodamin-*N*-DHPE wird die  $l_d$  Phase markiert,<sup>79</sup> die in den dargestellten Abbildungen rot gekennzeichnet ist. Der schwarze Bereich der Vesikel stellt damit die  $l_o$  Phase dar. Die Aufnahmen von dem Einkomponentensystem mit dem 25-Hydroxycholesterol zeigen keine Domänenbildungen. Die DMPC/25-Hydroxycholesterol Vesikel könnten Nanodomänen ausbilden, die mit dem Mikroskop nicht aufgenommen werden können (Anhang, Abb. 7.3). Dies entspricht den Ergebnissen aus den Messungen der Fluoreszenzspektroskopie und Röntgenkleinwinkelstreuung.

Bei dem reinen Dreikomponentensystem ist die Phasenkoexistenz bis 35 °C beobachtbar, bei höheren Temperaturen sind die Domänen wahrscheinlich zu klein, um aufgenommen werden zu können (vgl. Abb. 3.6), da die Phasenübergangstemperatur ( $l_o$ - $l_d$  zu  $l_d$ ) bei 45 °C beträgt.<sup>73</sup> Dagegen scheint 25-Hydroxycholesterol die Makrodomänenbildung zu begünstigen, da die Phasenkoexistenz bis 40 °C bei einem Stoffmengenanteil von 0,1 und bis 50 °C bei einem Stoffmengenanteil von 0,3 mit dem Mikroskop untersucht werden kann. Es scheint, dass die Domänenbildung bei Anwesenheit von 25-Hydroxycholesterol zunimmt. Dies entspricht den druckabhängigen Aufnahmen (vgl. Abb. 3.7). Die Modellbiomembranen mit 25-Hydroxycholesterol haben schon bei niedrigen Drücken Domänen ausgebildet, wobei bei dem reinen System der Modellbiomembranen diese erst ab 700 bar sichtbar sind.



### 3.3. Ergebnisse und Diskussion

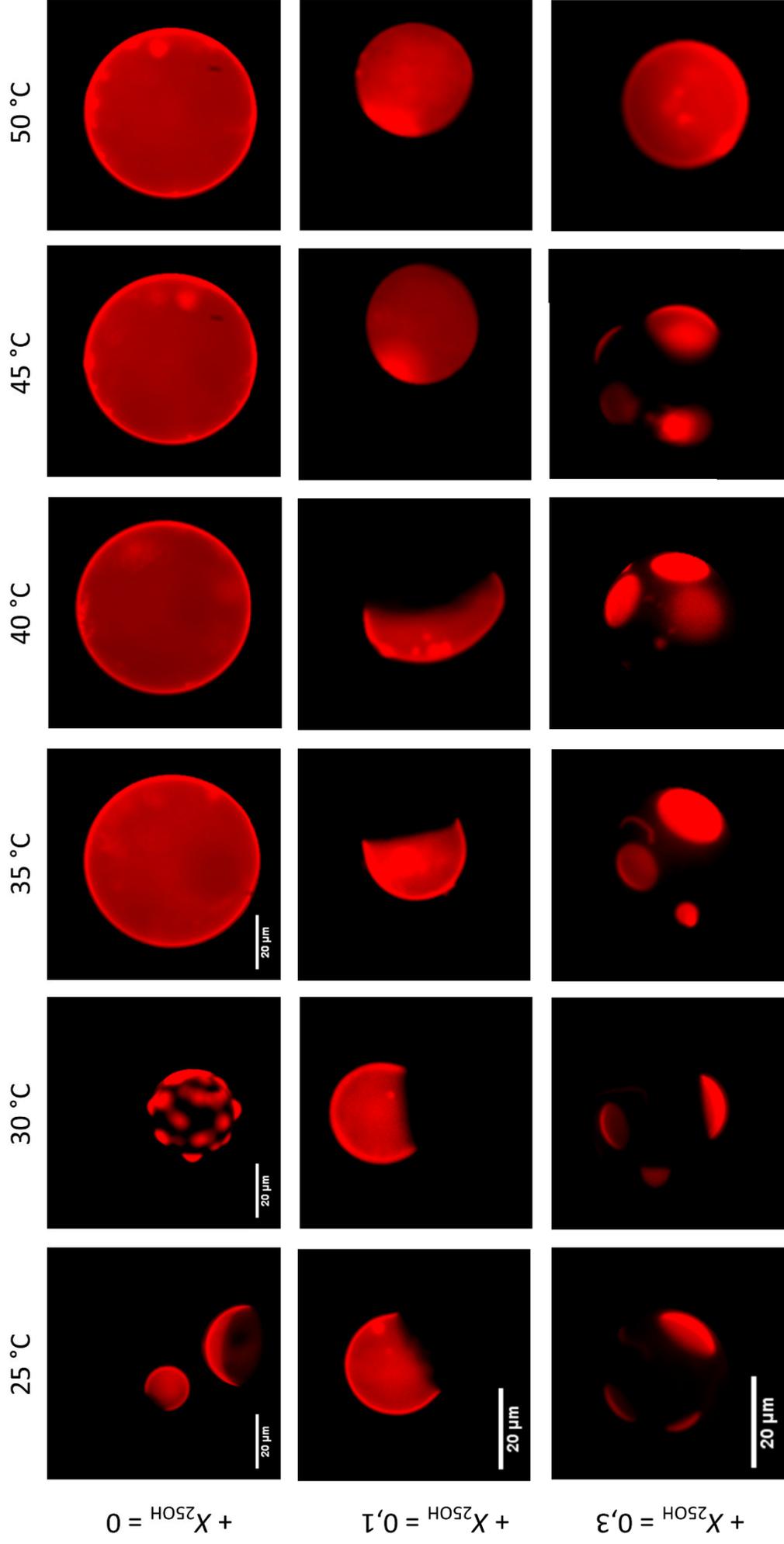


Abb. 3.6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Dreikomponentensystem DOPC:DPPC:Chol.(1:2:1) in Abhängigkeit der Temperatur mit verschiedenen Stoffmengenanteilen von 25-Hydroxycholesterol  $X_{25-OH} = 0, 0,1$  und  $0,3$ ; rot:  $l_d$  Phase / schwarz:  $l_0$  Phase. Skalenteile: 20 μm.

### 3.3 Ergebnisse und Diskussion

---

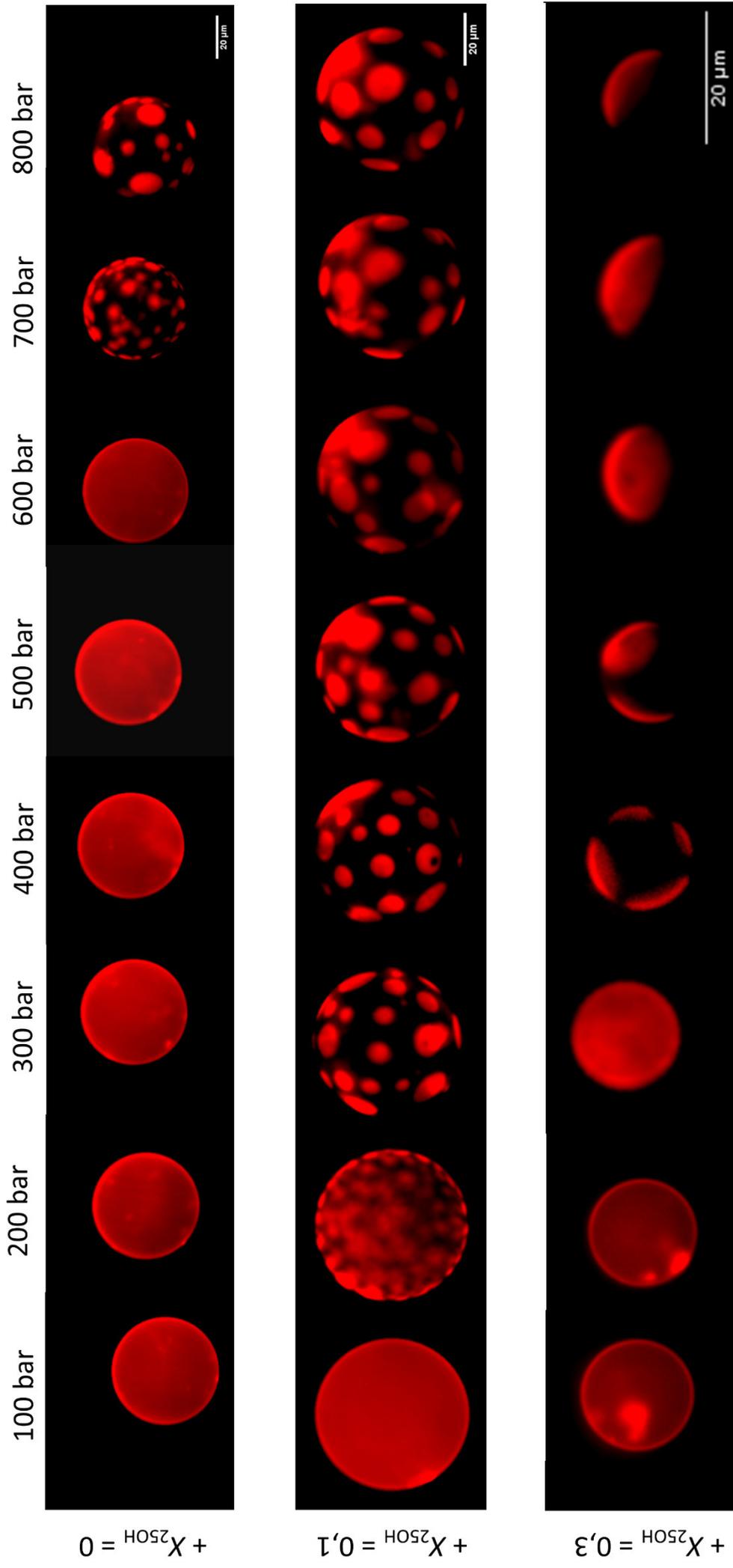


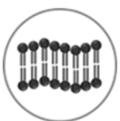
Abb. 3.7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Dreikomponentensystem DOPC:DPPC:Chol. (1:2:1) in Abhängigkeit des Druckes ( $T = 50\text{ °C}$ ) mit verschiedenen Stoffmengenanteilen von 25-Hydroxycholesterol:  $X_{25\text{OH}} = 0, 0,1$  und  $0,3$ ; rot:  $l_d$  Phase / schwarz:  $l_o$  Phase. Skalenleiste: 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.3. Ergebnisse und Diskussion

---

Der Effekt von 25-Hydroxycholesterol auf das anionische Fünfkomponentensystem scheint in Abhängigkeit der Temperatur geringer auszufallen als im Vergleich zu dem Dreikomponentensystem. Bei den druckabhängigen Aufnahmen kann beobachtet werden, dass der Stoffmengenanteil von 0,1 im Gegensatz, zu dem von 0,3 einen größeren Einfluss auf das Fünfkomponentensystem hat, welches den Ergebnissen aus den druckabhängigen Fluoreszenzspektroskopie Messungen entspricht. Die Begünstigung einer dichten Lipidpackung durch das 25-Hydroxycholesterol<sup>75,80</sup> kann durch den Druck verstärkt werden und erleichtert die Bildung von Domänen. Bei hohen Konzentration an 25-Hydroxycholesterol werden keine kleinen Domänen mehr beobachtet, sondern makroskopische Phasenseparationsbereiche.

Bei der Betrachtung der Vesikel der beiden komplexen Systeme aus den temperaturabhängigen Messungen mit  $X_{25-OH} = 0,3$  lässt sich eine Unterscheidung der Form der Domänen erkennen. Bei den DOPC:DPPC:Chol. Vesikeln werden getrennte kleine Domänen gebildet, wohingegen bei den anionischen Vesikeln der Domänenbereich größer ausfällt. Diese Beobachtung lässt sich mit den Ergebnissen der Simulationen aus der Literatur vereinbaren, wo beschrieben wird, dass der Effekt des 25-Hydroxycholesterols auf die Domänen abhängig von der Lipidkomposition sowie von dem Sättigungsgrad der Lipide ist.<sup>81</sup> Die Bildung größerer Domänen aus kleinen Domänen scheint bei dem Dreikomponentensystem gehemmt zu sein, was auf eine kleinere Grenzlinienspannung zwischen den  $l_o$  und  $l_d$  Phasen verweist.



### 3.3 Ergebnisse und Diskussion

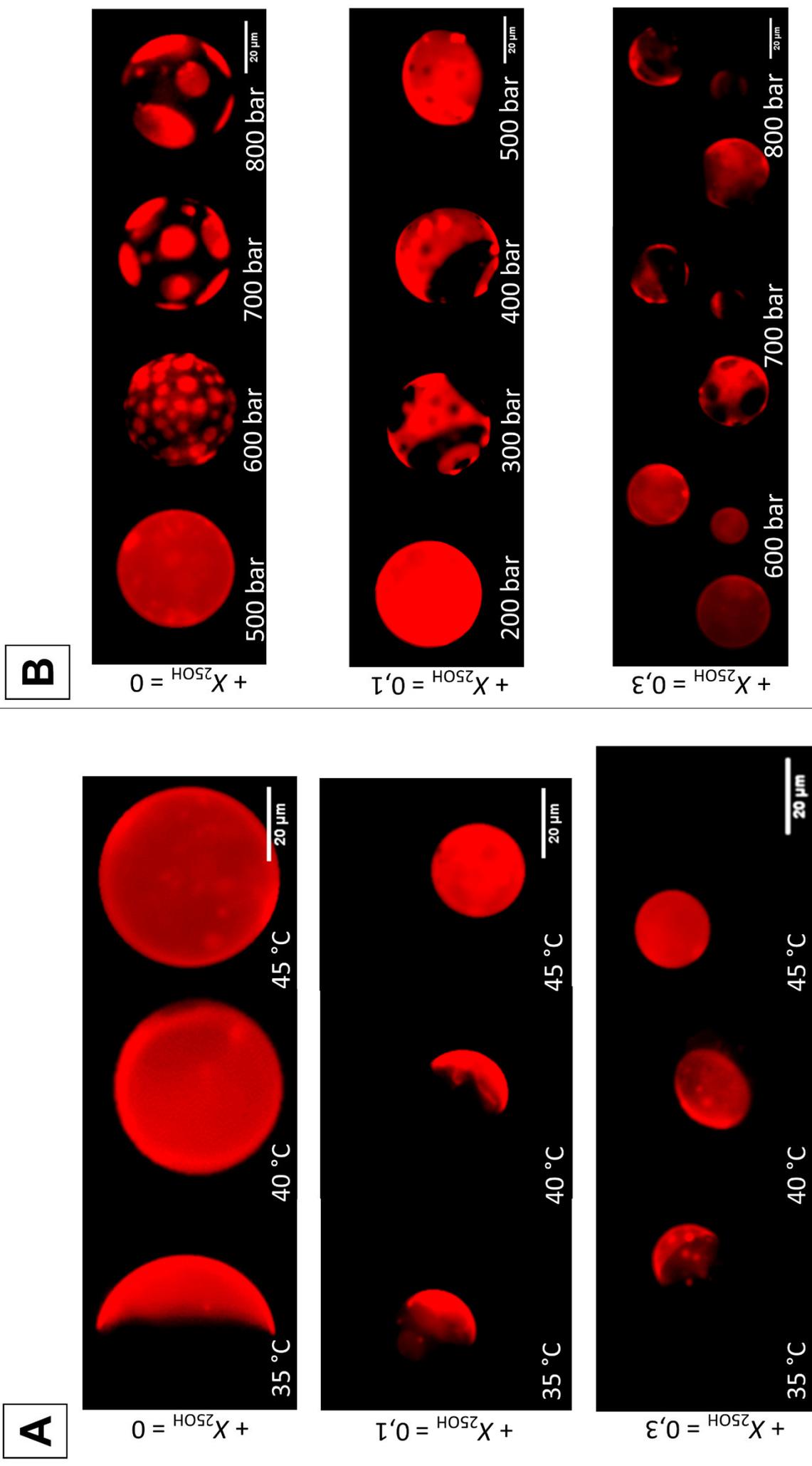
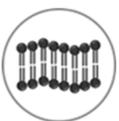


Abb. 3.8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Fünfkomponentensystem. in Abhängigkeit A) der Temperatur beziehungsweise B) des Druckes ( $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$ ) mit verschiedenen Stoffmengenanteil von 25-Hydroxycholesterol  $X_{25-OH} = 0, 0,1$  und  $0,3$ ; rot:  $l_d$  Phase/ schwarz:  $l_o$  Phase. Skalenleiste: 20  $\mu\text{m}$ .

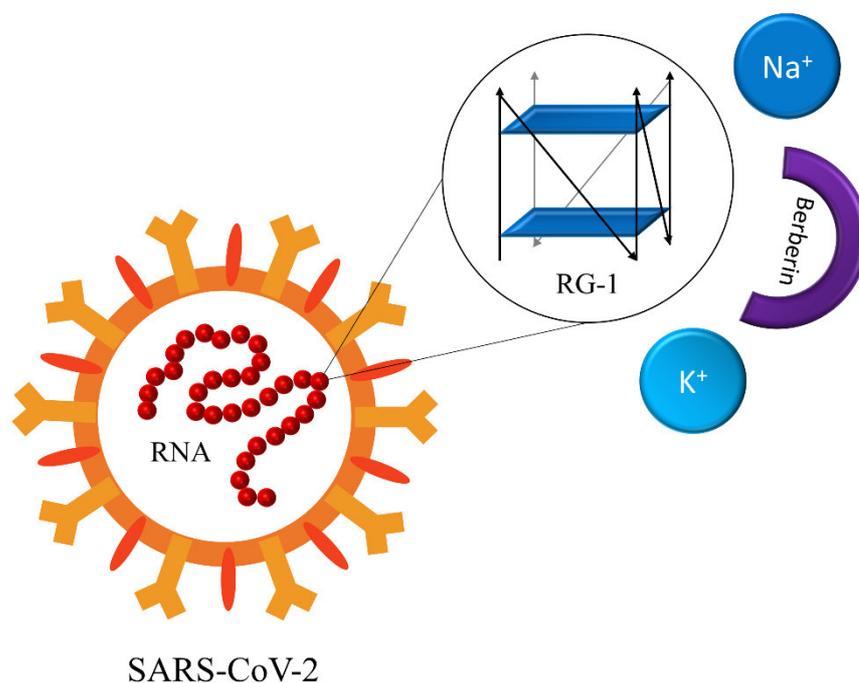
#### 3.4. Zusammenfassung

Die Studien des Einflusses von 25-Hydroxycholesterol auf Lipidmonolayern sowie Simulationsberechnungen zeigten, dass der Effekt des Oxysterols auf die Membraneigenschaften sehr stark abhängig von der Lipidzusammensetzung ist. Diese Erkenntnis lässt sich mit den Ergebnissen aus den spektroskopischen und mikroskopischen Untersuchungen der verschiedenen Vesikel aus dieser Arbeit bestätigen. Das 25-Hydroxycholesterol hat, wie Cholesterol, einen kondensierenden Effekt<sup>82,83</sup> auf das Einkomponenten Lipidsystem DMPC, welches sich durch eine Erhöhung der lateralen Ordnung und Beibehaltung der Eigenschaften einer fluiden Phase in der Membran äußert. Bei dem Dreikomponentensystem mit einem gesättigten Lipid, einem ungesättigten Lipid und Cholesterol, das literaturbekannt ist Domänen auszubilden, erhöht 25-Hydroxycholesterol die Zugänglichkeit von Molekülen in der Membran. Dies führt zu einer Änderung der Kettenordnung sowie zu einer Erniedrigung der lamellaren Schichtdicke.<sup>77</sup> Jedoch kann daraus nicht geschlossen werden, dass 25-Hydroxycholesterol für die Verdickung der Zellwände und für die Krankheit Atherosklerose verantwortlich ist, da der Effekt nur minimal ausfällt. Bei einer höheren Konzentration könnte sich der Effekt steigern, wie bei dem Osmolyten TMAO, der auch in Verdacht steht eine Beteiligung bei der Erkrankung von Atherosklerose zu haben, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen jedoch verschieden sind.<sup>84</sup>

Die Funktion des 25-Hydroxycholesterols als Immunregulator, der die Fusion der Viren wie Hepatitis C<sup>62</sup> oder der des menschlichen Rotavirus<sup>58</sup> mit den Membranen durch eine Veränderung derer biophysikalischen Eigenschaften verhindert, könnte durch eine Veränderung der lateralen Ordnung begründet werden. *Wnetrzak et al.* untersuchten den Einfluss von 25-Hydroxycholesterol mit einem Stoffmengenanteil von  $X_{25-OH} = 0,1$  und  $X_{25-OH} = 0,3$  auf Monolayer aus verschiedenen Lipidzusammensetzungen, die mit ZIKA-Viren infiziert waren. Es zeigte sich, dass das Oxysterol die Ausbildung kleiner ovalen Domänen in dendritischen Zellen und größerer verformter Domänen bei den neuronalen Zellen fördert.<sup>67</sup> Bei den temperaturabhängigen Messungen in der vorliegenden Arbeit wurde die Ausbildung zahlreicher kleiner, runder Domänen in der zwitterionischen Membran beobachtet. Bei dem Fünfkomponentensystem lag die Phasenseparation eher makroskopisch vor. Die Wirkung von 25-Hydroxycholesterol auf anionische Membranen wird durch den Einfluss des Drucks verstärkt, der es erlaubt die Kettenordnung zusätzlich zu erhöhen. Diese Resultate könnten helfen die Ergebnisse von *Adamek et al.*<sup>68</sup> besser zu verstehen, welche die Blockierung des Eintritts von CyHV-3 in Zellen von Meerestieren durch 25-Hydroxycholesterol beschreiben.



# Bindungseigenschaften des Berberins an den G-Quadruplex der RG-1 Sequenz von der RNA des SARS-CoV-2 Viruses unter verschiedenen Lösungsbedingungen



---



## 4.1. Einleitung

Das Berberin (Berb), ein Isochinolin-Alkaloid, soll wie das 25-Hydroxycholesterol eine antivirale Wirkung besitzen, die zu der Hemmung des Virus SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2*) eingesetzt werden könnte.<sup>85–87</sup> Dieses RNA-Coronavirus verursachte den Ausbruch der COVID-19-Pandemie Ende 2019, welche durch Impfstoffe auf Basis neuartiger mRNA Technologie erfolgreich eingedämmt werden konnte. Jedoch können weiterhin Krankheitsverläufe durch SARS-CoV-2 und seine Mutationen dokumentiert werden, da der durch Impfungen erfolgte Immunschutz mit der Zeit nachlässt. Daher wäre die Entwicklung eines sicheren und antiviralen Mittels ein weiterer Fortschritt zu der Bekämpfung der Krankheit.<sup>88–91</sup>

Nicht-kanonische Nukleinsäurestrukturen wie G-Quadruplexe (G-4Q) im viralen Genom spielen eine große Rolle bei der Regulierung des Lebenszyklus von Viren.<sup>92–98</sup> Die Quadruplexe kommen häufig in guaninreichen Regionen vor. Ihr strukturelles Kennzeichen ist die Stapelung von zwei oder mehr planaren Anordnungen von vier Guanin-Molekülen (Tetraden), die durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen und durch Wechselwirkung mit Kationen wie Natrium- und Kaliumionen stabilisiert werden. Die Kationen befinden sich dabei in dem zentralen Kanal der Quadruplexe.

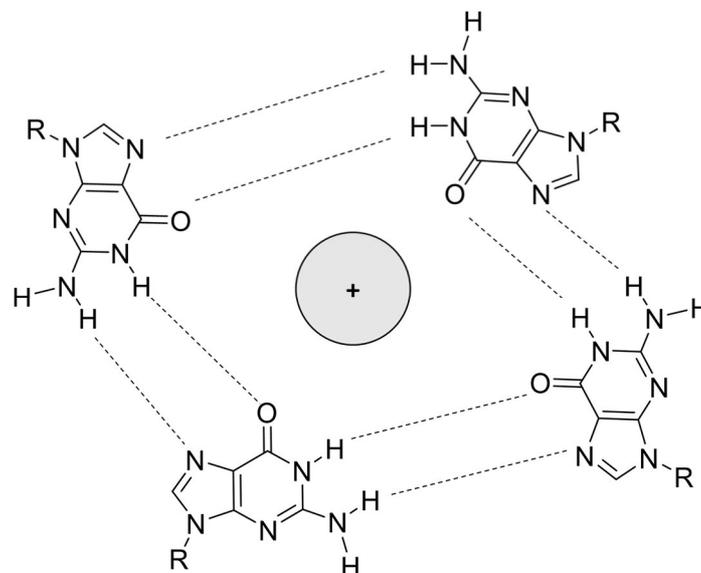


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der planaren Anordnung von vier Guanin-Molekülen (Tetrad). Die Guanin-Moleküle werden durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen, als gestrichelte Linie verdeutlicht, sowie durch die Wechselwirkungen mit Kationen (+), die sich im zentralen Kanal der Quadruplexe befinden, stabilisiert. Als Kationen können Natrium- und Kaliumionen zum Einsatz kommen.



## 4.1. Einleitung

---

Die Struktur der G-Quadruplexe kann in drei Kategorien anhand der Ausrichtung der Stränge und Schleifenstrukturen unterteilt werden:<sup>99–101</sup>

1. parallel: vier Stränge in derselben Ausrichtung
2. antiparallel: zwei Stränge in entgegengesetzter Ausrichtung zu den beiden anderen Strängen
3. hybrid: ein Strang in entgegengesetzter Ausrichtung zu den anderen Strängen

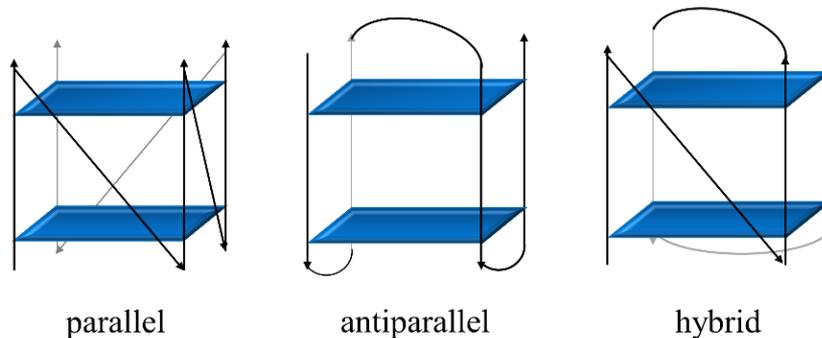


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der drei möglichen Strukturen eines G-Quadruplexes, die sich in der Ausrichtung der Stränge und Schleifenstrukturen unterscheiden. Parallel: Vier Stränge in derselben Ausrichtung; antiparallel: zwei Stränge in entgegengesetzter Ausrichtung zu den beiden anderen Strängen und hybrid: ein Strang in entgegengesetzter Ausrichtung zu den anderen Strängen.

Die Störung der Ausbildung von G-Quadruplexen, die an der Kontrolle der Genexpression beteiligt sind, kann durch Mutationen oder Stabilitätsveränderungen aufgrund äußerer Faktoren in Eukaryonten und Prokaryonten Ursache für neurodegenerative Krankheiten, Krebs und mikrobielle Infektionen sein.<sup>95–101</sup> In Viren können G-Quadruplexe das genetische virale Material bewahren und dessen Erkennung durch Komponenten des menschlichen Immunsystems verhindern.<sup>91–94,102</sup> Dagegen kann eine Überstabilisierung der G-Quadruplexe zu der Hemmung der Replikation viraler Proteine im Wirt führen. Deshalb können G-Quadruplexe spezifische Verbindungen als Ansatzpunkte für antivirale Wirkstoffe dienen. Aus der Literatur ist bekannt, dass G-Quadruplexe bildende Sequenzen in SARS-CoV-2 in lebenden Zellen G-Quadruplexe-Strukturen ausbilden können.<sup>92,103</sup> Die G-Quadruplexe bildende Sequenz RG-1 (GGCUGGCA-AUGGCGG) befindet sich in der kodierenden Sequenzregion des N-Proteins (SARS-CoV-2-Nukleokapsid-Phosphorprotein). Eine Bildung der Sequenz RG-1 führt zu der Hemmung der Translation von dem N-Protein, wodurch dessen Konzentration verringert wird.<sup>92</sup> Interessanterweise können in infizierten lebenden Zellen G-Quadruplexe ebenfalls nachgewiesen werden. Daher könnte eine Stabilisierung der Quadruplex-Sequenzen durch Liganden zu einer



Beeinträchtigung der infektiösen Verbreitung viraler Proteine führen. Für die Entwicklung von therapeutischen Strategien ist dies somit ein vielversprechender Ansatz für die Pharmazie.

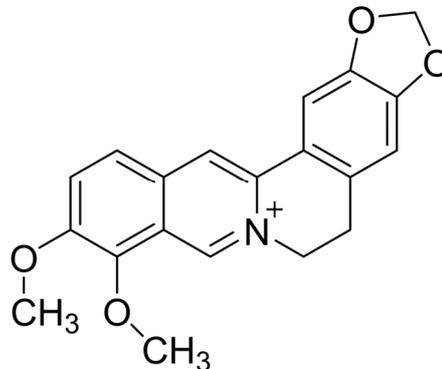


Abb. 4.3: Chemische Struktur des pflanzlichen Isochinolin-Alkaloids Berberin. Dieses planare Ligandenmolekül bindet an den G-Quadruplex und besitzt antivirale, antiallergische und entzündungshemmende Eigenschaften.

Das pflanzliche Isochinolin-Alkaloid Berberin, ein planares Ligandenmolekül, bindet an das G-Tetrads. Dabei können gleichzeitig zwei Berberinmoleküle an den externen Bindungsstellen der menschlichen telomeren DNA (22AG) binden.<sup>104</sup> Aus der Literatur ist bekannt, dass Berberin in der chinesischen Volksmedizin seit hunderten von Jahren verwendet wird, da es antivirale, antiallergische und entzündungshemmende Eigenschaften besitzt.<sup>104-107</sup> Es wurde gezeigt, dass Berberin gegen mehrere Isolate von SARS-CoV-2 wirksam ist und somit als oral verabreichtes Medikament gegen COVID-19 in Frage kommen könnte. Die Wirkungsweise des Medikaments beruht auf der Stabilisierung der Quadruplexe durch die Ligandenbindung mit Berberin.<sup>104</sup> Zu der Entwicklung dieser antiviralen Medikamente gegen COVID-19 wird die genaue Kenntnis der Struktur und Stabilität des G-Quadruplex-Liganden-Komplexes benötigt. In dieser Studie wird daher die Bindungseigenschaft von Berberin an die RNA RG-1 Sequenz des N-Gens von SARS-CoV-2 untersucht. Mithilfe verschiedener biophysikalischer Methoden, darunter Zirkulardichroismus - und Fluoreszenzspektroskopie, konnte die Bindungsthermodynamik und Konformationsänderungen bei der Bindung charakterisiert und somit ein weiterer Schritt für neue Heilmittel gegen SARS-CoV-2 erreicht werden.



### 4.2. Material und Methoden

#### 4.2.1. Material

In dieser Arbeit wurde die SARS-CoV-2 RNA mit der Sequenz GGCUGGCAAUGGCGG (RG-1) verwendet, welches von GenScript [Leiden, NL] käuflich erworben wurde. Die für die FRET-Experimente verwendeten markierten Sequenzen waren mit Carboxyfluorescein (FAM) in Position 5' und 5-(und-6)-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) in Position 3' markiert und wurden von GenScript [Leiden, NL] aufgereinigt.

Die fluoreszierende Verbindung Berberinchlorid (Berb), Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl), Dimethylsulfoxid (DMSO) und die Salze Natriumchlorid (NaCl) und Kaliumchlorid (KCl) wurden von Sigma Aldrich Chemicals [Merck, Darmstadt, DE] käuflich erworben. Alle Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Der Puffer bestand aus Tris-HCl (30 mM, pH 7,4) und wahlweise 100 mM NaCl oder 100 mM KCl. Die konzentrierten Stammlösungen von RG-1-Quadruplexen wurden durch Auflösen in dem entsprechenden Tris-HCl-Puffer (mit NaCl oder KCl) hergestellt. Ihre Konzentrationen wurden experimentell anhand des Extinktionskoeffizienten  $\epsilon(260) = 143.800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  bestimmt.<sup>108,109</sup> Die Absorption wurde bei einer Temperatur von 90 °C mit einem UV/Vis Spektralphotometer Shimadzu UV-1800 [Shimadzu Corporation, Kyoto, JPN] und einer 1 cm Quarzglasküvette mit einem Volumen von 3 mL gemessen. Die konzentrierte Stammlösung von Berberin (50 mM) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Die Konzentration wurde durch Verdünnung mit bidestilliertem Wasser und Messung der Absorption bei 421 nm unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten von  $4209 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  bestimmt.<sup>110</sup> Da DMSO die Nukleinsäure-Strukturen beeinträchtigen kann,<sup>111</sup> überstieg dessen Konzentration in allen Experimenten nie 0,6 Vol%.

#### 4.2.2. UV/Vis - Spektroskopie

UV/Vis - Spektren von Berberinlösungen mit einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  in Abwesenheit und in Anwesenheit von RG-1 wurden mit einem UV/Vis Spektralphotometer Shimadzu UV-1800 [Shimadzu Corporation, Kyoto, JPN] bei einer Temperatur von 25 °C unter Verwendung einer Quarzglasküvette mit 0,3 cm Schichtdicke im Bereich von 350-550 nm aufgenommen. Die Konzentrationen der G-Quadruplexes wurden zwischen 0 und 150  $\mu\text{M}$  variiert. Es wurde ein



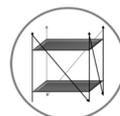
Tris-HCl-Puffer (30 mM, pH 7,4) mit dem Zusatz von wahlweise 100 mM NaCl oder 100 mM KCl verwendet.

### 4.2.3. Fluoreszenzspektroskopie im stationären Zustand

Die Bildung des Komplexes zwischen Berberin und der RG-1 Sequenz wurde mithilfe der Fluoreszenzspektroskopie verfolgt, da Berberin bei der Bindung an die G-Quadruplexe eine starke Fluoreszenz aufweist. Alle Proben wurden mit einem Multifrequenz Phasen- und Modulationsfluorometer Typ K2 [ISS, IL, USA] und dem Programm *Vinci 2* vermessen. Die Proben bestanden aus der Berberinlösung ( $c = 15 \mu\text{M}$ ) und einer Lösung von RG-1 in einem Konzentrationsbereich von 0-40  $\mu\text{M}$ , die bei einer Temperatur von 25 °C gemessen wurden. Die Anregungswellenlänge wurde auf 443 nm eingestellt und die Fluoreszenzintensität wurde beim Emissionsmaximum von 536 nm erfasst. Für die druckabhängigen Messungen wurde ein Hochdruckzellensystem [ISS, IL, USA] (siehe Abschnitt 3.2.2) und Quarzglasküvetten verwendet. Der Druck wurde mit einer Handpumpe geregelt und als Druckmittel diente Wasser. Die untersuchten Druckpunkte waren 1, 500, 1000, 1500 und 1900 bar. Die Proben wurden in eine druckfeste Quarzglasküvette gefüllt, mit DuraSeal™-Laborstretchfolie versiegelt und in die Hochdruckzelle gestellt. Zu der Bestimmung der Bindungskonstante  $K_b$  wurde die Differenz der Fluoreszenzintensität  $\Delta F$  gegen die Gesamtkonzentration des G-Quadruplexes RG-1 aufgetragen. Dabei ist  $\Delta F = F - F_0$ , wobei  $F$  und  $F_0$  die Fluoreszenzintensitäten von Berberin in Gegenwart beziehungsweise in Abwesenheit von dem G-Quadruplexen sind. Die Daten wurden mit einem n-äquivalenten und unabhängigen Bindungsstellenmodell<sup>112</sup> angepasst.

### 4.2.4. Job's Plot

Um die Stöchiometrie des gebildeten Komplexes zu bewerten, wurde die Methode des Job's Plots verwendet.<sup>113,114</sup> Zu diesem Zweck wurde eine Messreihe von Lösungen aus Berberin und RG-1 in beiden Puffervarianten, jeweils aus Natriumchlorid und Kaliumchlorid, hergestellt. Die Gesamtkonzentration des Komplexes RG-1/Berb betrug im Durchschnitt 60  $\mu\text{M}$ . Der Molanteil von Berberin,  $X_{\text{Berb}}$ , variierte zwischen 0,1 und 1,0. Die Proben wurden bei einer Temperatur von 25 °C vermessen. Die Fluoreszenzintensitäten wurden bei 536 nm nach der Anregung bei 443 nm aufgezeichnet.



### 4.2.5. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) – Experiment

Es wurden Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer- (FRET) Experimente durchgeführt, um das Konformationsverhalten der Quadruplexe unter Druck (Druckbereich: 1-2000 bar), in Abwesenheit und in Anwesenheit von Berberin zu bestimmen. Es wurden Lösungen der markierten RG-1 Sequenz in einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  in Abwesenheit und in Anwesenheit von 200  $\mu\text{M}$  Berberin hergestellt. Die Anregungswellenlänge wurde auf 490 nm eingestellt, die Fluoreszenzemission im Bereich von 500-650 nm aufgezeichnet. Die Experimente wurden im reinem Puffer sowie in Puffer mit den jeweiligen Salzen, Natriumchlorid und Kaliumchlorid, bei einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. Die FRET-Experimente wurden von Dr. Rosario Oliva durchgeführt.

### 4.2.6. Zirkulardichroismus (CD) - Spektroskopie

Mithilfe der Zirkulardichroismus (CD) - Spektroskopie wurden die Konformationen von RG-1 in den verschiedenen Lösungen und bei der Bindung an Berberin bei Umgebungsdruck untersucht. In den Messproben betragen die Konzentrationen von RG-1  $c = 30 \mu\text{M}$  und die Konzentration von Berberin  $c = 300 \mu\text{M}$ . Die Messproben wurden in einer 0,1 cm dicken Quarzglas-küvette und mit einem Jasco J-715 Spektropolarimeter [Jasco Corporation, Tokio, JPN] in einem Spektralbereich zwischen 230-330 nm bei einer Temperatur von 25 °C vermessen. Die angegebenen Spektren stellen die Ergebnisse von drei Akkumulationen dar. Folgende instrumentelle Parameter wurden verwendet: Scan-Rate 50  $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$ , Bandenbreite 5 nm und Ansprechzeit 2 s. Für jede Probe wurde ein Blindwert des Puffers mit und ohne Berberin aufgenommen und subtrahiert. Alle Spektren wurden zunächst von Milligrad in Extinktion umgerechnet, danach wurde die Absorption auf die Einzelstrangkonzentration und Weglänge normiert. Als Ergebnis ergab dies  $\Delta\epsilon$  ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).



## 4.3. Ergebnisse und Diskussion

Zunächst wurde mithilfe der UV/Vis Spektrophotometrie die Bindung des Liganden Berberin an die RG-1 Sequenz von SARS-CoV-2, welches G-Quadruplexe ausbildet, bei unterschiedlichen Lösungsbedingungen untersucht. Dafür wurden UV/Vis Spektren von 250  $\mu\text{M}$  Berberin bei zunehmender Konzentration des G-Quadruplexes [0-150  $\mu\text{M}$ ] in Abhängigkeit der Salze Kaliumchlorid und Natriumchlorid aufgenommen (vgl. Abb. 4.4).

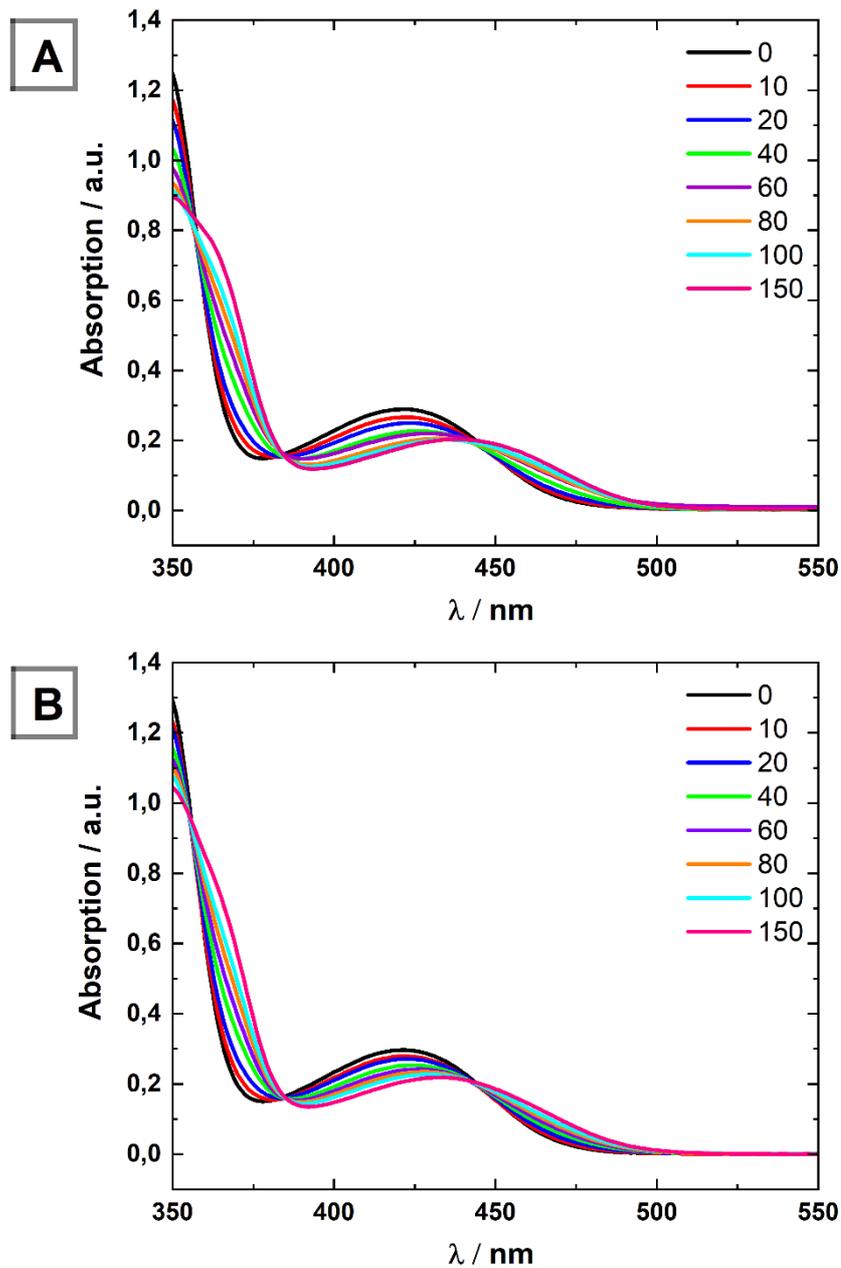


Abb. 4.4: UV/Vis-Absorptionsspektren einer 250  $\mu\text{M}$  Berberinlösung bei steigenden Konzentrationen an RG-1 [0  $\mu\text{M}$  (schwarz), 10  $\mu\text{M}$  (rot), 20  $\mu\text{M}$  (dunkelblau), 40  $\mu\text{M}$  (grün), 60  $\mu\text{M}$  (violett), 80  $\mu\text{M}$  (orange), 100  $\mu\text{M}$  (hellblau) und 150  $\mu\text{M}$  (pink)] in A) 100 mM Natriumchlorid und in B) 100 mM Kaliumchlorid bei  $T = 25^\circ\text{C}$ .



### 4.3. Ergebnisse und Diskussion

---

Das UV/Vis-Spektrum einer reinen wässrigen Berberinlösung (vgl. Abb. 4.4; schwarze Kurve) ist durch eine Absorptionsbande gekennzeichnet, die bei 421 nm zentriert ist. Nach Zugabe der G-Quadruplexe wurde eine deutliche Verschiebung des Maximums sowie eine Abnahme der Absorption beobachtet. In beiden Fällen lag der isosbestische Punkt bei 443 nm. Dies ist ein eindeutiger Hinweis auf die Interaktion von Berberin mit RG-1 in Anwesenheit beider Kationen, sowohl Natrium- als auch Kaliumkationen.

Für eine weitere Charakterisierung der Bindung zwischen den Bindungspartnern wird die Stöchiometrie des gebildeten Komplexes benötigt. Zu der Untersuchung der Stöchiometrie bei der Bildung des Komplexes aus Berberin und dem G-Quadruplex der RNA-Sequenz in Anwesenheit der Natrium- und Kaliumkationen wird daher die Methode der kontinuierlichen Variation, ebenfalls bekannt als Job's Plot, verwendet. Hierfür werden Proben hergestellt, in denen die Gesamtkonzentration der Bindungspartner konstant gehalten wird, aber deren Stoffmengenanteil variiert.<sup>115</sup> Mithilfe der Fluoreszenzspektroskopie wurden die Emissionen der verschiedenen Lösungen bei 25 °C und 1 bar aufgenommen. Die experimentell über UV/Vis - Messungen bestimmte Anregungswellenlänge beträgt 443 nm. Hierbei handelt es sich um den isosbestischen Punkt. An diesem haben das freie Berberin als auch der Komplex denselben Extinktionskoeffizienten. Die Emissionswellenlänge liegt bei 536 nm. Anhand der Fluoreszenzintensitäten kann die Bindung von Berberin an den G-Quadruplex beobachtet werden, da Berberin in wässriger Lösung kaum Licht emittiert, während bei der Bildung des Komplexes eine erhöhte Fluoreszenz zu beobachten ist.<sup>115,116</sup> Die Änderung der Intensitätssteigungen im Job's Plot weist somit auf die Stöchiometrie des Bindungskomplexes hin (vgl. Abb. 4.5).



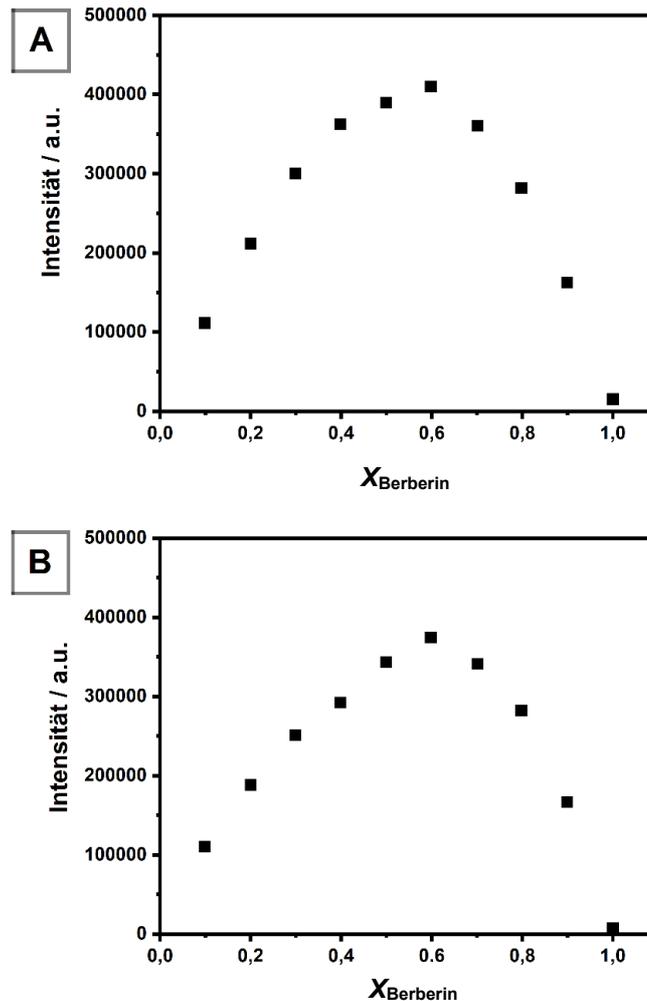


Abb. 4.5: Job's Plot für den Komplex Berberin/RG-1 in A) 100 mM NaCl beziehungsweise B) 100 mM KCl bei  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$  und 1 bar. Die Gesamtkonzentrationen der beiden Komponenten betrug  $60 \text{ } \mu\text{M}$ . Die Anregungswellenlänge war 443 nm und die Fluoreszenzintensität wurde bei der Wellenlänge 536 nm aufgenommen.

Der Wendepunkt der Job'schen Kurven liegt bei  $X_{\text{Berb}} = 0,67$ . Dies deutet daraufhin, dass sich zwei Berberinliganden an den G-Quadruplex binden. Jedoch müsste im Idealfall der Wendepunkt bei einer Stöchiometrie von 2:1 bei  $X_{\text{Berb}} = 0,6$  liegen. Die Form der Kurve hängt auch von der Größe der Bindungskonstante und von der Konzentration der Gesamtliganden ab. Daher wurden Simulationen, die diese beiden Parameter berücksichtigen, durchgeführt und ergaben die Bildung eines Komplexes aus zwei Berberinmolekülen an ein G-Quadruplex. Die Stöchiometrie ist außerdem unabhängig von den verwendeten unterschiedlichen Salzarten.

Bei Kenntnis der Stöchiometrie kann ein geeignetes Bindungsmodell aufgestellt werden, welches die Anzahl der unabhängigen Bindungsstellen und die Anzahl der Liganden an dem bindenden Makromolekül enthält. Dieses Bindungsmodell wird zu der Anpassung der experimentellen Daten für die Ermittlung der Bindungskonstante verwendet. Die Bindungskonstante  $K_b$



### 4.3. Ergebnisse und Diskussion

beschreibt quantitativ die Stärke der Wechselwirkungen der Berberinmoleküle mit dem G-Quadruplex, da es das Verhältnis zwischen der Konzentration des Komplexes und dem Produkt der Konzentrationen der jeweiligen freien Bindungspartner angibt.<sup>113</sup> Zu der experimentellen Bestimmung der Bindungskonstante wurde ein Fluoreszenz-Titrationsexperiment durchgeführt, wobei die Konzentration von Berberin konstant gehalten und die Konzentration an RG-1 variiert wird. Anhand des äquivalenten und unabhängigen Bindungsstellenmodells<sup>117</sup> wird angenommen, dass die beiden Liganden mit gleicher Affinität gebunden werden. In der folgenden Abbildung 4.6 sind die erhaltenen Bindungsisothermen und die daraus resultierenden Werte für die Bindungskonstanten dargestellt.

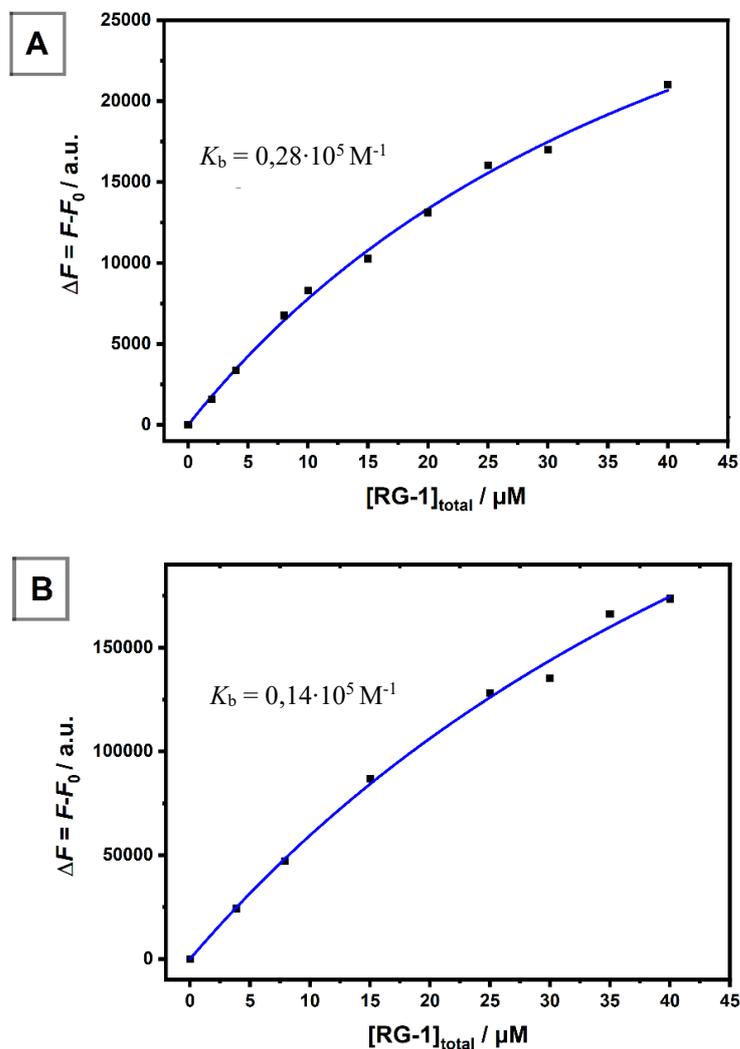


Abb. 4.6: Bindungsisotherme für den Komplex Berberin/RG-1 in A) 100 mM Natriumchlorid beziehungsweise B) Kaliumchlorid bei  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$  und 1 bar. Die blauen Linien stellen die beste Anpassung der experimentellen Daten nach einem äquivalenten und unabhängigen Bindungsstellenmodell mit der Stöchiometrie 2:1 Berberin:RG-1 dar. Die Berberinkonzentration beträgt  $15 \text{ } \mu\text{M}$  und die Konzentration an RG-1 variierte zwischen 0 und  $40 \text{ } \mu\text{M}$ . Die Anregungswellenlänge betrug  $443 \text{ nm}$  und die Emissionswellenlänge  $536 \text{ nm}$ , bei der die Intensität aufgenommen wurde.



Die Bindungskonstanten des Komplexes Berberin/RG-1 fallen im Vergleich zu der Bindung von Berberin an die menschliche telomere Sequenz (22AG) etwas geringer aus und weisen nur eine geringfügige, aber vernachlässigbare, Abhängigkeit von den Salzen Natriumchlorid und Kaliumchlorid auf.

Die Zirkulardichroismus (CD) - Spektroskopie ermittelt die Konformation der Quadruplex-Sequenz RG-1<sup>118,119</sup> sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Berberin in Abhängigkeit der jeweiligen Natrium- und Kaliumkationen (vgl. Abb. 4.7).

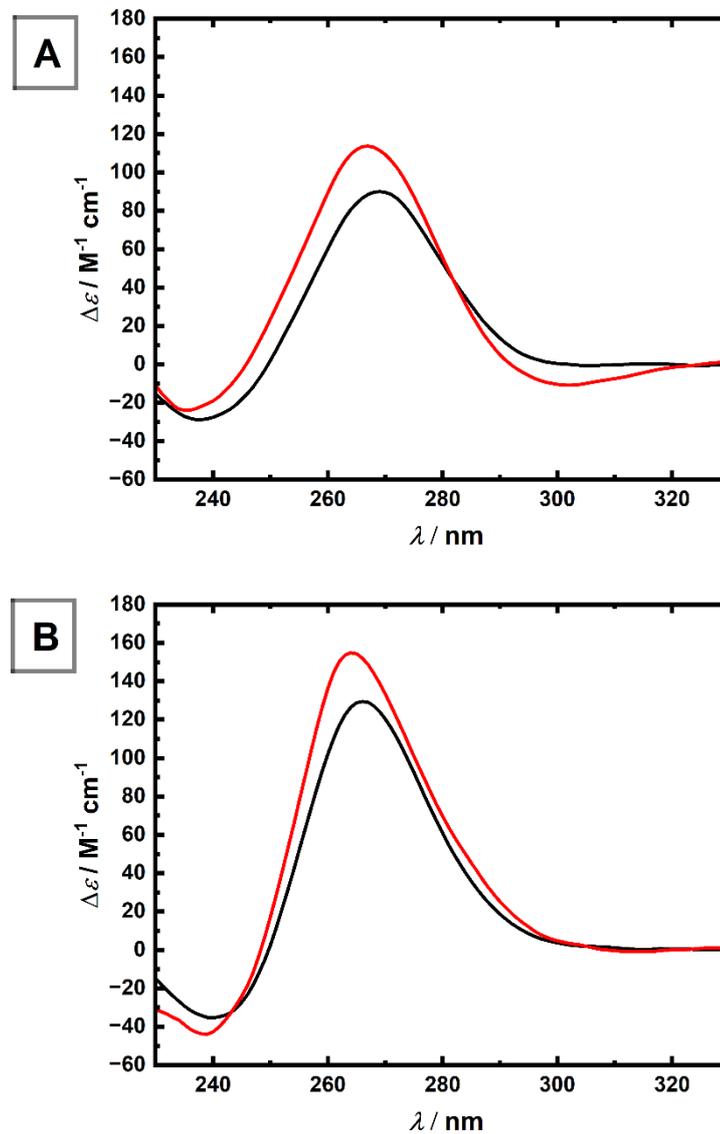


Abb. 4.7: Zirkulardichroismus-Spektren für das RG-1 in A) 100 mM NaCl beziehungsweise in B) KCl in Anwesenheit von Berberin (rot) und in Abwesenheit von Berberin (schwarz) bei  $T = 25\text{ °C}$  und 1 bar.



### 4.3. Ergebnisse und Diskussion

---

Im Natriumkationen-haltigen Puffer hat das Zirkulardichroismus - Spektrum für die RG-1 Sequenz eine intensive positive Bande um 270 nm und eine schwache negative Bande um 240 nm, was auf die Bildung einer parallelen Konformation hinweist. Dies stimmt mit den literaturbekannten Daten überein.<sup>94</sup> In Anwesenheit von Berberin besitzt die gemessene Kurve immer noch die Merkmale einer parallelen Konformation. Jedoch werden kleine, aber signifikante Verschiebungen des Maximums und Minimums beobachtet, sowie eine schwache negative Bande um 300 nm. Dies könnte auf eine lokale Konformationsänderung bei der Bindung von Berberin hindeuten. In Anwesenheit von Kaliumkationen hat das ungebundene RG-1 ebenfalls eine parallele Konformation. Wie im vorherigen Fall verändert sich die Zirkulardichroismus - Kurve des Komplexes nur minimal, was heißt, dass der G-Quadruplex der RG-1 Sequenz in der komplexierten Form in Anwesenheit von Kaliumkationen ebenfalls eine parallele Konformation annimmt. Jedoch können kleine Konformationsänderungen nicht ausgeschlossen werden. Die Zirkulardichroismus – Spektren der Kurven der reinen G-Quadruplexe der RG-1 Sequenz in Anwesenheit der jeweiligen Kationen haben die gleiche Form, jedoch unterscheiden sie sich in ihren Intensitäten. In der Gegenwart von Natriumionen ist die positive Bande weniger intensiv. Daraus kann geschlossen werden, dass die G-Quadruplexe der RG-1 Sequenz nicht vollständig gefaltet vorliegen könnten oder ein Anteil von entfalteten beziehungsweise teilweise entfalteten Konformeren nebeneinander koexistieren, wie dies auch schon in Einzelmolekül-FRET-Experimenten beobachtet wurde.<sup>120</sup> Tatsächlich zeigt das Spektrum der vollständig entfalteten RG-1 Sequenz bei einer Temperatur von 75 °C eine positive Bande um 270 nm, die im Vergleich zu der gleichen Bande bei 25 °C weniger intensiv ausgeprägt ist (vgl. Abb. 7.4; Anhang).



Zu der Untersuchung der volumetrischen Eigenschaften von Komplexbildungen ist ein hilfreiches Mittel die Verwendung von hohem hydrostatischem Druck (HHP).<sup>121</sup> Anhand der Hochdruck-FRET-Methode konnte sichergestellt werden, dass die Struktur der einzelnen Komponenten als auch die des Komplexes druckstabil sind, sodass der Einfluss von hohem hydrostatischem Druck auf die Stärke der Wechselwirkungen zwischen Berberin und der RG-1 Sequenz ermittelt werden kann.

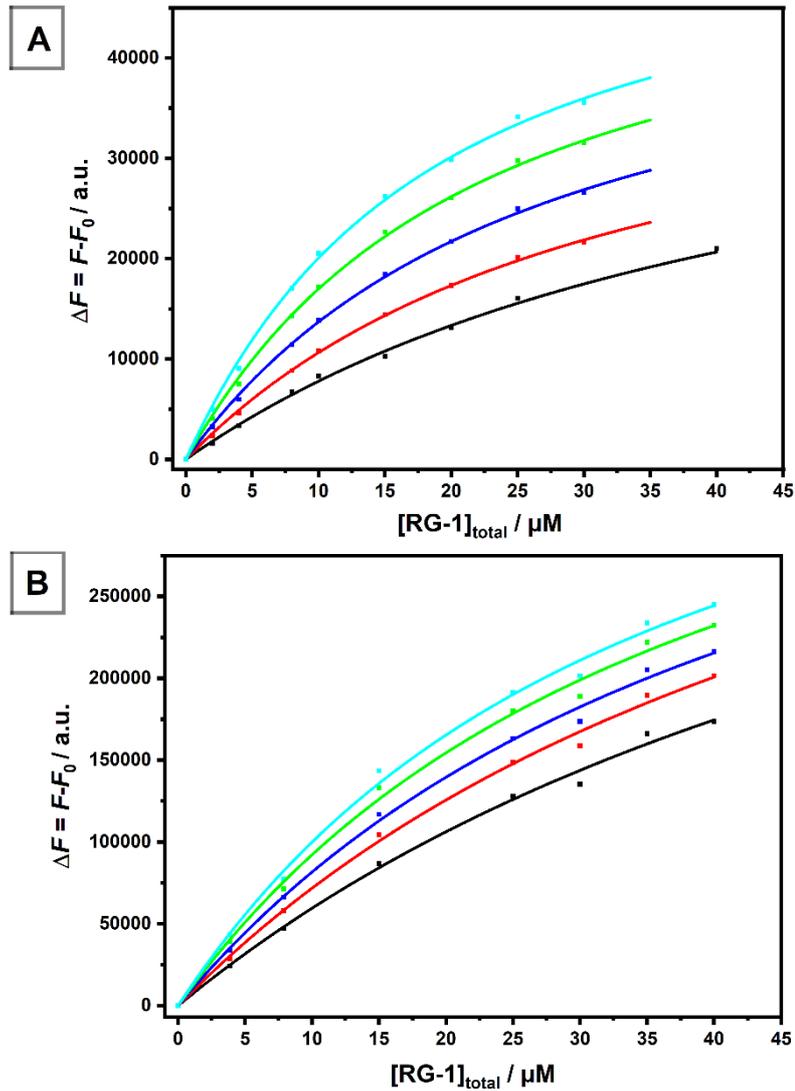


Abb. 4.8: Bindungsisotherme für den Komplex Berberin/RG-1 in A) 100 mM NaCl beziehungsweise B) 100 mM KCl bei  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 1 bar (schwarz), 500 bar (rot), 1000 bar (blau), 1500 bar (grün), und 1900 bar (hellblau). Die Linien stellen die beste Anpassung der experimentellen Daten nach einem äquivalenten und unabhängigen Bindungsstellenmodell mit der Stöchiometrie 2:1 = Berberin:RG-1 dar. Die Berberinkonzentration beträgt  $15\text{ }\mu\text{M}$  und die Konzentration von RG-1 variierte zwischen 0 und  $40\text{ }\mu\text{M}$ . Die Anregungswellenlänge betrug  $443\text{ nm}$  und die Emissionswellenlänge  $536\text{ nm}$ , bei der die Intensität aufgenommen wurde.



### 4.3. Ergebnisse und Diskussion

Tab. 4.1: Bindungskonstanten,  $K_b$  und Stöchiometrien für die Komplexbildung zwischen Berberin und RG-1 für die angegebenen Lösungsbedingungen und bei Drücken von 1, 500, 1000, 1500 und 1900 bar ( $T = 25\text{ °C}$ ).

Natriumchlorid (100 mM)			Kaliumchlorid (100 mM)		
$p / \text{bar}$	$K_b / \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$	Berb:RG1	$p / \text{bar}$	$K_b / \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$	Berb:RG1
1	$0,28 \pm 0,03$	2:1	1	$0,14 \pm 0,03$	2:1
500	$0,38 \pm 0,05$	2:1	500	$0,17 \pm 0,03$	2:1
100	$0,49 \pm 0,06$	2:1	100	$0,23 \pm 0,02$	2:1
1500	$0,63 \pm 0,07$	2:1	1500	$0,31 \pm 0,01$	2:1
1900	$0,77 \pm 0,09$	2:1	1900	$0,40 \pm 0,06$	2:1

Die Anwendung von Druck hat eine starke Auswirkung auf die Komplexbildung von Berberin und dem G-Quadruplex der RG-1 Sequenz (vgl. Abb. 4.8). In Anwesenheit von Natriumkationen erhöhte sich der Wert der Bindungskonstante von  $0,28 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  (1 bar) auf  $0,77 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$  (1900 bar). Mit steigendem Druck erhöht sich die Bindungskonstante des Komplexes von Berberin und dem G-Quadruplex der RG-1 Sequenz ebenfalls in Anwesenheit von Kaliumkationen, jedoch ist der Anstieg schwächer ausgeprägt (vgl. Tab. 4.1). Die Volumenänderung  $\Delta V_r$  durch die Bindungsreaktion kann aus der Druckabhängigkeit von der Bindungskonstante bestimmt werden.<sup>121</sup>

$$\left[ \frac{d \ln(K_b)}{dp} \right]_T = - \frac{\Delta V_r}{RT} \quad (\text{Gl. 4})$$

Die Volumenänderung ist definiert als die partielle molare Volumendifferenz zwischen dem Komplex und der Summe der partiellen molaren Volumina der Bindungspartner. Die Volumenänderung  $\Delta V_r$  umfasst die Volumenänderung für die Bindung, einschließlich Hydratationsänderungen, sowie die Volumenänderung für einen Konformationsübergang. Es wurde der natürliche Logarithmus von  $K_b$  gegen den Druck für die Komplexbildung zwischen Berberin und dem G-Quadruplex der RG-1 Sequenz in Anwesenheit der jeweiligen Kationen aufgetragen (vgl. Abb. 4.9).



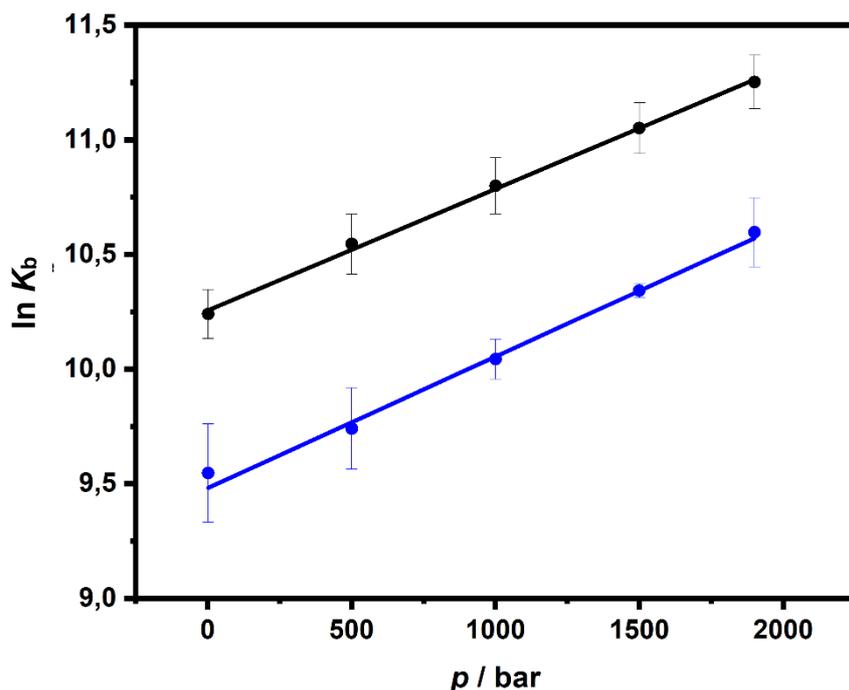


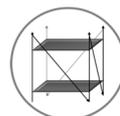
Abb. 4.9: Auftragung des natürlichen Logarithmus von  $K_b$  gegen den Druck für die Komplexbildung zwischen Berberin und RG-1 in Gegenwart von 100 mM NaCl (schwarz) und 100 mM KCl (blau).

Aus der Steigung kann die Volumenänderung ermittelt werden (vgl. Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Reaktionsvolumina  $\Delta V_r$ , welche aus der Steigung der Auftragung des natürlichen Logarithmus von  $K_b$  gegen den Druck für die Komplexbildung zwischen Berberin und RG-1 in Gegenwart von 100 mM NaCl und 100 mM KCl erhalten wurde.

	$\Delta V_r$ (Berb/ RG-1) / mL·mol <sup>-1</sup>
NaCl	-13,1 ± 0,4
KCl	-13,7 ± 0,7

Die Reaktionsvolumina sind alle negativ. Daraus folgt, dass höhere Drücke die Komplexbildung fördern. Nach dem Prinzip von LE CHÂTELIER wird der Zustand, der das kleinstmögliche Volumen einnimmt, mit steigendem Druck begünstigt. Negative  $\Delta V_r$  - Werte zeigen also, dass das partielle Molvolumen des von Berberin und dem G-Quadruplex gebildeten Komplexes kleiner ist als die Summe der partiellen Molvolumina von Berberin und dem G-Quadruplex. Da der ermittelte Wert der Volumenverkleinerung ca. -13 mL·mol<sup>-1</sup> beträgt, kann daraus geschlossen werden, dass die Komplexbildung zu einer Verdichtung der Struktur führt. Eine Freisetzung von Hydratwasser bei der Bindung hätte den entgegengesetzten Effekt.



### 4.3. Ergebnisse und Diskussion

---

Durch den Einsatz verschiedener biophysikalischer Techniken konnte eine vollständige Charakterisierung der Bindungsthermodynamik und der damit verbundenen Konformations- und Hydratationsänderungen bei der Bindung von Berberin an die G-Quadruplexe der RG-1 Sequenz aus der RNA des SARS-CoV-2 erreicht werden. Die Daten wurden anschließend mit den G-Quadruplexen von 22AG (menschliche telomere DNA) verglichen. Die Bindungseigenschaften wurden mittels Fluoreszenz- und Zirkulardichroismus - Spektroskopie untersucht. Darüber hinaus wurden druckabhängige Experimente durchgeführt, um die volumetrischen Eigenschaften bei der Komplexbildung zu entschlüsseln, die Aufschluss über Packungs- und Hydratationsänderungen geben.

Die ermittelten Daten zeigen, dass Berberin mit dem G-Quadruplex der RG-1 Sequenz interagieren kann und dass zwei Berberinmoleküle an dem G-Quadruplex gebunden sind, wobei die RG-1 Sequenz aus der viralen RNA eine parallele Struktur unter beiden Lösungsbedingungen annimmt, sowohl mit Liganden als auch ohne Liganden. Berberin ist ein Molekül, welches aus einem pentazyklischem aromatischem Kohlenwasserstoff mit Heteroatomen besteht.<sup>106</sup> Dadurch wird Berberin zu einem starren Molekül, das in der Lage ist mit Nukleinsäurebasen über  $\pi$ -Stapelwechselwirkungen zu interagieren, beispielsweise mit den Guanin-Ebenen von Quadruplexen.<sup>106</sup> Die vier Sauerstoffatome von Berberin können Wasserstoffbrücken ausbilden. Das Stickstoffatoms N7 des Berberins besitzt eine positive Ladung, sodass es elektrostatische Wechselwirkungen mit den Phosphatgruppen der Nukleinsäuren oder mit dem Sauerstoff der Carbonylgruppe von Guaninen eingehen kann. Bei der parallelen Konformation sind beide Guanin-Ebenen gleichermaßen zugänglich. Somit sind beide denkbaren Bindungsmodi, das heißt ein Berberinmolekül auf jeder Ebene oder zwei Moleküle, die an dieselbe Ebene gebunden sind, möglich.<sup>120</sup>



#### 4.4.Zusammenfassung

Das Berberin ist ein antiviraler Wirkstoff mit breitem Wirkungsspektrum, welches mit den G-Quadruplexen von viralen RNA interagieren kann. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Berberin mit seinem positiv geladenen N7-Atom über  $\pi$ - $\pi$ -Stapelung und möglicherweise auch über eine Kationen- $\pi$ - und Kationen-Einzelpaar-Wechselwirkung (-CO) an der G-Quadruplex-Ebene bindet. Die Daten zeigen, dass das Berberin effizient mit den G-Quadruplexen interagiert und dass in beiden Fällen zwei Berberinmoleküle an ein G-Quadruplex gebunden sind.<sup>104,122</sup> Bei der Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Berberin und dem G-Quadruplex der RG-1 Sequenz stellte sich heraus, dass diese sich von der Wechselwirkung zwischen Berberin und der 22AG Sequenz unterscheiden. Die beiden G-Quadruplex-Strukturen weisen unterschiedliche Topologien auf und die Stärke der Wechselwirkung mit dem G-Quadruplex der menschlichen telomeren DNA hängt von der Ausgangskonformation der Nukleinsäure ab.<sup>106</sup> Dies ist hingegen bei der RG-1 Sequenz der viralen RNA nicht der Fall. Neben den Veränderungen der G-Quadruplexstruktur von 22AG in der Kaliumchloridlösung wurden bei der Bindung von Berberin geringfügige lokale Veränderungen der Konformationsdynamik festgestellt. Im Allgemeinen ist bei der Komplexbildung eine Verdichtung der G-Quadruplex-Struktur zu beobachten und der Anteil der entfalteten beziehungsweise teilweise entfalteten Zustände verschwindet, sofern vorhanden. Die vorliegende Studie ist für die Entwicklung neuer antiviraler Arzneimittel auf der Grundlage der Berberinstruktur von großem Nutzen und wissenschaftlichem Interesse. Die Ergebnisse dienen als Ausgangspunkt für die Entwicklung modifizierter Berberinmoleküle, die mit höherer Selektivität an das G-Quadruplex der RG-1 Sequenz binden können, um gezielte Wirkungsmechanismen erzeugen zu können. Zu diesem Zweck sind weitere Studien, zum Beispiel eine strukturelle Charakterisierung mittels NMR und Molekulardynamiksimulationen mit atomarer Auflösung erforderlich, um den komplexen Bindungsmechanismus im Detail zu entschlüsseln.

Anhand der vorliegenden Arbeit konnten die Erkenntnisse über die Wechselwirkung zwischen Berberin und G-Quadruplexe erweitert werden, welches als Grundlage für weitere Studien dienen könnte. Die vorliegenden Ergebnisse bilden eine fundierte Grundlage für eine weiterführende Arzneimittelforschung, insbesondere für die Bekämpfung von COVID-19, sowie ein tiefer gehendes Verständnis für Wirkungsmechanismen von Medikamenten basierend auf G-Quadruplexen.



4.4. Zusammenfassung

---

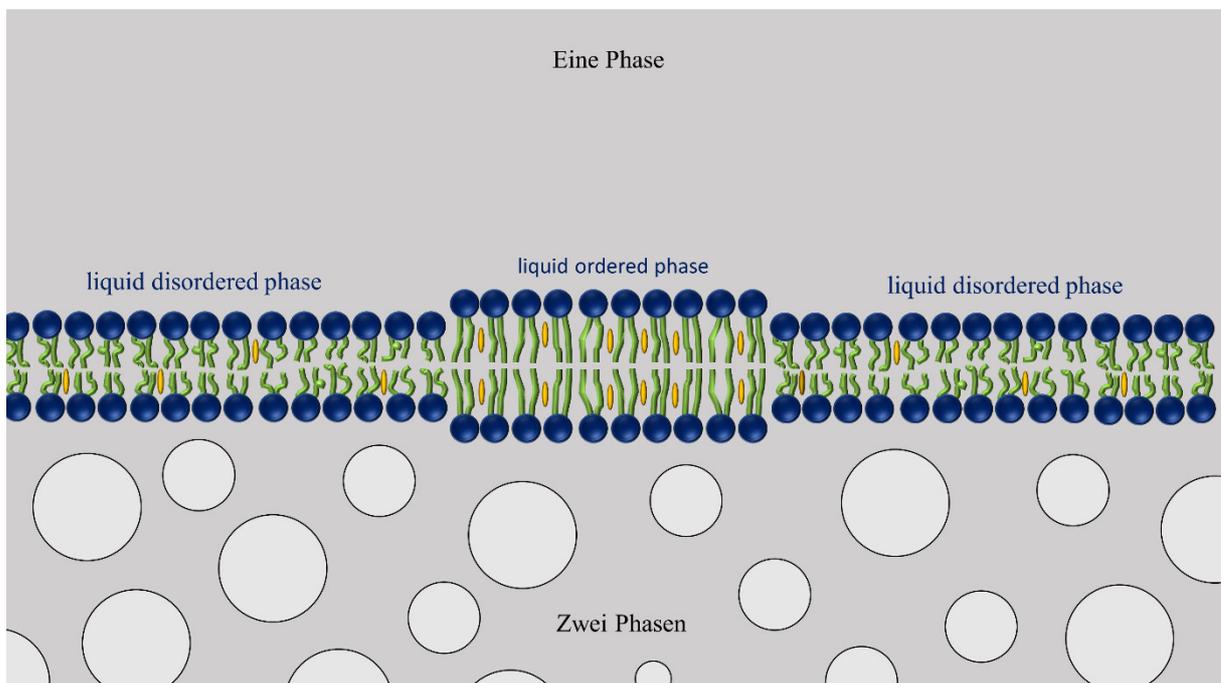


---

## 5. Kapitel: Lipide und Flüssig-Flüssig-Phasentrennung

---

### Wechselwirkung zwischen zwei Phasenkoexistenzen unterschiedlicher biologischer Systeme



---

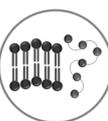


## 5.1. Einleitung

In den vorherigen Abschnitten wurde der Einfluss verschiedener chemisch-physikalischer Parameter auf die einzelnen Lebensbausteine erforscht. In diesem Kapitel soll dagegen die Wechselwirkung zwischen zwei Lebensbausteinen, Lipide und Eiweißbausteine, die beide Phasenkoexistenzgebiete ausbilden können, untersucht werden.

Seit den Arbeiten von *Brangwynne et al.* im Jahre 2009 an P-Granula in *C. elegans* ist die Eigenschaft der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (*liquid-liquid phase separation*, LLPS) von Proteinen und Nukleinsäuren bekannt.<sup>123</sup> Diese Eigenschaft erlaubt die Bildung membranloser Organellen im Zellinneren, welches den Zellen die Möglichkeit bietet, Proteine und RNA zu konzentrieren und somit räumlich getrennte biochemische Reaktionsbereiche zu regulieren, wo Prozesse beispielsweise der Transkription, Signaltransduktion und Enzymreaktionen innerhalb einer Zelle parallel ablaufen können.<sup>124–126</sup> Diese neue Forschungsdisziplin besitzt große Bedeutung für die Zellbiologie und Pathobiochemie. Ein Aspekt dieser Forschung ist die Wechselwirkung der Phasen der heterogenen Lipiddoppelmembran mit den beiden Phasen, die aus der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Proteinen (und Nukleinsäuren) hervorgehen. Die Phasenkoexistenz einer Lipiddoppelmembran wurde im Kapitel 3 beschrieben, daher wird hier erstmal das Phänomen der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Proteinen, die eine weitere zelluläre Kompartimentierung darstellt, erläutert.

Um ein erstes Bild eines Flüssig-Flüssig-Phasentrennung zu erhalten, können Öltröpfchen in Wasser betrachtet werden - die Entmischung einer homogenen Lösung in zwei flüssige Phasen. Dies verschafft jedoch nur eine Vorstellung von diesem Phänomen, aber liefert kein vollständiges Bild. Bei der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung von Proteinen, wie zum Beispiel  $\alpha$ -Synuclein, Tau und TDP-43, handelt es sich um eine assoziative Phasentrennung (vgl. Abb. 5.1). Bei einer assoziativen Phasentrennung reichern sich zwei gelöste Komponenten aufgrund starker Wechselwirkungen, wie zum Beispiel COULOMB-Wechselwirkungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen in einer Phase, der sogenannten dichten Phase an. Die andere Phase wird als verdünnte Phase bezeichnet, da der Anteil beider Komponenten sehr gering ist im Vergleich zu der dichten Phase. Für die assoziative Form sind zwei Komponenten nicht zwingend notwendig. Eine einzig gelöste Substanz kann durch Selbstassoziation ebenfalls eine dichte Tröpfchenphase bilden.<sup>127,128</sup>



## 5.1. Einleitung

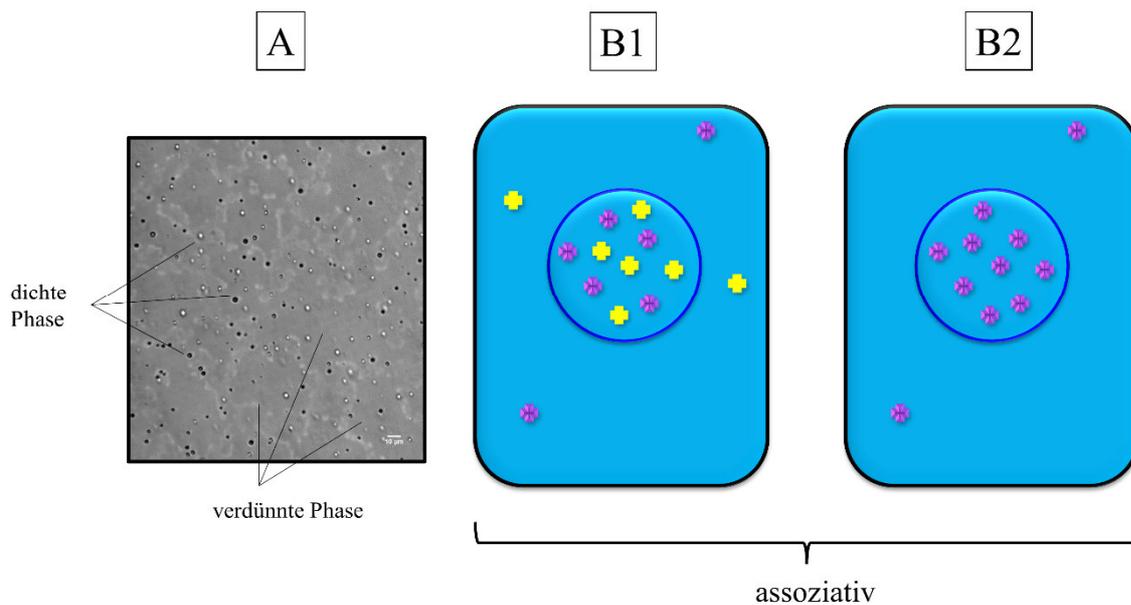
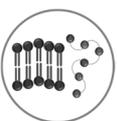


Abb. 5.1: Assoziative Flüssig-Flüssig-Phasentrennung dargestellt A) anhand einer mikroskopische Aufnahme beider Phasen von einem Protein B) anhand eines Schemas, wobei 1) beide Komponenten beziehungsweise 2) eine einzig gelöste Komponente, die durch Assoziation in der Lage sind, eine dichte Tröpfchenphase auszubilden. Aus <sup>[129]</sup> dargestellt und modifiziert.

Bei der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung bilden sich sphärische nano- bis mikrometergroße Tröpfchen aus, die unter dem Mikroskop untersucht werden können (vgl. Abb. 5.1). Die Tröpfchen stellen einer der Phasen dar und werden auch Kondensate genannt. Die Entmischung in zwei Phasen ist abhängig von verschiedenen Parametern, wie der Konzentration der verschiedenen Komponenten, der Temperatur, dem pH-Wert, den Cosolventien, dem Druck und der Ionenstärke. Die Tröpfchen sind flüssigkeitsähnliche Kondensate, welche die Merkmale von Fluiden wie zum Beispiel Deformation bei Einfluss von Scherkräften, Benetzung der Oberfläche und Ausbildung einer sphärischen Form aufgrund von Oberflächenspannung besitzen. Es sind einige Fälle bekannt, wo auch ein Flüssig-Fest Übergang stattfindet und die flüssigkeitsähnlichen Kondensate zuerst gelähnliche und dann feste Proteinstrukturen wie Fibrillen aufweisen. Diese veränderte Materialeigenschaft der Tröpfchen wird mit verschiedenen Krankheiten wie neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindungen gebracht, wodurch bislang unerkannte Mechanismen, die für diese Krankheitsverläufe verantwortlich sind, ermittelt werden konnten. Bei der Veränderung der Materialeigenschaft bilden sich aus den Tröpfchen Fibrillen oder amorphe Aggregate, auch als Amyloide bekannt, welche ein Hauptmerkmal von neurodegenerativen Erkrankungen sind. Entsprechende Proteine, welche diese Eigenschaften der assoziativen Flüssig-Flüssig-Phasentrennung besitzen, sind als Ursache folgender Krankheiten aufgeführt: TDP-43 für amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Tau für die Alzheimer-Krankheit und



$\alpha$ -Synuclein für die Parkinson-Krankheit. Die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung wird auch als Zwischenstufe zwischen der monomeren und aggregierten Proteinform diskutiert, da die Vermutung besteht, dass aufgrund der hohen lokalen Proteinkonzentration in den Tröpfchen die Proteinaggregation gefördert wird.<sup>130–136</sup>

Jedoch wird in einigen Fällen die Entstehung von Fibrillen auch in Abwesenheit einer Flüssig-Flüssig-Phasentrennung beobachtet. Um ein umfassendes Verständnis über die Wechselwirkung zwischen dem Zwischenzustand der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung und der aggregierten Fibrillenbildung zu erlangen, wurden Studien mit einem Modellsystem durchgeführt.<sup>137</sup>

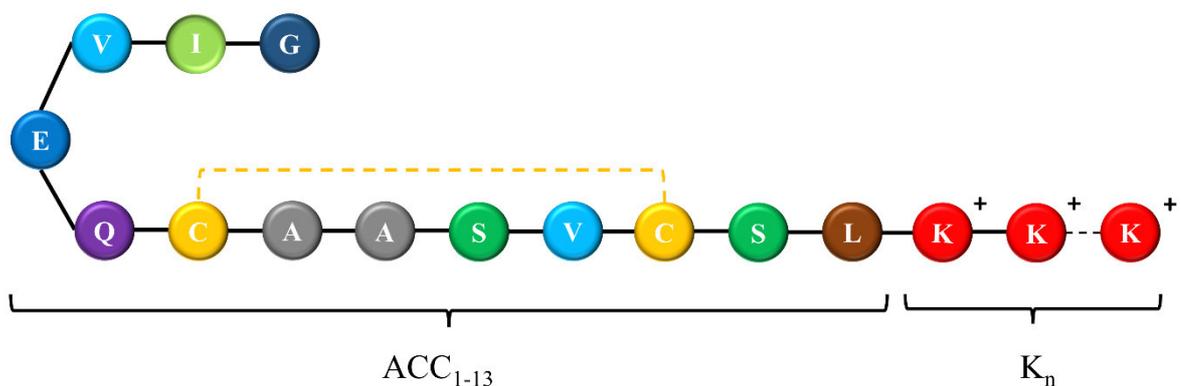


Abb. 5.2: Schematische Darstellung des Peptids ACC<sub>1-13</sub>K<sub>n</sub>, welches aus dem Fragment der A-Kette des Insulins (ACC<sub>1-13</sub>) und dem Oligolysin Segment (K<sub>n</sub>) mit unterschiedlicher Kettenlänge ( $n = 8, 16, 24, 32$  und  $40$ ) besteht. Das Fragment der A-Kette besteht aus 13 Aminosäuren; G = Glycin, I = Isoleucin, V = Valin, E = Glutaminsäure, Q = Glutamin, C = Cystein, A = Alanin, S = Serin und L = Leucin.<sup>137</sup>

Bei diesem Modellsystem handelt es sich um das chimäre Peptid ACC<sub>1-13</sub>K<sub>n</sub>, welches aus dem Amyloide-bildenden Fragment der A-Kette des Insulin und dem Oligolysin Segment mit unterschiedlicher Länge sowie Adenosintriphosphat ATP besteht. In der Literatur ist bekannt, dass die Mischung aus Polylysin und ATP die Eigenschaft der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung aufgrund der COULUMB-Wechselwirkungen besitzt.<sup>138,139</sup> *Dec et al.* stellten fest, dass ACC<sub>1-13</sub>K<sub>8</sub> und ACC<sub>1-13</sub>K<sub>16</sub> Fibrillen ausbilden können ohne dass eine Flüssig-Flüssig-Phasentrennung vorliegen muss. Jedoch kann bei dem Zusammenmischen von den Peptiden mit längeren Lysinsegmenten ( $n = 24, 32, 40$ ) und ATP eine Flüssig-Flüssig-Phasentrennung induziert werden und mit der Zeit bilden sich daraus amyloide Fibrillen, wobei die Tröpfchen verschwinden.<sup>137</sup>

Es wurde das Verhalten von Flüssig-Flüssig-Phasentrennung der verschiedenen Proteine hinsichtlich unterschiedlicher Parameter wie die Konzentration, Temperatur und Druck untersucht,



## 5.1. Einleitung

um das Verständnis verschiedener biologischer Prozesse innerhalb der Zelle zu ermitteln. Biomolekulare Kondensate sollen auch an der Membranfunktion beteiligt sein und die Einsicht über Wechselwirkungen zwischen den biomolekularen Kondensaten und der Zellmembran könnte ein weiterer Schritt für die Erforschung membranassoziierter zellulärer Mechanismen und der Entstehung von Krankheiten und somit zur Entwicklung von entsprechenden Therapeutika sein.<sup>140</sup> In dem ersten Teil des Kapitels werden daher die Eigenschaften des Peptids ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> und ATP in Anwesenheit von Vesikeln des zwitterionischen Dreikomponentensystems und des anionischen Fünfkomentensystems untersucht, um die gegenseitigen Wechselwirkungen beider Phasenkoexistenzen nachzuvollziehen.

Da die Kompartimentierung durch membranlose Organellen innerhalb einer Zelle stattfindet, kommt die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung umschlossen von einer Lipiddoppelschicht in der Zellbiologie vor. Um dies nachzumodellieren, wird hauptsächlich ein wässriges Zwei-Phasen-System (*Aqueous Two Phase System, ATPS*) verwendet. Dieses System besteht entweder aus zwei Polymeren oder einem Polymer und einem Salz.<sup>141,142</sup> Bei dieser Flüssig-Flüssig-Phasentrennung handelt es sich um eine segregative Phasentrennung (vgl. Abb. 5.3).

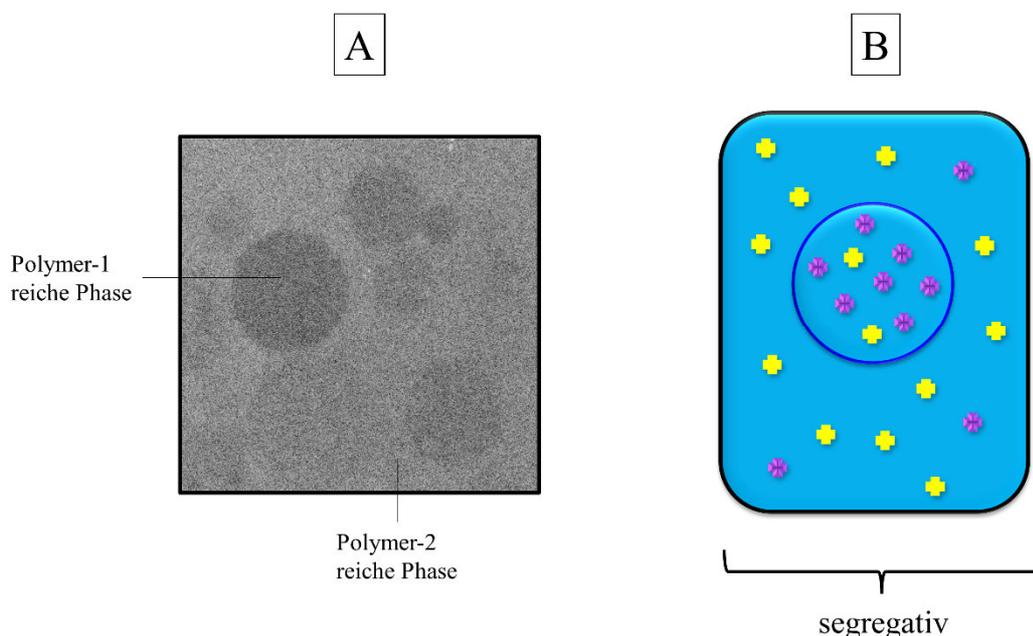
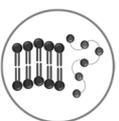


Abb. 5.3: Segregative Flüssig-Flüssig-Phasentrennung dargestellt A) anhand einer mikroskopische Aufnahme beider Phasen und B) einem Schema mit zwei Phasen, in denen jeweils einer der beiden Komponenten (lila/ gelb) dominiert. Aus <sup>[129]</sup> dargestellt und modifiziert.



In der segregativen Phasentrennung sind erstmal beide Komponenten in einem Lösungsmittel zu einer homogenen Lösung vermischt. Im Falle einer Entmischung reichert sich eine Komponente in Phase eins und die andere Komponente in Phase zwei an. Im Gegensatz zu dem Öl-Wasser-Beispiel befindet sich in diesem System eine dritte Komponente, die in beiden Phasen vorhanden ist. Wie bei der assoziativen Phasentrennung bilden sich bei der Entmischung Tröpfchen aus. Diese Tröpfchen streuen Licht, wodurch eine Trübung der Lösung beobachtet werden kann. Mit der Zeit vergrößern sich die Tröpfchen durch Fusion oder Ostwald-Reifung zu größeren Tropfen und diese sedimentieren mit der Zeit, wodurch letztlich eine makroskopische Phasentrennung beobachtet werden kann.<sup>127,128,143</sup>

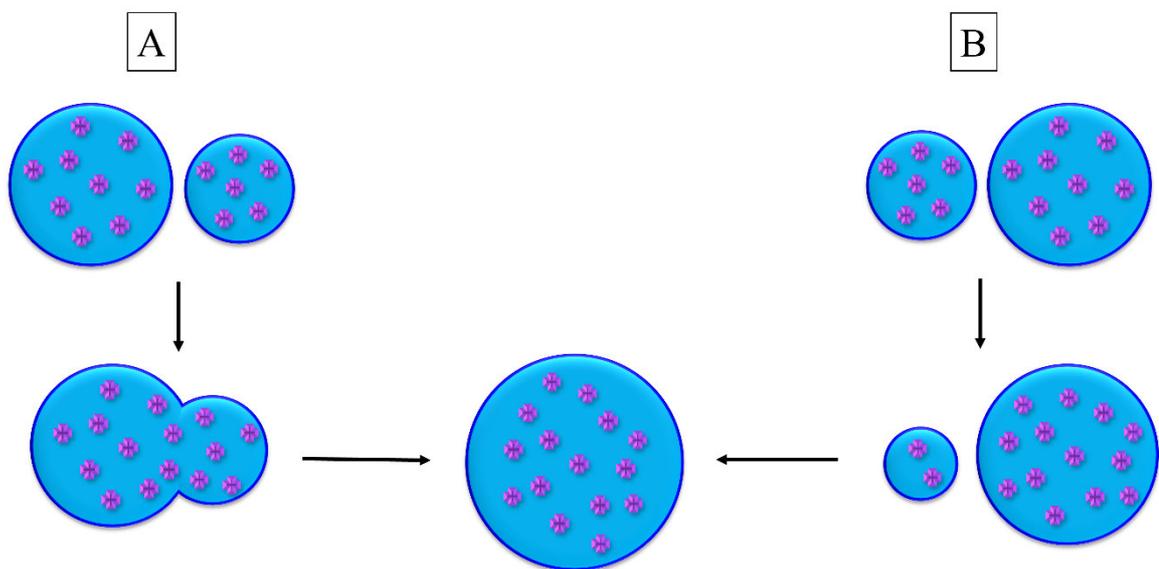


Abb. 5.4: Schematische Darstellung der beiden Prozesse zum Tröpfchenwachstum. A) Bei der Fusion bilden zwei Tröpfchen über eine Zwischenform ein größeres sphärisches Tröpfchen. B) Bei der Ostwald-Reifung findet ein Materialaustausch zwischen zwei Tröpfchen statt, wobei ein Tröpfchen wächst und das andere kleiner wird. Das Resultat ist ein größeres Tröpfchen wie bei der Fusion. Aus <sup>[144]</sup> dargestellt und modifiziert.

Eines der bekannten wässrigen Zwei-Phasen-Systeme besteht aus Polyethylenglykol (PEG) und Dextran. Die temperaturabhängige segregative Phasentrennung ist abhängig von dem Molekulargewicht und der Konzentration der Polymere. Zur Erstellung des Phasendiagramms wird bei konstanter Temperatur die Trübungstitrationsmethode durchgeführt, wobei Lösungen mit verschiedenen Gewichtskonzentrationen an Dextran mit einem festgelegten Molekulargewicht angesetzt wurden und eine Lösung mit einer konstanten Gewichtskonzentration von PEG mit bekanntem Molekulargewicht hinzu titriert wird, bis eine Trübung auftritt und dadurch die



## 5.1. Einleitung

Gewichtskonzentrationen der jeweiligen Komponenten am Punkt der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung ermittelt werden können.<sup>145–148</sup>

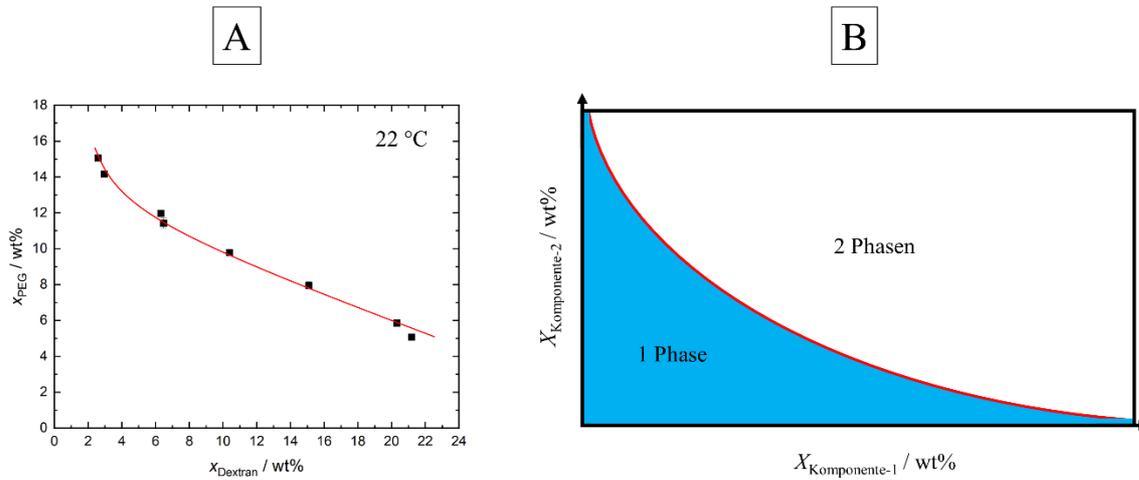
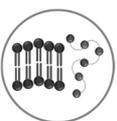


Abb. 5.5: A) Schematische Darstellung eines Phasendiagrammes eines wässrigen Zwei-Phasen-Systems und B) Phasendiagramm des PEG-Dextran-Systems, bei denen die Gewichtskonzentrationen beider Komponenten gegeneinander aufgetragen sind. Die Binodale (rote Kurve) trennt das Diagramm in zwei Bereiche. Oberhalb der Kurve befindet sich das wässrige Zwei-Komponenten-System im zweiphasigen Zustand, unterhalb im einphasigen Zustand. Aus <sup>[141]</sup> dargestellt und modifiziert.

Aus der Auftragung der jeweiligen Polymerkonzentrationen lässt sich das Phasendiagramm der Polymermischung ermitteln. Die Kurve aus den erfassten Punkten, bezeichnet als Binodale, trennt das Phasendiagramm in zwei Bereiche, die jeweils abhängig von den Komponentenkonzentrationen ist. Unterhalb der Kurve befindet sich das System in einer homogenen Phase und oberhalb der Kurve besteht das System aus zwei entmischten Phasen.<sup>141</sup>

Zur Verkapselung des wässrigen Zwei-Phasen-Systems, bestehend aus PEG und Dextran, in Lipiddoppelschichten wurden zwitterionische Modellmembransysteme als Zellmembranen verwendet. Die Membransysteme enthielten außerdem PEGylierte Lipide, wodurch die Wechselwirkung der Lipide mit der PEG-Dextran Mischungen beeinflusst wurden ist.<sup>149,150</sup> Im zweiten Teil dieses Kapitels wird die Wechselwirkung zwischen der anionischen Fünfkomponenten-Modellmembran ohne PEGylierte Lipide und der eingekapselten PEG-Dextran Mischung beschrieben.



## 5.2. Material und Methoden

### 5.2.1. Material (Lipide und Peptid ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> & ATP)

Das Peptid ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> wurde von Pepscan [Lelystad, NL] kundenspezifisch synthetisiert und von dem Hersteller als Trifluoressigsäuresalz geliefert. Die Aminosäuresequenz des Peptids wurde durch die Verlängerung der ersten 13-N-terminalen Reste der A-Kette des Rinderinsulins am C-Ende mit dem Segment von 32 Lysin-Resten erhalten. Das Peptid ( $c = 3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) wurde in bidestilliertem Wasser gelöst und mit  $20 \mu\text{M}$  Thioflavin T (ThT) [Sigma-Aldrich, Steinheim, DE] versetzt. Die frische Adenosintriphosphat [Sigma-Aldrich, Steinheim, DE] - Stocklösung ( $c = 5,8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) wurde ebenfalls mit bidestilliertem Wasser angesetzt und auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt.

Zur Untersuchung wurde ein Dreikomponentensystem aus 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC), 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC) und Cholesterol im Verhältnis von 1:2:1 mol% und ein Fünfkomponentensystem aus DPPC, DOPC, Cholesterol, 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (DOPG) und 1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'*rac*glycerol) (DPPG) im Verhältnis von 45:20:25:5:5 mol% verwendet. Die Lipide wurden von Avanti Polar Lipids [Alabaster; USA] bezogen.

Die Systeme wurden als kleine unilamellare Vesikel (SUV) mit einem Durchmesser von 100 nm und als riesige unilamellare Vesikel (GUV) für die Fluoreszenzmikroskopie (FM) eingesetzt.

Zur Herstellung der kleinen unilamellaren Vesikel wurden die benötigten Volumina aus den jeweiligen  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  Stammlösungen, bestehend aus den Lipiden bzw. Cholesterol gelöst in Chloroform, entnommen, um eine Gesamtlipidmasse von 2 mg zu erhalten. Nach der Entnahme wurde das Chloroform mit einem Gasstrom bestehend aus Druckluft verdampft und der entstandene Lipidfilm im Lyophilisator über Nacht getrocknet. Danach wurden zu den Lipidfilmen 1 mL bidestilliertes Wasser dazugegeben. Nach dem Ablösen des Films von der Gefäßwand wurden die Systeme für 15 Minuten bei  $65 \text{ }^\circ\text{C} - 70 \text{ }^\circ\text{C}$  im Ultraschallbad gelöst und im Anschluss fünf Mal der Tau- und Einfrierzyklus durchgeführt. Dieser besteht aus dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff und dem Wiederauftauen in einem  $65 \text{ }^\circ\text{C} - 70 \text{ }^\circ\text{C}$  heißen Wasserbad. Nach dem Tau- und Einfrierzyklus wurde die Lösung mittels 21-facher Extrusion durch einen 100 nm Porengröße aufweisenden Nucleopore® Polycarbonatfilter Track-Etch™ [Whatman GmbH, Dassel, DE] extrudiert.



## 5.2. Material und Methoden

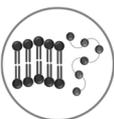
---

Zur Herstellung von riesigen unilamellaren Vesikeln des Dreikomponentensystems sowie dem Fünfkomponentensystem wurde eine 100  $\mu\text{L}$  Lösung mit einer Gesamtlipidkonzentration von 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  angesetzt. Zu diesen Lösungen wurde 0,1 mol% *N*-(Lissamin Rhodamin B sulfonyl)-1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin (*N*-Rhodamine(Rh)-DHPE) [Invitrogen, California, USA] hinzugegeben. Die Vesikel wurden nach der PVA(Polyvinylalkohol)-Methode<sup>17,69</sup> angesetzt, welche im Kapitel 3 beschrieben wurde. Der Prozess der Herstellung erfolgte in bidestilliertem Wasser für 45 Minuten bei einer Temperatur von 50 °C für das Dreikomponentensystem und von 70 °C für das Fünfkomponentensystem.

### 5.2.2. Material (Lipide und PEG & Dextran)

Zur Untersuchung wurden die Vesikelmodelle wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, verwendet. Zusätzlich zu dem *N*-Rhodamine(Rh)-DHPE wurde 0,1 mol% vom Fluorophor NBD-DHPE [Invitrogen, Carlsbad, US] in die angesetzte Lipidlösung zur GUV-Herstellung hinzugefügt. Das PEG 4.6 kDa [Sigma-Aldrich, Steinheim, DE] und das Dextran 10 kDa [Sigma-Aldrich, Steinheim, DE] wurden jeweils bei einer Gewichtskonzentration von 12 wt% und von 6 wt% in dem 5 mM HEPES [Sigma-Aldrich, Steinheim, DE] – Puffer gelöst. Zu der 2 mL PEG/Dextran Mischung wurden 2,5  $\mu\text{L}$  Dextran-Alexa647 [Invitrogen, Carlsbad, US] Lösung ( $c = 2 \text{ mg}\cdot\text{mL}$ ) hinzugegeben.

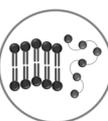
Zur Herstellung der GUVs wurde die Methode der Elektroformation verwendet. Dafür wurden 20  $\mu\text{L}$  der Lipidlösung auf ein 22x22 mm elektrisch leitfähiges Indiumzinnoxid-beschichtetes Deckglas [West Chester; US] bei 800  $\text{U min}^{-1}$  gespreitet. Eine zweistündige Gefriertrocknung unter Vakuum soll eine komplette Lösungsmittelentfernung garantieren. Danach wurde auf dem lipidbeschichteten Deckglas sowie auf einem reinem Indiumzinnoxid-beschichtetem Deckglas eine selbstklebende Kupferfolie ET 11813 [3M<sup>TM</sup>, Neuss, DE] geklebt. Die verwendete Probekammer RC-21B [Warner Instruments, Hamden, US] wurde von unten durch das lipidbeschichtete und von oben durch das reine Deckglas verschlossen. Das Abdichten der Kammer erfolgte mit dem Vakuumfett Korasilon Paste M-S 2-270 [Kurt Obermeier, Bad Berleburg-Raumland, DE]. Daraufhin wurde die Probekammer mit der aufgesetzten Durchfluss-Temperierzelle auf der Plattform P-2 [Warner Instruments, Hamden, US] befestigt. Mittels der seitlich eingeführten Polyethylenschläuche PE-16 [Warner Instruments, Hamden, US] in die vorgesehenen Öffnungen wurde die Probekammer mit der PEG/ Dextran Lösung, welche auf 70 °C temperiert war, befüllt, nachdem die Temperierzelle an das externe, auf 70 °C temperierte,



Wasserbad angeschlossen wurde. Nach der Befüllung wurden die Schlauchenden mit Vakuumfett verschlossen. Mit Hilfe des Funktionsgenerators TG315 [Thurlby Thandar Instruments, Huntingdon; UK] wurde über die Kupferfolien eine sinusförmige Wechselspannung angelegt und das Programm *High Frequency* durchgeführt. Dieses beinhaltet, dass bei konstanter Frequenz von 500 Hz erst eine Spannung von 0,14 V für 5 Minuten, dann von 1,25 V für 20 Minuten und am Ende 3,5 V für 90 Minuten angelegt wurde. Nach Beendigung der Elektroformation wurde die Probe langsam abgekühlt und danach mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

### 5.2.3. Fluoreszenzmikroskopie (FM)

Die Lichtmikroskopie Messungen zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Vesikeln, Peptid ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> und ATP wurden mit dem inversen Mikroskop des Modells Eclipse TE2000-U [Nikon, Tokio, JPN] und dem Objektiv des Typs Plan Fluor 20x Objektiv; NA 0,45; WD 7,4 [Nikon, Tokio, JPN] durchgeführt. Für die Aufnahmen wurde die Monochrom-Industriekamera DMK 33 UX 264 [The Imaging Source, Bremen, DE] verwendet. Um die Thioflavin T Fluoreszenz aufzuzeichnen, wurde das X-Lite<sup>TM</sup>-120 Fluoreszenz Illumination System EXFO mit Anregungsfilter verwendet. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop Biorad MRC 1024 [Zeiss, Oberkochen, DE] gekoppelt mit dem invertierten Nikon Eclipse TE-300 Mikroskop [Nikon, Tokio, JPN] und dem Objektiv des Typs CFI Plan Apo Lambda 100x Oil; NA 1,45; WD 0,13 mm [Nikon, Tokio, JPN] aufgenommen. Bei der Untersuchung mit der CCD Kamera Andor iXon Ultra [Acal BFi, Dietzenbach, DE] wurde der Quecksilberlampe dem Mikroskop ein Anregungsfilter mit der Wellenlänge 560 nm zur Anregung nachgeschaltet. Mit dem Programm *NIS Elements BRV.4.50.00* [Nikon, Tokio, DE] wurden die Aufnahmen erstellt, die danach mit dem Programm *ImageJ* bearbeitet wurden. Für alle Systeme wurden Messungen an verschiedenen Stellen jeder einzelnen Probe durchgeführt. Außerdem wurden separat voneinander präparierte Proben untersucht. Die Proben wurden immer frisch angesetzt und in einer Mikroskopiezelle gefüllt. Die Messzelle bestand aus einem Teflonblock, welcher eine Länge von 42 mm, eine Breite von 22 mm und eine Höhe von 2,9 mm besaß, und zwei Borosilikat-Deckgläschen, mit einer Länge von 22 mm, einer Breite von 22 mm und einer Dicke von 0,17 mm. In der Mitte des Teflonsblock befand sich eine runde Vertiefung, welche 15 mm breit und 2,9 mm tief war und beidseitig von den Deckgläschen umschlossen wurde. Somit diente der Teflonblock als Abstandshalter, um zwischen den Deckgläser die Probenlösung zu setzen.

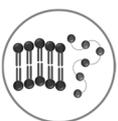


## 5.2. Material und Methoden

---

Die Probenlösung setzte sich aus den Lipidvesikeln, dem Peptid ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub>, ATP und dem Lösungsmittel bidestilliertem Wasser zusammen. Bei der Untersuchung mit den kleinen unilamellaren Vesikeln betrug das Probenvolumen 40  $\mu\text{L}$  und bei den riesigen unilamellaren Vesikeln 450  $\mu\text{L}$ . Die Konzentrationen der jeweiligen Bestandteile waren 0,5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  Lipidlösung unter der Annahme, dass bei der Vesikelformation der gesamte Lipidfilm beteiligt gewesen war. Die Peptidkonzentration betrug 0,08  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  und die der ATP Lösung 0,3  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Bei der Untersuchung der verkapselten GUVs mit der PEG/Dextran Mischung wurde das konfokalen Laser Scanning Mikroskop Biorad MRC 1024 [Zeiss, Oberkochen, DE] mit dem invertierten Nikon Eclipse TE-300 Mikroskop [Nikon, Tokio, JPN] gekoppelt und das Objektiv des Typs CFI Plan Apo Lambda 100x Oil; NA 1,45; WD 0,13 mm [Nikon, Tokio, JPN] verwendet. Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei den Wellenlängen von 488 (NBD-DHPE), 561(Rh-DHPE) sowie 648 nm (Dextran-Alexa647) durch einen kombinierten L4Cc-CSB-130 Laser [Oxxius Simply Light, Lannion, FRA], wobei die Aufnahmen mithilfe der Software *LaserSharp2000* [Zeiss, Oberkochen, DE] erfolgten.



### 5.3. Ergebnisse und Diskussion

Um erste Erkenntnisse über die Wechselwirkung der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung des Peptids ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> und ATP mit Modellbiomembranen zu erhalten, wurden kleine unilamellare Vesikel (SUV) mit diesem System vermischt. In der folgenden Abbildung Abb. 5.6 wird die Referenzmessung (ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> und ATP) in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Nach dem Zusammenmischen kann die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung unmittelbar beobachtet werden. Mit der Zeit verringerten sich die Tropfenanzahl und nach einer Stunde konnten vereinzelt fluoreszierende Aggregate beobachtet werden. Das Thioflavin diente hier als Amyloid-Marker. Nach 22 Stunden waren die kreisrunden Aggregate gewachsen und um diese Aggregate herum konnten Fibrillen ähnliche Strukturen entdeckt werden.

Für die weiteren Proben wurden zuerst die kleinen unilamellaren Vesikel, dann das ATP und zuletzt das Peptid ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> dazugegeben. Analog zu der Referenzmessung konnten bei der Mischung mit den Dreikomponentensystem-Vesikeln direkt die Tröpfchenbildung beobachtet werden, die mit der Zeit in der *Bulk*-phase geringer wurden, da sie durch Fusion bzw. Ostwald-Reifung größer wurden und auf den Deckenglas sedimentierten. Die Aufnahme nach einer Stunde zeigte die Anwesenheit von Tröpfchen und akkumulierten Tropfen am deutlichsten. Nach einem Tag konnten analog zu der Referenzmessung kreisförmige fluoreszierende Aggregate mit dem Mikroskop entdeckt werden. Jedoch sind in diesem Fall die Aggregate von weiteren nicht-fluoreszierenden Aggregaten umgeben (vgl. Abb. 5.7). Bei der Vermischung der Dreikomponenten-Vesikel zum einen nur mit dem Peptid und zum anderen nur mit ATP bilden sich im Laufe der Zeit Aggregate, die nach einem Tag sehr gut untersucht werden konnten. Diese Aggregate waren nicht fluoreszierend und ähnelten von der Form her den Aggregaten, die bei der Vermischung von allen drei Komponenten (3KS-SUV, ATP, ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub>) neben den Amyloidfibrillen entdeckt wurden (vgl. Abb. 5.9; A und B).

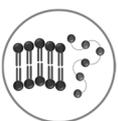
Bei den kleinen unilamellaren Vesikeln des Fünfkomentensystems, ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> und ATP wurden ebenfalls direkt Tröpfchen beobachtet, die sich mit der Zeit vermehrten und nach 22 Stunden sowohl fluoreszierende Aggregate als auch nicht fluoreszierende Aggregate bildeten. Statt kreisrunde Aggregate wie bei den vorherigen Systemen wurde in diesem Fall eine veränderte Form der Aggregate beobachtet, welche nun fusionierten (vgl. Abb. 5.8). Bei weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass die unilamellaren Vesikel des Fünfkomentensystems mit den Peptiden zwar Aggregate ausbilden, aber mit dem ATP keine Wechselwirkung eingehen (vgl. Abb. 5.9; C und D).



### 5.3. Ergebnisse und Diskussion

---

Letztlich kann geschlussfolgert werden, dass in der Lösung mit allen drei Reaktionspartnern die Ausbildung von Amyloidstrukturen verzögert stattfindet, da nach einer Stunde in Membran-Peptid Mischungen im Vergleich zu der Referenzmessung keine fluoreszierende Aggregate zu beobachten sind. Die Verzögerung lässt sich dadurch begründen, dass die Wechselwirkung zwischen dem Peptid und ATP gestört wird. Jedoch könnte die Ursache der Störung sich zwischen den beiden Lipidsystemen unterscheiden. Bei den Dreikomponentensystem-Vesikel könnte der Grund z.B. in der Wechselwirkung zwischen ATP und der Cholinkopfgruppe der Lipide und bei den anionischen Fünfkomentensystem-Vesikeln in der Wechselwirkung zwischen den kationischen Peptid und der negativen Ladung der PG-Lipidmoleküle liegen. *Garcia et al.* ermittelten anhand von Molekulardynamik Simulationen, dass ATP mit zwitterionischen Lipidmembranen wechselwirken kann, da es amphiphile Eigenschaften besitzt.<sup>151</sup> Somit stehen weniger ATP-Moleküle zur Verfügung, um mit ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> intermolekulare Wechselwirkungen einzugehen. Die Wechselwirkung des anionischen 5KS-Lipidsystems mit dem negativ geladenem ATP ist geringer, favorisiert dagegen die Wechselwirkung mit dem positiv geladenem Peptid ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub>. In diesem Fall verringert sich die Anzahl der Peptide, die für die Interaktion zwischen Peptid und ATP zur Verfügung stehen, wodurch es zu einer verzögerten Bildung von fibrillieren Aggregaten kommt. Für die der Fünfkomentensystem-Vesikel wurden keine sphärische Amyloid Aggregate im Vergleich zu den anderen Fällen beobachtet.



### 5.3 Ergebnisse und Diskussion

---

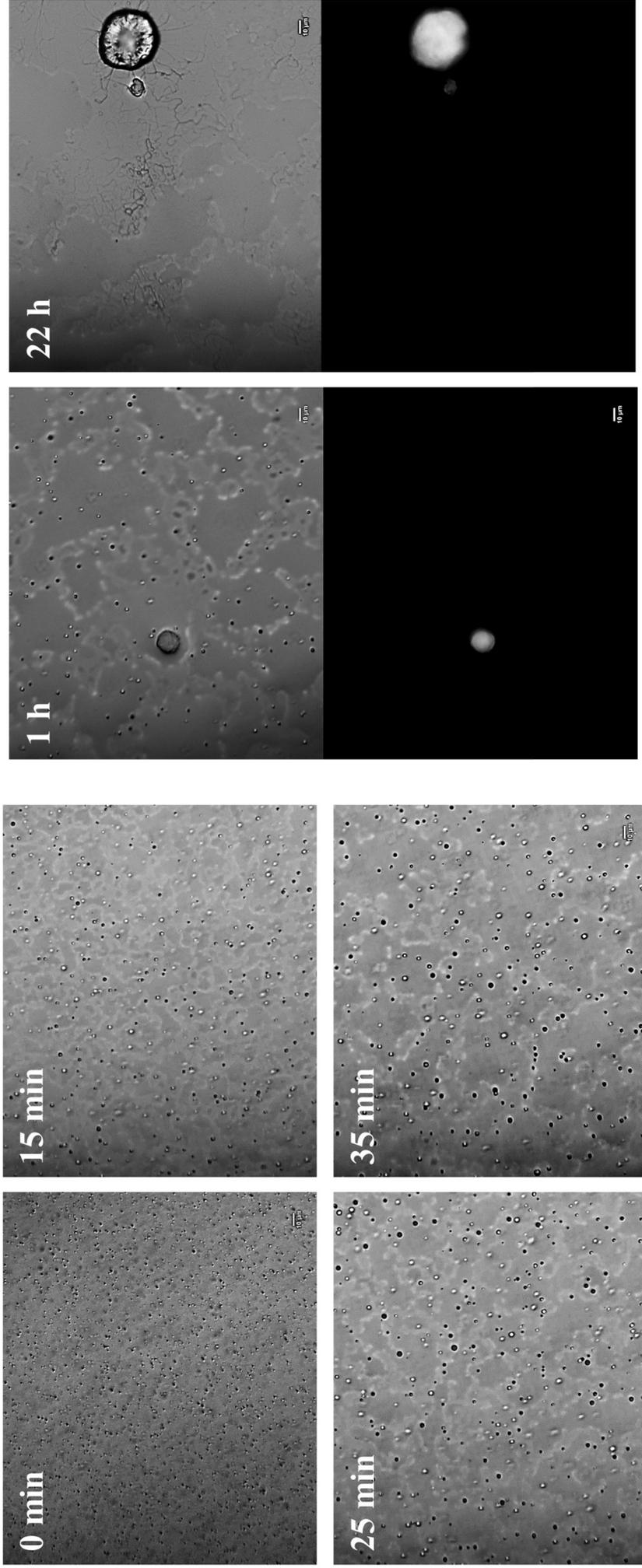
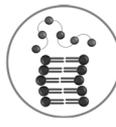


Abb. 5.6: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Mischungen der ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> und ATP in Abhängigkeit der Zeit. Nach einer Stunde wurden ThT fluoreszierende Aggregate erfasst, die unter den jeweiligen lichtmikroskopischen Aufnahmen dargestellt sind.



### 5.3. Ergebnisse und Diskussion

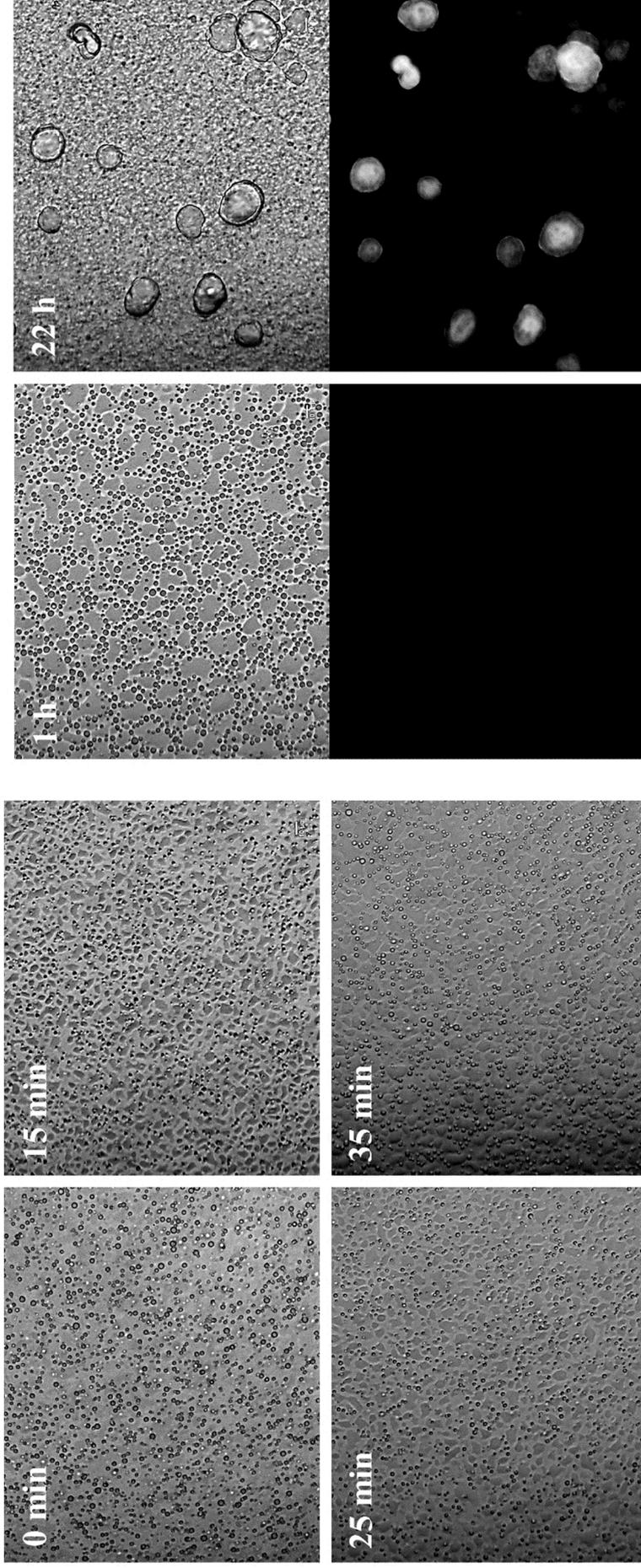
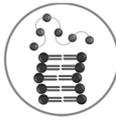


Abb. 5.7: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Mischung kleiner unilamellarer Vesikel des Dreikomponentensystems (DOPC:DPPC:Chol.; 1:2:1) mit ATP und ACC<sub>1</sub>-<sup>13</sup>K<sub>32</sub> in Abhängigkeit der Zeit. Nach einem Tag wurden ThT fluoreszierende Aggregate sowie nicht fluoreszierende Aggregate erfasst, die unter den jeweiligen lichtmikroskopischen Aufnahmen (oben) dargestellt sind.



### 5.3 Ergebnisse und Diskussion

---

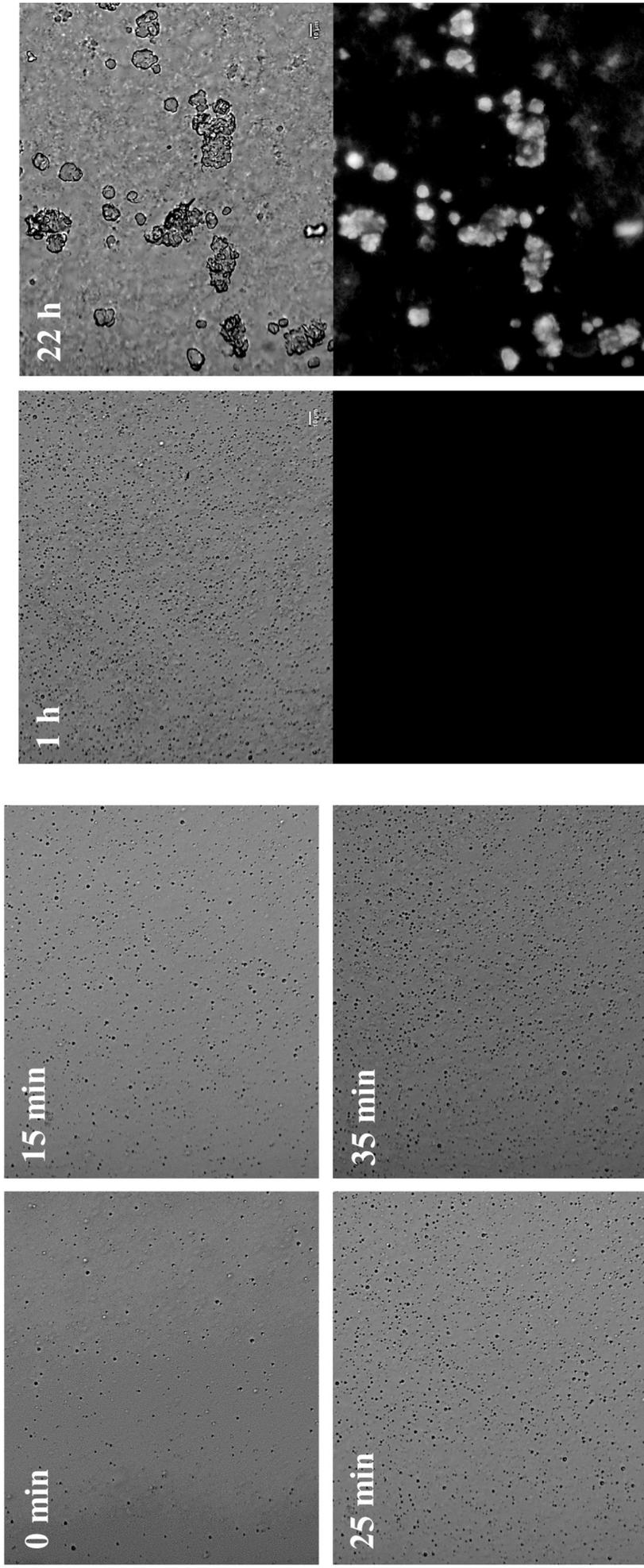
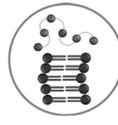


Abb. 5.8: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Mischung kleiner unilamellarer Vesikel des Fünfkomponentensystems (DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:DPPE; 20:5:45:5:25) und ATP und ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> in Abhängigkeit der Zeit. Nach einem Tag wurden ThT fluoreszierende Aggregate sowie nicht fluoreszierende Aggregate erfasst, die unter den jeweiligen lichtmikroskopischen Aufnahmen dargestellt sind.



### 5.3. Ergebnisse und Diskussion

---

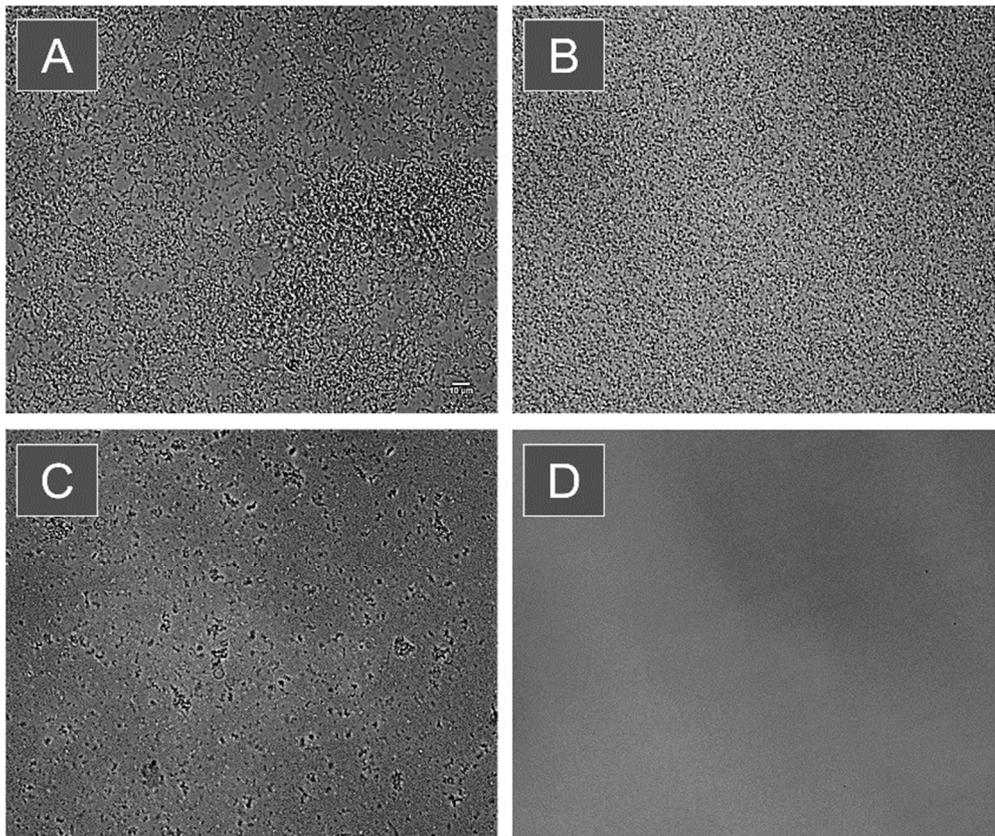
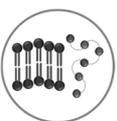


Abb. 5.9: Lichtmikroskopische Aufnahmen nach 22 Stunden der Mischungen von A) kleiner unilamellarer Vesikel (SUV) des Dreikomponentensystems (DOPC:DPPC:Chol.; 1:2:1) und ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> B) SUVs des 3KS und ATP C) SUVs des Fünfkomentensystems (DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:DPPC; 20:5:45:5:25) und ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> und D) SUVs des 5Ks und ATP,

Um die Auswirkungen der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung auch auf die  $l_o$ - $l_d$  Phasenkoexistenz der Membransysteme zu untersuchen, wurden riesige unilamellare Vesikel mit dem ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> und ATP vermischt, wobei die Reihenfolge der Vermischung wie in den vorherigen Messungen eingehalten wurde. Bei Raumtemperatur liegen die Dreikomponentensystem-Vesikel sowohl in der  $l_d$  als auch in der  $l_o$  Phase vor (vgl. Abb. 5.11; A). Die  $l_d$  Phase ist in den Aufnahmen rot markiert. Bei der Zugabe von ATP und Peptid konnten beobachtet werden, dass sich in der  $l_d$  Phase der Vesikel kleinere Vesikel ausstülpfen. Nach 22 Stunden konnte anhand der Aufnahmen festgestellt werden, dass sich fluoreszierende Aggregate an den Oberfläche der Vesikel anlagerten. Außerdem vergrößerte sich die  $l_d$  Phase eines Vesikel mit der Zeit. Bei den riesigen unilamellaren Vesikeln des Fünfkomentensystems waren nach 22 Stunden miteinander aggregierte Formen feststellbar und der ThT fluoreszierender Bereich war innerhalb der aggregierten Vesikel verteilt (vgl. Abb. 5.11, B).



*Lu et al.* beschreiben, dass die Interaktion zwischen riesigen Vesikeln und einem System mit der Eigenschaft der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung abhängig von deren Ladungen ist.<sup>152</sup>

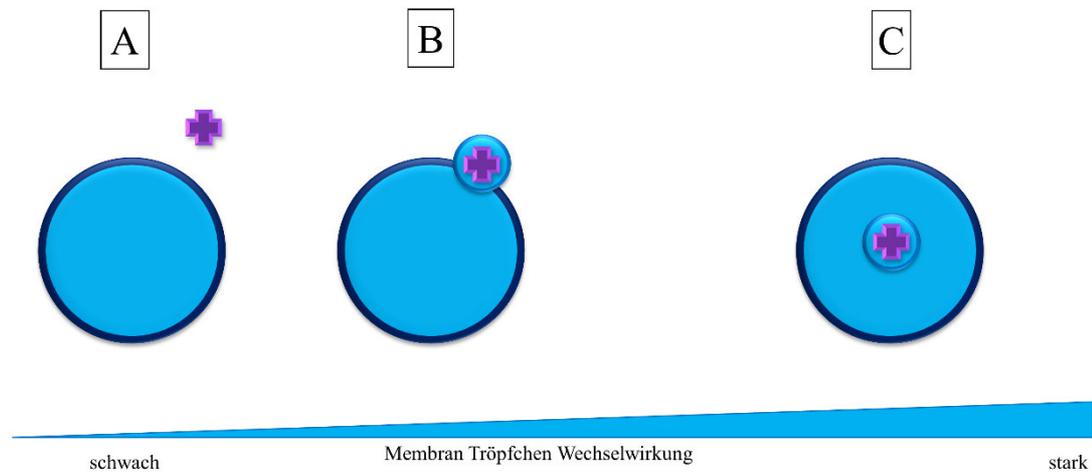


Abb. 5.10: Schematische Darstellung der verschiedenen Stufen A) keiner und B) einer teilweisen Benetzung der Vesikel durch die Tröpfchen, sowie C) einer vollständigen Aufnahme in das Zellinnere (Endozytose), welche abhängig von der Stärke der Wechselwirkung zwischen der Membran und den Komponenten der proteinhaltigen Tröpfchen ist.

Die Benetzung der Dreikomponentensystem-Vesikel erfolgt durch ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> und ATP teilweise, welche durch die Ausstülpung detektiert werden konnte. Nach 22 Stunden wurden an der Membranoberfläche ebenfalls Amyloid Aggregate beobachtet und die Vesikel sind miteinander aggregiert, welches die These bekräftigt, dass Amyloide Membranen destabilisieren können, wodurch der Zelltod eintritt. Sie verändern die physikalischen Eigenschaften der Membran, was z.B. durch die Vergrößerung der l<sub>d</sub> Phase über die Zeit beobachtet werden konnte. Bei der Lösung mit dem Fünfkomentensystem wurden Amyloid Aggregate innerhalb der Membranvesikel beobachtet. Somit musste eine vollständige Aufnahme (Endozytose) von ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> und ATP in das Vesikelinnere stattgefunden haben. Dies führt ebenfalls zu der Veränderung der Membraneigenschaften und evtl. zum Zelltod. Die Wechselwirkung zwischen dem System aus Peptid und ATP ist mit dem Fünfkomentensystem stärker als mit dem Dreikomponentensystem nach der Theorie von Lu et al.



### 5.3. Ergebnisse und Diskussion

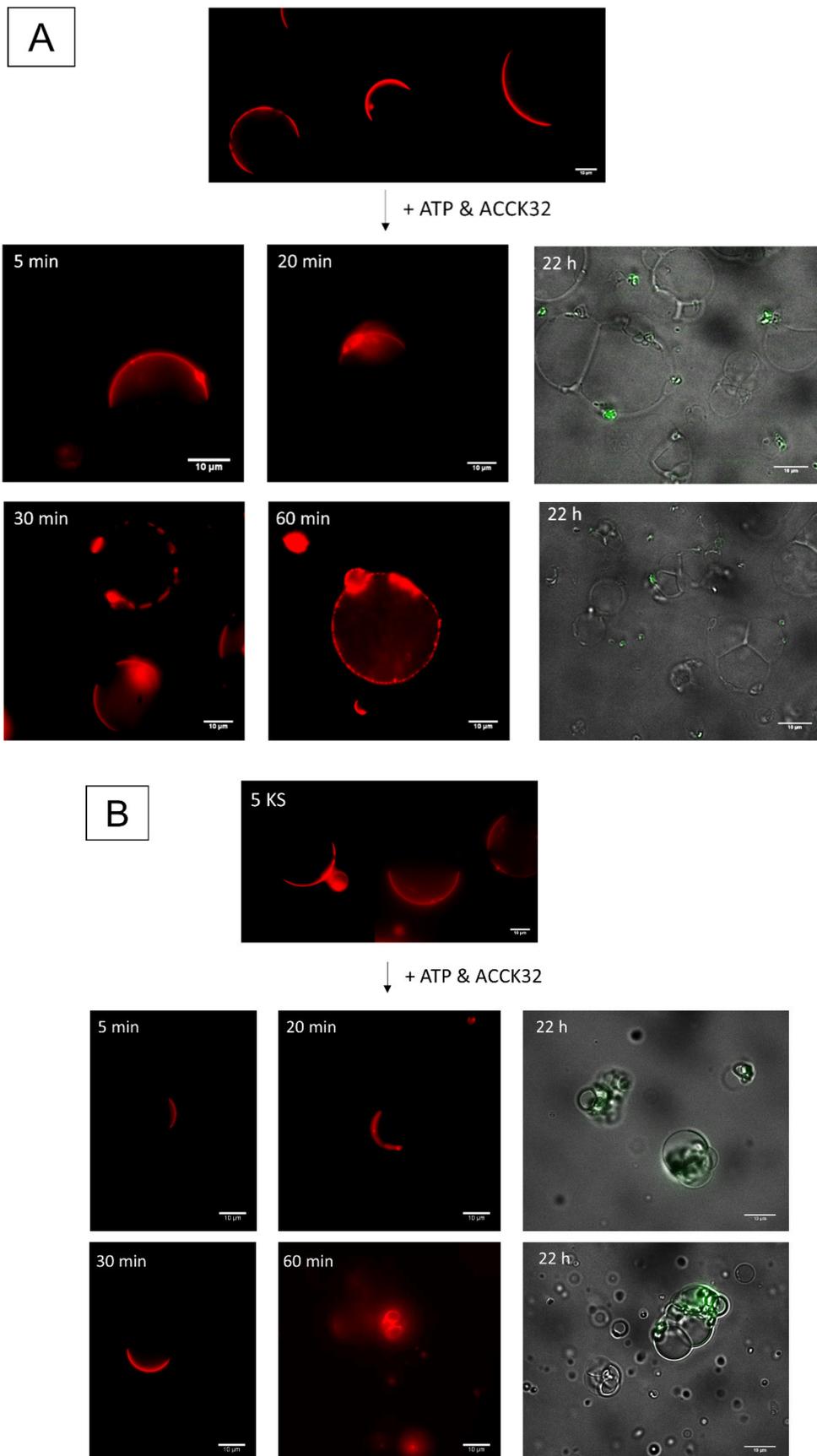


Abb. 5.11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Mischungen aus A) 3KS (GUV) und ATP und ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> und B) 5KS (GUV) und ATP und ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> in Abhängigkeit der Zeit. Bis zu 60 Minuten wurde die I<sub>d</sub> Phase (rot) der Vesikel dargestellt. Nach 22 Stunden wurden ThT fluoreszierende Aggregate (grün) erfasst.



Im zweiten Teil dieses Kapitels wird die Wechselwirkung eines verkapselten wässrigen Zwei-Phasen-Systems mit der Lipiddoppelschicht untersucht. Dafür wird als Modellmembransystem das anionische Fünfkomentensystem und das ATPS aus PEG mit dem Molekulargewicht 4,6 kDa und Dextran mit dem Molekulargewicht 10 kDa verwendet. Die Charakterisierung der Phasen von dem PEG/Dextran findet durch die Trübungstitrationsmethode bei Raumtemperatur und 70 °C statt. Anhand dieser kann die geeignete Zusammensetzung zur Erstellung von verkapselten Vesikeln gefunden werden, da während der erhöhten Temperatur der Vesikelherstellung das ATPS in dem einphasigen Zustand vorliegen sollte und bei Raumtemperatur wiederum im zweiphasigen Zustand. In dieser Arbeit wurde daher das PEG mit einer Gewichtskonzentration von 12 w% und das Dextran mit einer Gewichtskonzentration von 6 w%, gelöst im HEPES-Puffer bei pH = 7,4, verwendet. Die Dextranphase wurde mit dem Fluorophor Dextran-Alexa647 markiert. Anhand der verschiedenen Fluorophore können die Phasen der anionischen heterogenen Phase ( $l_d$  Phase: rot,  $l_o$  Phase: grün) und die Phasen des wässrigen Zwei-Phasen-Systems (Dextranreiche Phase: blau, PEG-reiche Phase: schwarz) erfasst werden. Zuerst wurde nach der Methode von *Keating et al.* die Vesikelpräparation<sup>142</sup> durchgeführt, welche auf der PVA-Methode beruht. Dabei wurden wenige Vesikel erhalten, die außerdem kleiner als 10  $\mu\text{m}$  waren und bei denen eine Befüllung mit beiden Phasen des ATPS nicht beobachtet wurde (vgl. Abb. 5.12.).

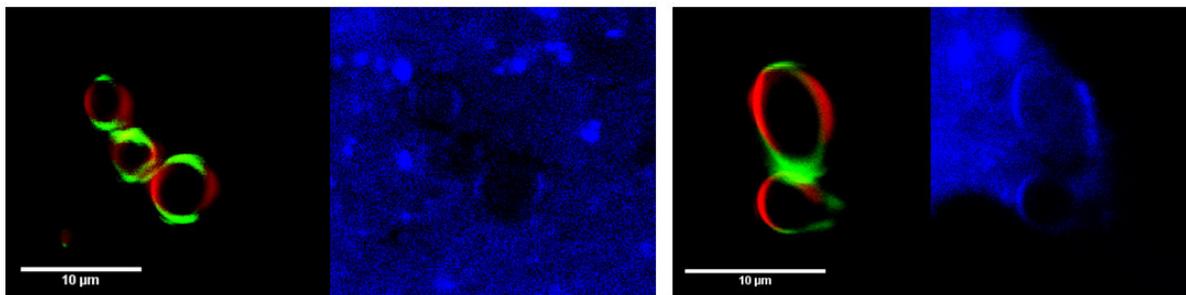


Abb. 5.12: Erhaltene ATPS-haltige GUVs (DOPG:DPPG:DOPC:Chol:DPPC; 5:5:20:25:45) nach der PVA-Methode bei Raumtemperatur. Die blaue Farbe zeigt die Dextranreiche-Phase, die rote Farbe die  $l_d$  und die grüne Farbe die  $l_o$ -Phase. Skalierbalken: 10  $\mu\text{m}$ .



### 5.3. Ergebnisse und Diskussion

Um die Ausbeute und die Größe der Vesikel zu verbessern, wurde die Präparation nach der Elektroformationsmethode<sup>17</sup> durchgeführt. Dadurch wurde die Ausbeute von 10 µm großen Vesikeln erhöht und es konnte beobachtet werden, dass beide Phasen in den Vesikeln vorhanden sind (vgl. Abb. 5.13).

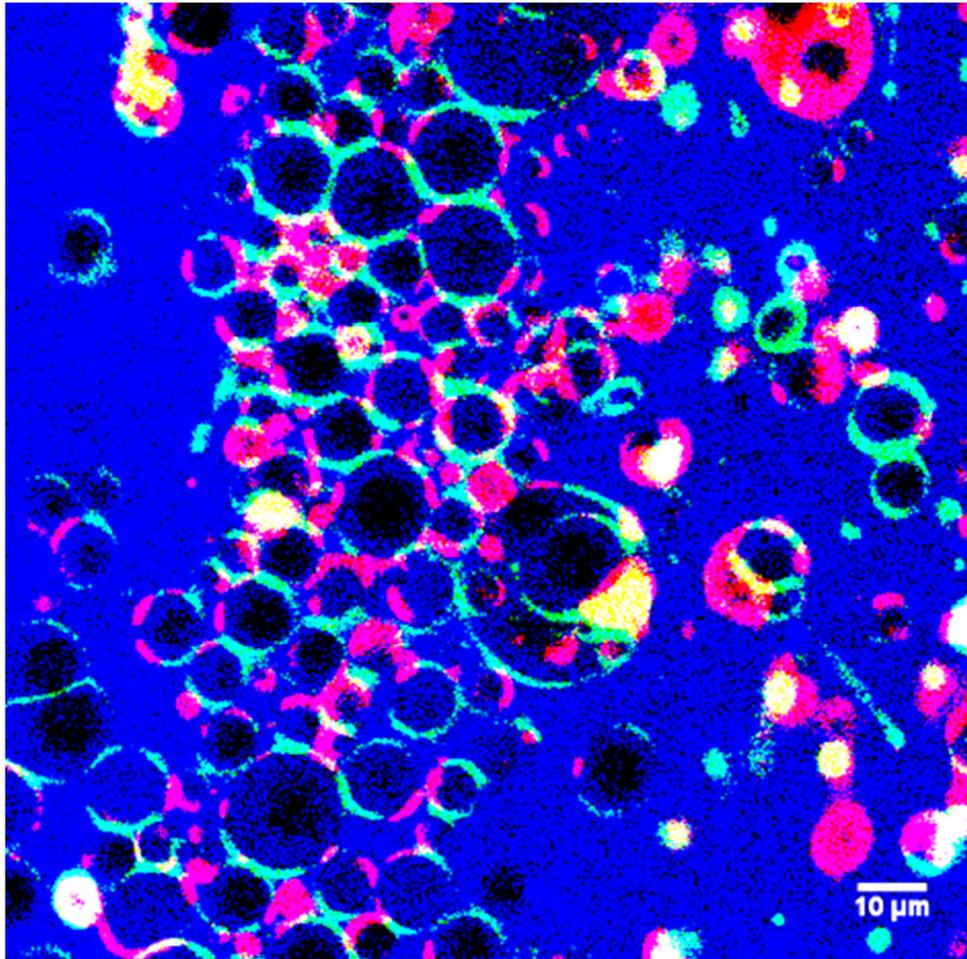
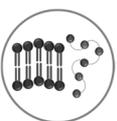


Abb. 5.13: ATPS-haltige GUVs (DOPG:DPPG:DOPC:Chol:DPPC; 5:5:20:25:45) nach der Elektroformationsmethode bei Raumtemperatur. Die blaue Farbe zeigt die Dextranreiche-Phase, die rote Farbe die  $l_d$  und die grüne Farbe die  $l_o$ -Phase. Skalierbalken: 10 µm.

Zur Darstellung der Temperaturabhängigkeit der beiden Phasenkoexistenzsysteme werden die Aufnahmen eines Vesikels gezeigt (Abb. 5.14). Der Phasenübergang der Phasenkoexistenz  $l_o$  zu der  $l_d$  Phase von dem anionischen Fünfkomentensystem ist in Gegenwart der PEG/Dextran-Mischung zu höheren Temperaturen verschoben. Oberhalb von 60 °C wird ebenfalls der zweiphasige Zustand der PEG/Dextran-Mischung innerhalb der Vesikel beobachtet, wohingegen sich die Mischung in der *Bulk*lösung bei höheren Temperaturen im Ein-Phasen-Zustand befindet. Somit kann daraus geschlossen werden, dass beide Phasenkoexistenzsysteme einen gegenseitigen Einfluss haben und die jeweiligen Phasenkoexistenzen stabilisieren. Im Vergleich zu den literaturbekannten Modellsystemen aus bis zu den



Dreikomponentensystemen<sup>150</sup> wird bei der Temperaturerhöhung keine Ausstülpung beobachtet. Um einen tieferen Einblick zu bekommen, wurde nach der Vesikelherstellung eine Mischung aus 0,5 wt% PEG und 0,5 wt% Dextran mit dem reinen HEPES-Puffer ausgetauscht (vgl. Abb. 5.14). Dabei ließ sich beobachten, dass die Dextranreiche-Phase mit der  $l_d$  Phase und die PEG-reiche Phase mit der  $l_o$  Phase interagieren. Eine Erklärung könnte sein, dass sich zwischen den eher hydrophilen und stark hydratisierten Dextranmolekülen und den polar und geladenen Phospholipidkopfgruppen ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen bildet. Die Stabilisierung der geordneten Lipidphase könnte durch die eher hydrophoben PEG-Moleküle hervorgerufen werden.

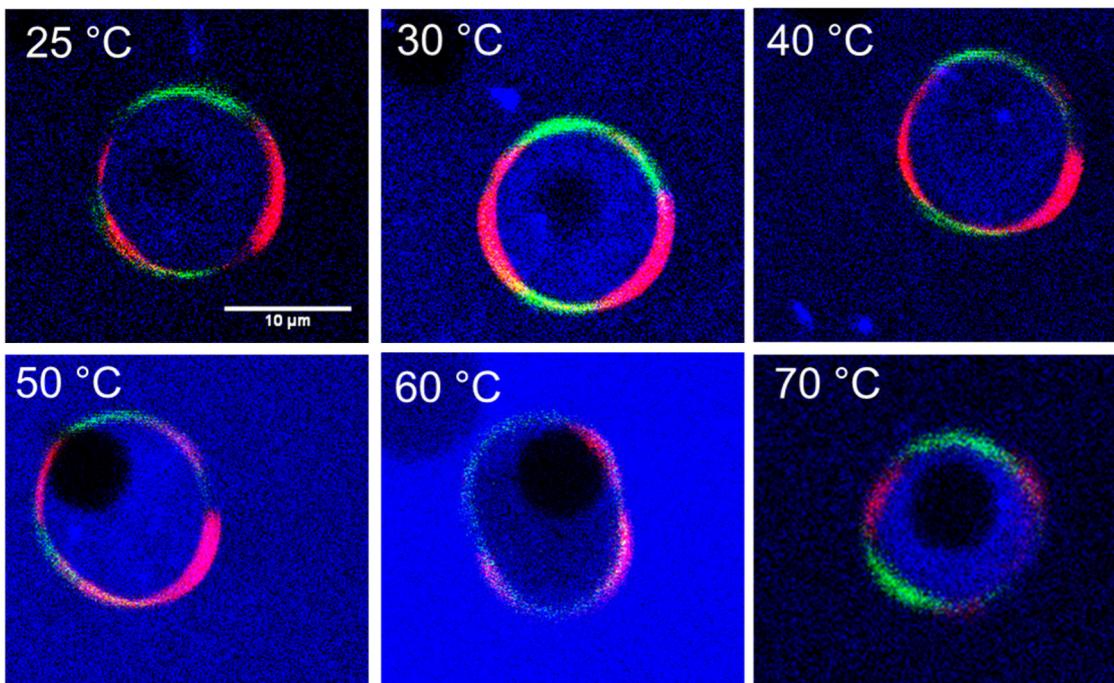


Abb. 5.14: Temperaturabhängige Untersuchung des anionischen Fünfkomentensystems eingekapselt mit der 4,6 kDa PEG/ 10kDa Dextran Mischung. rot entspricht *N*-Rh DHPE =  $l_d$  Phase-Marker, grün entspricht NBD DHPE =  $l_o$  Phase-Marker und blau entspricht Dextran-Alexa647 = Dextranreiche-Phase-Marker.



### 5.3. Ergebnisse und Diskussion

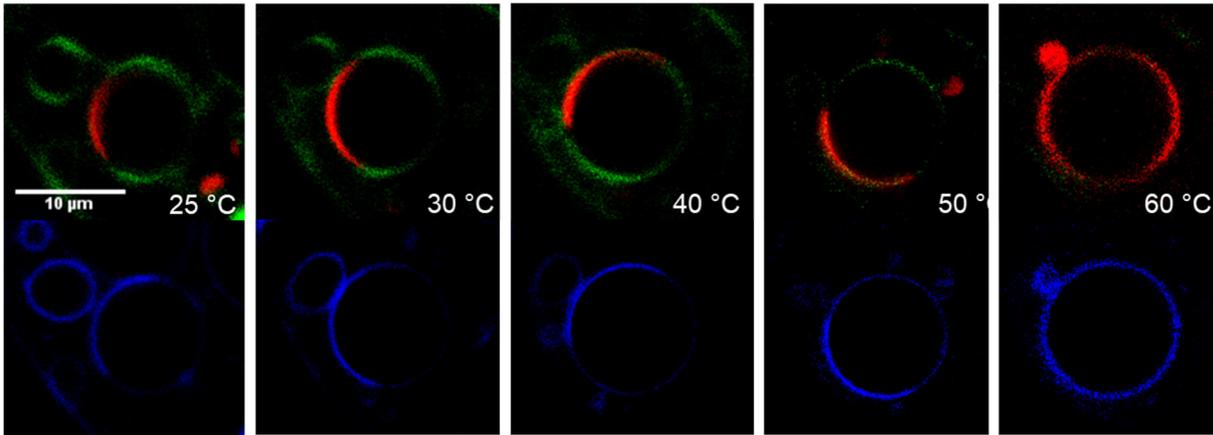
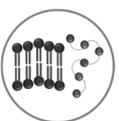


Abb. 5.15: Zugabe einer 4,6 kDa PEG/ 10kDa Dextran Mischung (jeweils 0,5 wt%) zu den anionischen (DOPG:DPPG:DOPC:Chol:DPPC; 5:5:20:25:45) Vesikeln, die daraufhin temperaturabhängig untersucht wurden sind.

Letzlich kann geschlussfolgert werden, dass die Wechselwirkung zwischen membranlosen und membrangebundenen Flüssig-Flüssig-Phasensystemen sich als biologisch relevant erweist, da beide Phasenkoexistenzen sich gegenseitig beeinflussen. Zum einen können Lipidvesikel die Amyloid Bildungen von Peptiden verlangsamen, zum anderen führt die Anlagerung der Proteintröpfchen an der Membran zur Veränderung der Kompartimentierung der Zellmembran. Bei den verkapselten Vesikeln wird deutlich, dass eine bevorzugte Wechselwirkung zwischen der einen Phase des Membransystems und der des wässrigen Zwei-Phasen-Systems vorliegt und somit die Phasenkoexistenzen moduliert werden, so dass unterschiedliche Reaktionsbereiche konfiguriert werden, welches für biologische Prozesse wie membranassoziierte Signaltransduktion relevant sein könnte.



## 5.4. Zusammenfassung

Die Erforschung der Wechselwirkungen zwischen biomolekularen Kondensaten und der Zellmembran könnte neben neue Erkenntnissen zellulärer Prozesse ein weiterer Schritt für die Erkenntnis von Krankheitsentstehung und somit zur Entwicklung von entsprechenden Therapeutika sein. In dem ersten Teil des Kapitels wurden die Eigenschaften des Peptids ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> und ATP in Anwesenheit von Vesikeln des zwitterionischen Dreikomponentensystems und des anionischen Fünfkomentensystems untersucht, um die Wechselwirkungen beider Phasenkoexistenzen zu analysieren. Um den Einfluss von Lipidsystemen auf das Flüssig-Flüssig-Phasenverhalten des Peptids ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> und ATP zu erhalten, wurden kleine unilamellare Vesikel (SUV) der jeweiligen Lipidsysteme verwendet. Anhand der Ergebnisse kann geschlossen werden, dass beide Lipidsysteme die Bildung von Amyloiden verzögern. Die dafür zugrundeliegenden Mechanismen werden abhängig von der Ladung der Membransysteme sein. Die zwitterionische Membran kann sowohl mit dem Peptid als auch mit ATP wechselwirken. Dagegen konkurriert die anionische Membran mit dem negativ geladenen ATP um das positiv geladene Peptid, wodurch die Interaktion von ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> und ATP ebenfalls gestört wird. Durch den Einsatz von riesigen unilamellaren Vesikeln, sowohl vom Dreikomponentensystem als auch vom Fünfkomentensystem, konnte der Einfluss von ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> und ATP auf die *l<sub>d</sub>-l<sub>o</sub>* Phasenkoexistenz der Lipidmembranen untersucht werden. Die Ergebnisse belegten die unterschiedlichen Stärken der Wechselwirkungen der zwitterionischen Membran und der anionischen Membran mit dem ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> und ATP System. Aufgrund der schwächeren Wechselwirkung lagern sich die Tröpfchen des Flüssig-Flüssig-Phasensystems an der zwitterionischen Membran an, welches zu einer Ausstülpung der Vesikel führt. An der Membranoberfläche lassen sich mit der Zeit auch Aggregate feststellen. Bei der anionischen Membran werden die Tröpfchen von der Membran aufgenommen, welches ein Indiz für eine stärkere Wechselwirkung ist, und nach einem Tag lassen sich Aggregate innerhalb der Lipidvesikel beobachten. Bei beiden Fällen führt dies zu einer Veränderung der Membran hinsichtlich ihrer lateralen Organisation und Topologie. So wurden auch Aggregation der Vesikeln beobachtet.

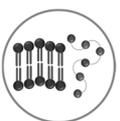
Die Untersuchung der anionischen Vesikel, in welchen das wässrige Zwei-Phasen-System aus PEG und Dextran umschlossen ist, zeigte, dass beide Systeme die jeweilige andere Phasenkoexistenz hinsichtlich ihrer Temperaturstabilität stabilisieren jedoch eine favorisierte Wechselwirkung zwischen einer der Phasen des Lipidsystems und einer der Phasen des wässrigen Zwei-Phasen-Systems auftritt. Dies bedeutet, dass neue Reaktionsbereiche konfiguriert werden, in denen verschiedene biologische Prozesse parallel stattfinden könnten und verschiedene gelöste Komponenten zu den unterschiedlichen Lipidbereichen transportiert werden



## 5.4. Zusammenfassung

---

könnten. Wässrige Zwei-Phasen-Systeme könnten somit bei der Entwicklung von Medikamenten als Medium verwendet werden, wobei Wirkstoffe zielgerichtet an bestimmte Membrandomänen transportiert werden könnten.



---

## 6. Literaturverzeichnis

---

1. Müller, W. *Lebenswelt Meer*. (Springer Berlin Heidelberg, 2017).
2. *Tiefsee: Vielfalt in der Dunkelheit*. (E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller, 2020).
3. Daniel, I., Oger, P. & Winter, R. Origins of life and biochemistry under high-pressure conditions. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 858 (2006).
4. Harrison, J. P., Gheeraert, N., Tsigelnitskiy, D. & Cockell, C. S. The limits for life under multiple extremes. *Trends Microbiol.* **21**, 204–212 (2013).
5. Yayanos, A. A. Evolutional and ecological implications of the properties of deep-sea barophilic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**, 9542–9546 (1986).
6. Winter, R. & Czeslik, C. *Methoden der biophysikalischen Chemie*. (2011).
7. Sackmann, E. Structure and Dynamics of Membranes - From Cells to Vesicles. *Handb. Biol. Phys.* 1–63 (1995).
8. Dowhan, W. MOLECULAR BASIS FOR MEMBRANE PHOSPHOLIPID DIVERSITY: Why Are There So Many Lipids? *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 199–232 (1997).
9. Nicolson, G. L. The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40years. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1838**, 1451–1466 (2014).
10. Coskun, Ü. & Simons, K. Cell Membranes: The Lipid Perspective. *Structure* **19**, 1543–1548 (2011).
11. van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124 (2008).
12. Merrill, A. H. Sphingolipid and Glycosphingolipid Metabolic Pathways in the Era of Sphingolipidomics. *Chem. Rev.* **111**, 6387–6422 (2011).

- 
13. Sinensky, M. Homeoviscous Adaptation—A Homeostatic Process that Regulates the Viscosity of Membrane Lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71**, 522–525 (1974).
  14. Cullis, P. R. & De Kruijff, B. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* **559**, 399–420 (1979).
  15. Tanford, C. The Hydrophobic Effect and the Organization of Living Matter. *Science* **200**, 1012–1018 (1978).
  16. Rappolt, M. *et al.* Structural, dynamic and mechanical properties of POPC at low cholesterol concentration studied in pressure/temperature space. *Eur. Biophys. J.* **31**, 575–585 (2003).
  17. Stein, H., Spindler, S., Bonakdar, N., Wang, C. & Sandoghdar, V. Production of Isolated Giant Unilamellar Vesicles under High Salt Concentrations. *Front. Physiol.* **8**, (2017).
  18. Dörfler, H.-D. *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie ; mit 579, zum Teil farbigen Abb. und 88 Tabellen.* (Springer, 2002).
  19. Winter, R., Lopes, D., Grudzielanek, S. & Vogtt, K. Towards an Understanding of the Temperature/ Pressure Configurational and Free-Energy Landscape of Biomolecules. *J. Non-Equilib. Thermodyn.* **32**, (2007).
  20. Heerklotz, H. & Eppand, R. M. The Enthalpy of Acyl Chain Packing and the Apparent Water-Accessible Apolar Surface Area of Phospholipids. *Biophys. J.* **80**, 271–279 (2001).
  21. Nagle, J. F. Theory of the Main Lipid Bilayer Phase Transition. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **31**, 157–196 (1980).
  22. Sankaram, M. B. & Thompson, T. E. Modulation of phospholipid acyl chain order by cholesterol. A solid-state deuterium nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry* **29**, 10676–10684 (1990).

- 
23. Nielsen, M., Miao, L., Ipsen, J. H., Zuckermann, M. J. & Mouritsen, O. G. Off-lattice model for the phase behavior of lipid-cholesterol bilayers. *Phys. Rev. E* **59**, 5790–5803 (1999).
  24. Silvius, J. R. Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1610**, 174–183 (2003).
  25. Euler, H. Zur Biochemie der Nukleinsäuren und der Nukleoproteide. *DMW - Dtsch. Med. Wochenschr.* **73**, 265–271 (1948).
  26. Lang, K. Nukleinsäuren und ihre Bausteine. in *Biochemie der Ernährung* 153–158 (Steinkopff, 1979). doi:10.1007/978-3-642-72342-1\_7.
  27. Liszczak, G. & Muir, T. W. Barcoding mit Nukleinsäuren: Anwendung der DNA-Sequenzierung als molekulares Zählwerk. *Angew. Chem.* **131**, 4188–4207 (2019).
  28. Varshney, D., Spiegel, J., Zyner, K., Tannahill, D. & Balasubramanian, S. The regulation and functions of DNA and RNA G-quadruplexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 459–474 (2020).
  29. Will, H. Proteine. in *Molekularbiologie kurz und bündig* 63–130 (Springer Berlin Heidelberg, 2014). doi:10.1007/978-3-642-55110-9\_3.
  30. Birch, H. Proteine. in *50 Schlüsselideen Chemie* 128–131 (Springer Berlin Heidelberg, 2016). doi:10.1007/978-3-662-48510-1\_32.
  31. Ferreiro, S. Proteine und Aminosäuren. <https://adntro.com/de/blog/lernen-genetisch/eiweis-aminosauren/> (2023).
  32. Horwitz, D. L., Starr, J. I., Mako, M. E., Blackard, W. G. & Rubenstein, A. H. Proinsulin, insulin, and C-peptide concentrations in human portal and peripheral blood. *J. Clin. Invest.* **55**, 1278–1283 (1975).
  33. Born, F. Die Wirkung von C-Peptid auf die Wundheilung diabetischer Mäuse.
  34. Winter, R. Biophysikalische Chemie - vom Einzelmolekül zum Verständnis komplexer biologischer Maschinen. *Chem. Unserer Zeit* **50**, 82–82 (2016).

- 
35. Simons, K. & Eehalt, R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* **110**, 597–603 (2002).
  36. Binder, W. H., Barragan, V. & Menger, F. M. Domänen und Rafts in Lipidmembranen. *Angew. Chem.* **115**, 5980–6007 (2003).
  37. van Reyk, D. M., Brown, A. J., Hult'en, L. M., Dean, R. T. & Jessup, W. Oxysterols in biological systems: sources, metabolism and pathophysiological relevance. *Redox Rep.* **11**, 255–262 (2006).
  38. Blanc, M. *et al.* The Transcription Factor STAT-1 Couples Macrophage Synthesis of 25-Hydroxycholesterol to the Interferon Antiviral Response. *Immunity* **38**, 106–118 (2013).
  39. Schroepfer, G. J. Oxysterols: Modulators of Cholesterol Metabolism and Other Processes. *Physiol. Rev.* **80**, 361–554 (2000).
  40. Brown, A. J., Sharpe, L. J. & Rogers, M. J. Oxysterols: From physiological tuners to pharmacological opportunities. *Br. J. Pharmacol.* **178**, 3089–3103 (2021).
  41. Brzeska, M., Szymczyk, K. & Szterk, A. Current Knowledge about Oxysterols: A Review. *J. Food Sci.* **81**, R2299–R2308 (2016).
  42. Deiana, M. *et al.* Derangement of intestinal epithelial cell monolayer by dietary cholesterol oxidation products. *Free Radic. Biol. Med.* **113**, 539–550 (2017).
  43. Tabas, I. Lipids and atherosclerosis. in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (Elsevier B.V., 2008).
  44. Björkhem, I. & Diczfalusy, U. Oxysterols: Friends, Foes, or Just Fellow Passengers? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 734–742 (2002).
  45. Diczfalusy, U. Analysis of Cholesterol Oxidation Products in Biological Samples. *J. AOAC Int.* **87**, 467–473 (2004).
  46. Björkhem, I. *et al.* Oxysterols and Parkinson's disease: Evidence that levels of 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid correlates with the duration of the disease. *Neurosci. Lett.* **555**, 102–105 (2013).

- 
47. Gosselet, F., Saint-Pol, J. & Fenart, L. Effects of oxysterols on the blood–brain barrier: Implications for Alzheimer’s disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**, 687–691 (2014).
  48. Björkhem, I., Meaney, S. & Diczfalusy, U. Oxysterols in human circulation: which role do they have?: *Curr. Opin. Lipidol.* **13**, 247–253 (2002).
  49. Janowski, B. A. *et al.* Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXR $\alpha$  and LXR $\beta$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 266–271 (1999).
  50. Brown, A. J. & Jessup, W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **142**, 1–28 (1999).
  51. Griffiths, W. J. & Wang, Y. Oxysterol research: a brief review. *Biochem. Soc. Trans.* **47**, 517–526 (2019).
  52. Nury, T. *et al.* Oxiapoptophagy: A type of cell death induced by some oxysterols. *Br. J. Pharmacol.* **178**, 3115–3123 (2021).
  53. Vejux, A., Malvitte, L. & Lizard, G. Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **41**, 545–556 (2008).
  54. Canzoneri, F. *et al.* Oxysterols as Reliable Markers of Quality and Safety in Cholesterol Containing Food Ingredients and Products. *Front. Nutr.* **9**, 853460 (2022).
  55. Olkkonen, V. M. & Lehto, M. Oxysterols and oxysterol binding proteins: role in lipid metabolism and atherosclerosis. *Ann. Med.* **36**, 562–572 (2004).
  56. Lembo, D., Cagno, V., Civra, A. & Poli, G. Oxysterols: An emerging class of broad spectrum antiviral effectors. *Mol. Aspects Med.* **49**, 23–30 (2016).
  57. Diczfalusy, U. On the formation and possible biological role of 25-hydroxycholesterol. *Biochimie* **95**, 455–460 (2013).
  58. Civra, A. *et al.* 25-Hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol inhibit human rotavirus infection by sequestering viral particles into late endosomes. *Redox Biol.* **19**, 318–330 (2018).

- 
59. Zu, S. *et al.* 25-Hydroxycholesterol is a potent SARS-CoV-2 inhibitor. *Cell Res.* **30**, 1043–1045 (2020).
  60. Li, C. *et al.* 25-Hydroxycholesterol Protects Host against Zika Virus Infection and Its Associated Microcephaly in a Mouse Model. *Immunity* **46**, 446–456 (2017).
  61. S, W. *et al.* Cholesterol 25-Hydroxylase inhibits SARS-CoV-2 and other coronaviruses by depleting membrane cholesterol. *EMBO J.* **39**, (2020).
  62. Chen, Y. *et al.* Interferon-Inducible Cholesterol-25-Hydroxylase Inhibits Hepatitis C Virus Replication via Distinct Mechanisms. *Sci. Rep.* **4**, 7242 (2014).
  63. Domingues, M. M., Gomes, B., Hollmann, A. & Santos, N. C. 25-Hydroxycholesterol Effect on Membrane Structure and Mechanical Properties. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 2574 (2021).
  64. Wnętrzak, A. *et al.* 25-hydroxycholesterol interacts differently with lipids of the inner and outer membrane leaflet – The Langmuir monolayer study complemented with theoretical calculations. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **211**, 105909 (2021).
  65. Kobierski, J. *et al.* How the replacement of cholesterol by 25-hydroxycholesterol affects the interactions with sphingolipids: The Langmuir Monolayer Study complemented with theoretical calculations. *J. R. Soc. Interface* **18**, rsif.2021.0050, 20210050 (2021).
  66. Wnętrzak, A. *et al.* Unusual Behavior of the Bipolar Molecule 25-Hydroxycholesterol at the Air/Water Interface—Langmuir Monolayer Approach Complementated with Theoretical Calculations. *J. Phys. Chem. B* **124**, 1104–1114 (2020).
  67. Wnętrzak, A., Chachaj-Brekiesz, A., Kuś, K., Lipiec, E. & Dynarowicz-Latka, P. Oxysterols can act antiviral through modification of lipid membrane properties – The Langmuir monolayer study. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **220**, 106092 (2022).
  68. Adamek, M. *et al.* Antiviral Actions of 25-Hydroxycholesterol in Fish Vary With the Virus-Host Combination. *Front. Immunol.* **12**, 581786 (2021).

- 
69. Weinberger, A. *et al.* Gel-Assisted Formation of Giant Unilamellar Vesicles. *Biophys. J.* **105**, 154–164 (2013).
  70. Jeworrek, C., Pühse, M. & Winter, R. X-ray Kinematography of Phase Transformations of Three-Component Lipid Mixtures: A Time-Resolved Synchrotron X-ray Scattering Study Using the Pressure-Jump Relaxation Technique. *Langmuir* **24**, 11851–11859 (2008).
  71. Erwin, N. Biophysikalische Einblicke in die Wechselwirkungen von lipidierten Signalproteinen mit Membranen und Regulatorproteinen. (TU Dortmund, 2018).
  72. Eisenblätter, J. & Winter, R. Pressure Effects on the Structure and Phase Behavior of DMPC-Gramicidin Lipid Bilayers: A Synchrotron SAXS and <sup>2</sup>H-NMR Spectroscopy Study. *Biophys. J.* **90**, 956–966 (2006).
  73. Winter, R. & Jeworrek, C. Effect of pressure on membranes. *Soft Matter* **5**, 3157 (2009).
  74. Olsen, B. N. *et al.* The Structural Basis of Cholesterol Accessibility in Membranes. *Biophys. J.* **105**, 1838–1847 (2013).
  75. Xu, X. & London, E. The Effect of Sterol Structure on Membrane Lipid Domains Reveals How Cholesterol Can Induce Lipid Domain Formation. *Biochemistry* **39**, 843–849 (2000).
  76. Olsen, B. N., Schlesinger, P. H., Ory, D. S. & Baker, N. A. 25-Hydroxycholesterol Increases the Availability of Cholesterol in Phospholipid Membranes. *Biophys. J.* **100**, 948–956 (2011).
  77. Bielska, A. A. *et al.* Side-Chain Oxysterols Modulate Cholesterol Accessibility through Membrane Remodeling. *Biochemistry* **53**, 3042–3051 (2014).
  78. Gier, J. D., Mandersloot, J. G. & Deenen, L. L. M. V. The role of cholesterol in lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **173**, 143–145 (1969).
  79. Baumgart, T., Hunt, G., Farkas, E. R., Webb, W. W. & Feigenson, G. W. Fluorescence probe partitioning between Lo/Ld phases in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1768**, 2182–2194 (2007).

- 
80. Olsen, B. N., Schlesinger, P. H. & Baker, N. A. Perturbations of Membrane Structure by Cholesterol and Cholesterol Derivatives Are Determined by Sterol Orientation. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 4854–4865 (2009).
  81. Lee, J. H., Han, J., Woo, J. H. & Jou, I. 25-Hydroxycholesterol suppress IFN- $\gamma$ -induced inflammation in microglia by disrupting lipid raft formation and caveolin-mediated signaling endosomes. *Free Radic. Biol. Med.* **179**, 252–265 (2022).
  82. Ma, Y. *et al.* Cholesterol Partition and Condensing Effect in Phase-Separated Ternary Mixture Lipid Multilayers. *Biophys. J.* **110**, 1355–1366 (2016).
  83. McIntosh, T. J. The effect of cholesterol on the structure of phosphatidylcholine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **513**, 43–58 (1978).
  84. Manisegaran, M., Bornemann, S., Kiesel, I. & Winter, R. Effects of the deep-sea osmolyte TMAO on the temperature and pressure dependent structure and phase behavior of lipid membranes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **21**, 18533–18540 (2019).
  85. Synowiec, A., Szczepański, A., Barreto-Duran, E., Lie, L. K. & Pyrc, K. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): a Systemic Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **34**, e00133-20 (2021).
  86. Yang, Y. *et al.* SARS-CoV-2: characteristics and current advances in research. *Viol. J.* **17**, 117 (2020).
  87. Ashraf, U. M. *et al.* SARS-CoV-2, ACE2 expression, and systemic organ invasion. *Physiol. Genomics* **53**, 51–60 (2021).
  88. Gil, C. *et al.* COVID-19: Drug Targets and Potential Treatments. *J. Med. Chem.* **63**, 12359–12386 (2020).
  89. Shamsi, A. *et al.* Potential drug targets of SARS-CoV-2: From genomics to therapeutics. *Int. J. Biol. Macromol.* **177**, 1–9 (2021).
  90. Zhang, Y. *et al.* New understanding of the damage of SARS-CoV-2 infection outside the respiratory system. *Biomed. Pharmacother.* **127**, 110195 (2020).

- 
91. Su, H. *et al.* Molecular Insights into Small-Molecule Drug Discovery for SARS-CoV-2. *Angew. Chem. Int. Ed.* **60**, 9789–9802 (2021).
  92. Zhao, C. *et al.* Targeting RNA G-Quadruplex in SARS-CoV-2: A Promising Therapeutic Target for COVID-19? *Angew. Chem. Int. Ed.* **60**, 432–438 (2021).
  93. Sreeramulu, S. *et al.* Exploring the Druggability of Conserved RNA Regulatory Elements in the SARS-CoV-2 Genome. *Angew. Chem. Int. Ed.* **60**, 19191–19200 (2021).
  94. Bezzi, G., Piga, E. J., Binolfi, A. & Armas, P. CNBP Binds and Unfolds In Vitro G-Quadruplexes Formed in the SARS-CoV-2 Positive and Negative Genome Strands. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 2614 (2021).
  95. Varshney, D., Spiegel, J., Zyner, K., Tannahill, D. & Balasubramanian, S. The regulation and functions of DNA and RNA G-quadruplexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 459–474 (2020).
  96. Dumas, L., Herviou, P., Dassi, E., Cammas, A. & Millevoi, S. G-Quadruplexes in RNA Biology: Recent Advances and Future Directions. *Trends Biochem. Sci.* **46**, 270–283 (2021).
  97. Rhodes, D. & Lipps, H. J. G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Res.* **43**, 8627–8637 (2015).
  98. Takahashi, S. & Sugimoto, N. Watson–Crick versus Hoogsteen Base Pairs: Chemical Strategy to Encode and Express Genetic Information in Life. *Acc. Chem. Res.* **54**, 2110–2120 (2021).
  99. Takahashi, S. *et al.* Chemical Modulation of DNA Replication along G-Quadruplex Based on Topology-Dependent Ligand Binding. *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 16458–16469 (2021).
  100. Mitteaux, J. *et al.* Identifying G-Quadruplex-DNA-Disrupting Small Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 12567–12577 (2021).
  101. Sugimoto, N. *Chemistry and biology of non-canonical nucleic acids.* (Wiley, 2020).

- 
102. Belmonte-Reche, E., Serrano-Chacón, I., Gonzalez, C., Gallo, J. & Bañobre-López, M. Potential G-quadruplexes and i-Motifs in the SARS-CoV-2. *PLOS ONE* **16**, e0250654 (2021).
103. Liu, G. *et al.* RNA G-quadruplex in TMPRSS2 reduces SARS-CoV-2 infection. *Nat. Commun.* **13**, 1444 (2022).
104. Wang, Z. *et al.* A small molecule compound berberine as an orally active therapeutic candidate against COVID-19 and SARS: A computational and mechanistic study. *FASEB J.* **35**, (2021).
105. Varghese, F. *et al.* Berberine and Obatoclox Inhibit SARS-Cov-2 Replication in Primary Human Nasal Epithelial Cells In Vitro. *Viruses* **13**, 282 (2021).
106. Miclot, T. *et al.* Structure and Dynamics of RNA Guanine Quadruplexes in SARS-CoV-2 Genome. Original Strategies against Emerging Viruses. *J. Phys. Chem. Lett.* **12**, 10277–10283 (2021).
107. Arora, A. *et al.* Binding of berberine to human telomeric quadruplex - spectroscopic, calorimetric and molecular modeling studies: Telomeric quadruplex-berberine interaction. *FEBS J.* **275**, 3971–3983 (2008).
108. Bazzicalupi, C., Ferraroni, M., Bilia, A. R., Scheggi, F. & Gratteri, P. The crystal structure of human telomeric DNA complexed with berberine: an interesting case of stacked ligand to G-tetrad ratio higher than 1:1. *Nucleic Acids Res.* **41**, 632–638 (2013).
109. Sharma, N. K., Lunawat, P. & Dixit, M. Binding Studies of Natural Product Berberine with DNA G-Quadruplex. (2011).
110. Connors, K. A. *Binding constants: the measurement of molecular complex stability.* (Wiley, 1987).
111. Ulatowski, F., Dąbrowa, K., Bałakier, T. & Jurczak, J. Recognizing the Limited Applicability of Job Plots in Studying Host–Guest Interactions in Supramolecular Chemistry. *J. Org. Chem.* **81**, 1746–1756 (2016).

- 
112. Zhang, W.-J. *et al.* 9-Substituted berberine derivatives as G-quadruplex stabilizing ligands in telomeric DNA. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 5493–5501 (2007).
113. Wickhorst, P. J. & Ihmels, H. Berberrubine Phosphate: A Selective Fluorescent Probe for Quadruplex DNA. *Molecules* **26**, 2566 (2021).
114. Oliva, R., Banerjee, S., Cinar, H., Ehrt, C. & Winter, R. Alteration of Protein Binding Affinities by Aqueous Two-Phase Systems Revealed by Pressure Perturbation. *Sci. Rep.* **10**, 8074 (2020).
115. Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1751**, 119–139 (2005).
116. Oliva, R., Mukherjee, S. & Winter, R. Unraveling the binding characteristics of small ligands to telomeric DNA by pressure modulation. *Sci. Rep.* **11**, 9714 (2021).
117. Zhang, W.-J. *et al.* 9-Substituted berberine derivatives as G-quadruplex stabilizing ligands in telomeric DNA. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 5493–5501 (2007).
118. Mukherjee, S. K., Knop, J. & Winter, R. Modulation of the Conformational Space of SARS-CoV-2 RNA Quadruplex RG-1 by Cellular Components and the Amyloidogenic Peptides  $\alpha$ -Synuclein and hIAPP. *Chem. – Eur. J.* **28**, (2022).
119. Oliva, R., Jahmidi-Azizi, N., Mukherjee, S. & Winter, R. Harnessing Pressure Modulation for Exploring Ligand Binding Reactions in Cosolvent Solutions. *J. Phys. Chem. B* **125**, 539–546 (2021).
120. De Rache, A. & Mergny, J.-L. Assessment of selectivity of G-quadruplex ligands via an optimised FRET melting assay. *Biochimie* **115**, 194–202 (2015).
121. Gray, R. D., Trent, J. O. & Chaires, J. B. Folding and Unfolding Pathways of the Human Telomeric G-Quadruplex. *J. Mol. Biol.* **426**, 1629–1650 (2014).
122. Moraca, F. *et al.* Ligand binding to telomeric G-quadruplex DNA investigated by funnel-metadynamics simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, (2017).

- 
123. Brangwynne, C. P. *et al.* Germline P Granules Are Liquid Droplets That Localize by Controlled Dissolution/Condensation. *Science* **324**, 1729–1732 (2009).
124. Hyman, A. A., Weber, C. A. & Jülicher, F. Liquid-Liquid Phase Separation in Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 39–58 (2014).
125. Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A. & Rosen, M. K. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 285–298 (2017).
126. Paufler, P. P. **Protein Condensation** . By J. D. Gunton, A. Shirayev and D. L. Pagan. Pp. xii+364. Cambridge University Press, 2007. Price (hardback) £70 (US\$ 135). ISBN 978-0-521-85121-3. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **64**, 326–326 (2008).
127. Crowe, C. D. & Keating, C. D. Liquid–liquid phase separation in artificial cells. *Interface Focus* **8**, 20180032 (2018).
128. Minton, A. P. Simple Calculation of Phase Diagrams for Liquid-Liquid Phase Separation in Solutions of Two Macromolecular Solute Species. *J. Phys. Chem. B* **124**, 2363–2370 (2020).
129. Abbas, M., Lipiński, W. P., Wang, J. & Spruijt, E. Peptide-based coacervates as biomimetic protocells. *Chem. Soc. Rev.* **50**, 3690–3705 (2021).
130. Alberti, S. & Dormann, D. Liquid–Liquid Phase Separation in Disease. *Annu. Rev. Genet.* **53**, 171–194 (2019).
131. Babinchak, W. M. & Surewicz, W. K. Liquid–Liquid Phase Separation and Its Mechanistic Role in Pathological Protein Aggregation. *J. Mol. Biol.* **432**, 1910–1925 (2020).
132. Ray, S. *et al.*  $\alpha$ -Synuclein aggregation nucleates through liquid–liquid phase separation. *Nat. Chem.* **12**, 705–716 (2020).
133. Mukherjee, S. *et al.* Liquid-liquid Phase Separation of  $\alpha$ -Synuclein: A New Mechanistic Insight for  $\alpha$ -Synuclein Aggregation Associated with Parkinson’s Disease Pathogenesis. *J. Mol. Biol.* **435**, 167713 (2023).

- 
134. Lin, Y. *et al.* Liquid-Liquid Phase Separation of Tau Driven by Hydrophobic Interaction Facilitates Fibrillization of Tau. *J. Mol. Biol.* **433**, 166731 (2021).
135. Sawner, A. S. *et al.* Modulating  $\alpha$ -Synuclein Liquid-Liquid Phase Separation: Published as part of the *Biochemistry* virtual special issue “Protein Condensates”. *Biochemistry* **60**, 3676–3696 (2021).
136. Wegmann, S. *et al.* Tau protein liquid-liquid phase separation can initiate tau aggregation. *EMBO J.* **37**, e98049 (2018).
137. Dec, R., Jaworek, M. W., Dzwolak, W. & Winter, R. Liquid-Droplet-Mediated ATP-Trig-gered Amyloidogenic Pathway of Insulin-Derived Chimeric Peptides: Unraveling the Mi-croscopic and Molecular Processes. *J. Am. Chem. Soc.* **145**, 4177–4186 (2023).
138. Koga, S., Williams, D. S., Perriman, A. W. & Mann, S. Peptide-nucleotide microdroplets as a step towards a membrane-free protocell model. *Nat. Chem.* **3**, 720–724 (2011).
139. Fetahaj, Z., Ostermeier, L., Cinar, H., Oliva, R. & Winter, R. Biomolecular Condensates under Extreme Martian Salt Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 5247–5259 (2021).
140. Zilman, A. Aggregation, Phase Separation and Spatial Morphologies of the Assemblies of FG Nucleoporins. *J. Mol. Biol.* **430**, 4730–4740 (2018).
141. Iqbal, M. *et al.* Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its ap-plications. *Biol. Proced. Online* **18**, 18 (2016).
142. Helfrich, M. R., Mangeney-Slavin, L. K., Long, M. S., Djoko, K. Y. & Keating, C. D. Aqueous Phase Separation in Giant Vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 13374–13375 (2002).
143. Alberti, S. Phase separation in biology. *Curr. Biol. CB* **27**, R1097–R1102 (2017).
144. Bowker, M. *Nat. Mater.* 205–206 (2002).
145. Dominak, L. M. & Keating, C. D. Polymer Encapsulation within Giant Lipid Vesicles. *Langmuir* **23**, 7148–7154 (2007).

- 
146. Keating, C. D. Aqueous Phase Separation as a Possible Route to Compartmentalization of Biological Molecules. *Acc. Chem. Res.* **45**, 2114–2124 (2012).
147. Long, M. S., Jones, C. D., Helfrich, M. R., Mangeney-Slavin, L. K. & Keating, C. D. Dynamic microcompartmentation in synthetic cells. *PNAS* **102**, 5920–5925 (2005).
148. Pir Cakmak, F., Marianelli, A. M. & Keating, C. D. Phospholipid Membrane Formation Templated by Coacervate Droplets. *Langmuir* **37**, 10366–10375 (2021).
149. Andes-Koback, M. & Keating, C. D. Complete Budding and Asymmetric Division of Primitive Model Cells To Produce Daughter Vesicles with Different Interior and Membrane Compositions. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 9545–9555 (2011).
150. Long, M. S., Cans, A.-S. & Keating, C. D. Budding and Asymmetric Protein Microcompartmentation in Giant Vesicles Containing Two Aqueous Phases. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 756–762 (2008).
151. Garcia, A., Pochinda, S., Elgaard-Jørgensen, P. N., Khandelia, H. & Clarke, R. J. Evidence for ATP Interaction with Phosphatidylcholine Bilayers. *Langmuir* **35**, 9944–9953 (2019).
152. Lu, T. *et al.* Endocytosis of Coacervates into Liposomes. *J. Am. Chem. Soc.* **144**, 13451–13455 (2022).

# 7. Anhang

## 7.1. Weitere Abbildungen

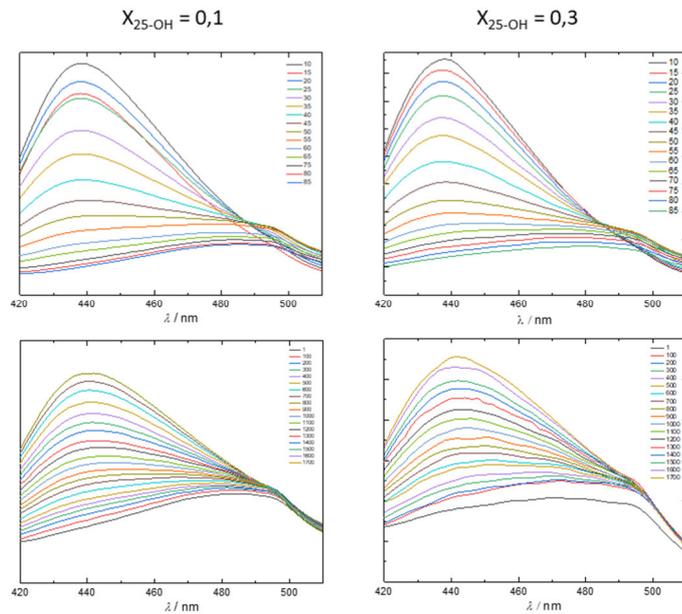


Abb. 7.1: Die aufgenommenen Fluoreszenzspektren für das Fünfkomentensystem mit unterschiedlichen Stoffmengenanteilen von 25-Hydroxycholesterol in Abhängigkeit der Temperatur (oben) und in Abhängigkeit des Drucks bei 80 °C (unten).

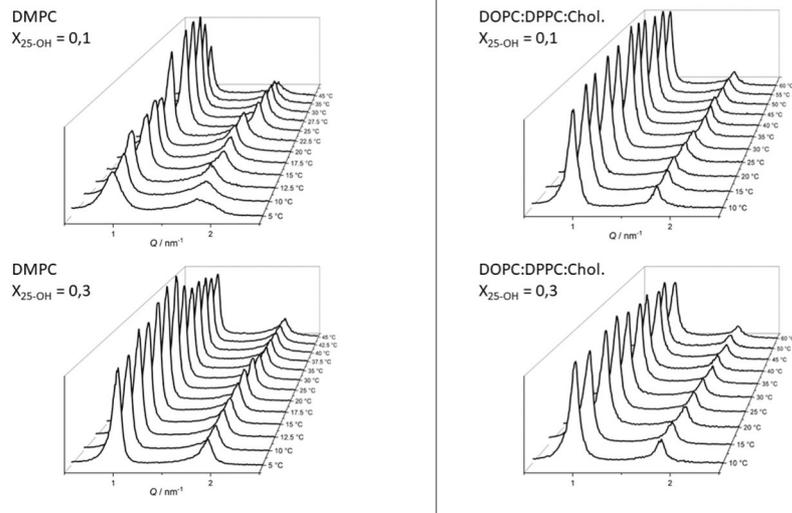


Abb. 7.2: Die gemessenen Streukurven des Einkomentensystems (links) und des Dreikomponentensystems (rechts) mit unterschiedlichen Stoffmengenanteilen von 25-Hydroxycholesterol in Abhängigkeit der Temperatur.

## 7.1. Weitere Abbildungen

---

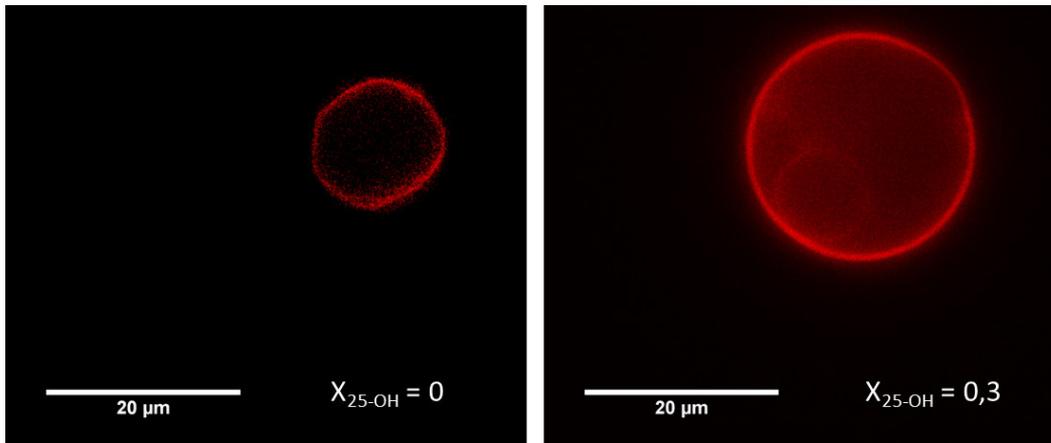


Abb. 7.3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von DMPC Vesikel mit verschiedenen Stoffmengenanteil von 25-Hydroxycholesterol  $X_{25\text{-OH}} = 0$  (links) und 0.3 (rechts) bei 24°C. rot:  $l_d$  Phase/ schwarz:  $l_o$  Phase. Skalenleiste: 20  $\mu\text{m}$ .

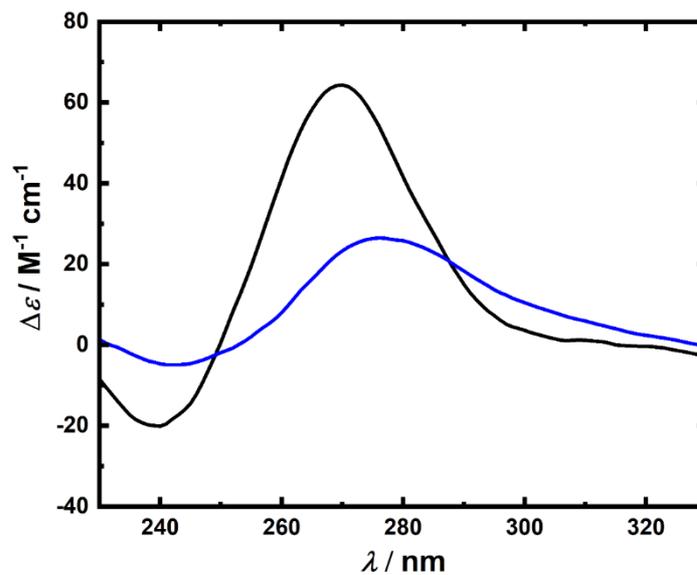


Abb. 7.4: Aufgenommene CD-Spektrum vom RG-1 bei einer Temperatur von 25 °C (schwarz) und bei einer Temperatur von 75 °C (blau).

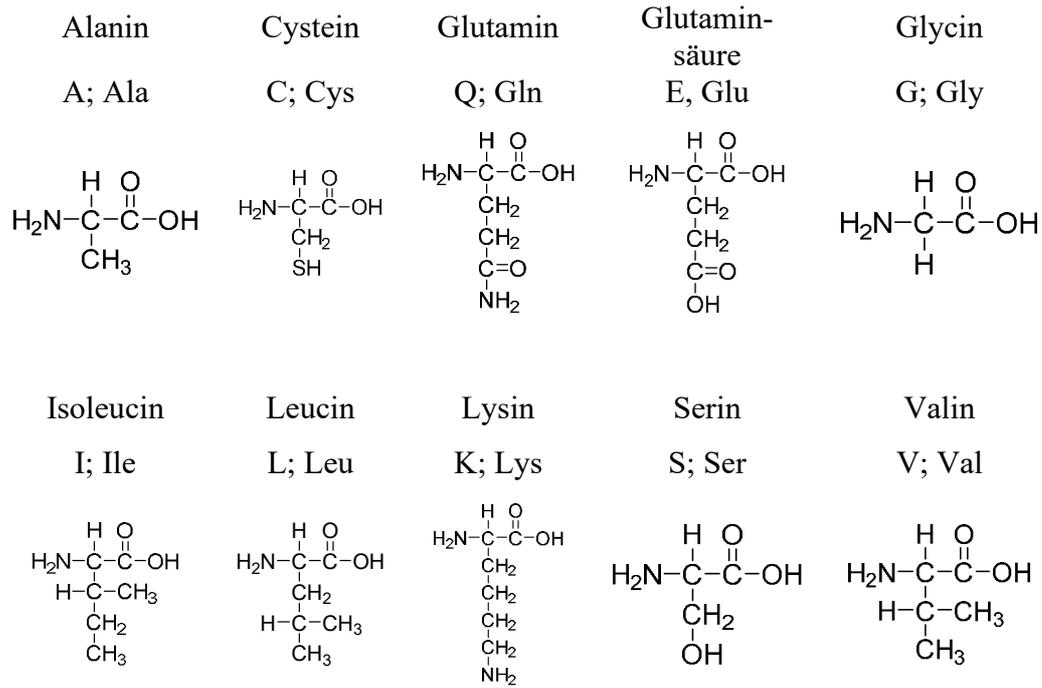


Abb. 7.5: Strukturformel der Aminosäuren Alanin, Cystein, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Serin und Valin.

## 7.2. Abbildungsverzeichnis

---

### 7.2. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1: Struktureller Aufbau der Membranlipide unterteilt in Phosphoglyceride und Phosphosphingo-lipide (Grundgerüst in blau). Die Variation der Kopfgruppen, als Beispiele Phosphatidylglycerin (PG) und Phosphatidylcholin (PC) dargestellt, fördert die strukturelle Diversität..... 6
- Abb. 1.2: Der kritische Packungsparameter  $CCP = VA \cdot l$  bestimmt die Form der gebildeten Aggregate aus den Lipiden. Kegelförmige Lipide bilden Mizellen ( $CCP < 1/3$ ), zylinderförmige Lipide bilden planare Doppelschichten ( $CCP = 0,5-1$ ) und kegelstumpfförmige Lipide bilden inverse Mizellen ( $CCP < 1$ ) aus. Die Fähigkeit, unterschiedliche Aggregatformen auszubilden, wird Polymorphismus genannt. Aus <sup>[6]</sup> dargestellt und modifiziert. .... 7
- Abb. 1.3: Schematische Übersicht über Makrostrukturen der Lipidsysteme. A) Lipiddoppelschicht, B) unilamellare Vesikel, die nach ihrer Größe klassifiziert werden können und C) multilamellare Vesikel, die aus vielen lamellaren Lipidschichten bestehen. Aus <sup>[6]</sup> dargestellt und modifiziert..... 8
- Abb. 1.4: Schematische Darstellung der temperatur- und druckabhängigen lamellaren Lipidphasen in wässrigem Medium. Bei niedriger Temperatur liegt die Doppelschicht in der Gelphase  $L_{\beta}$ , auch  $s_o$  (*solid ordered*) genannt, vor. Bei einer Erhöhung der Temperatur gelangt die Doppelschicht in die Phase  $P_{\beta}$ , eine periodisch gewellte Gelphase. Eine weitere Temperaturerhöhung führt beim Hauptübergang in die fluide Phase  $L_{\alpha}$  Phase, auch  $l_d$  (*liquid disordered*) genannt. Der Zusatz von Cholesterol führt zu einer Verbreiterung des Hauptphasenübergangs; es erfolgt die Ausbildung einer weiteren Phase  $l_o$  (*liquid ordered*) bei hohen Cholesterolkonzentrationen. Aus <sup>[6]</sup> dargestellt und modifiziert. .... 9
- Abb. 1.5: A) Chemische Struktur von dem Nucleotid Adenosin-5'-triphosphat, ATP, mit den drei Bausteinen: einem Phosphatrest der Phosphorsäure, einem Fünffachzucker (2'-Desoxyribose) und einer von vier Basen (Adenin). B) Das Basenpaar Guanin und Cytosin, die durch Wasserstoffbrückenbindungen miteinander wechselwirken. C) Die schematische Darstellung eines Einzelstrang und einer Doppelhelix, welche durch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen Adenin (A)  und Thymin (T)/Uracil (U)  und den Basen Guanin (G)  und Cytosin (C)  stabilisiert wird. Aus <sup>[6]</sup> dargestellt und modifiziert. .... 11
- Abb. 1.6: A) Dipeptid aus zwei Aminosäuren, in diesem Beispiel zwei Lysinen. B) Übersicht der Proteinstrukturen; die Reihenfolge der Aminosäuren (Darstellung als Kreise)

---

definiert die Primärstruktur, räumliche Strukturen eines lokalen Bereich im Protein sind Sekundärstrukturen, in diesem Beispiel eine $\alpha$ -Helix und die Zusammenlagerung mehrerer Sekundärstrukturen bildet die Tertiärstruktur <sup>31</sup> der Proteine.....	13
Abb. 3.1: Die chemische Strukturen der Oxidationsprodukte von Cholesterol: $7\beta$ -Hydroxycholesterol ( $7\beta$ -OH), 25-Hydroxycholesterol (25-OH) und 24S-Hydroxycholesterol (24-OH). Die Oxidationsprodukte entstehen sowohl durch enzymatischen Reaktionen, wie z.B. 24-OH als auch durch Autooxidation, wie z.B. ( $7\beta$ -OH). Das 25-OH kann aus beiden Reaktionswegen hervorgehen.....	19
Abb. 3.2 Explosionsdarstellung (links) und Querschnitt (rechts) der Mikroskopie-Hochdruckzelle ( a: Zellkörper; b: Oberer Stempel; c: Obere Stempelmutter; d: Diamantfenster; e: O-Ring; f: Deckglas; g: PTFE-Ring; h: Unterer Stempel und i: Untere Stempelmutter). Aus <sup>[71]</sup> dargestellt und modifiziert. ....	25
Abb. 3.3: Einfluss der Temperatur auf die generalisierte Polarisierung $GP$ des A) Einkomponentensystems DMPC, B) Dreikomponentensystems DOPC:DPPC:Chol. (1:2:1) und C) Fünfkomponentensystems DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:Chol. (45:20:25:5:5) [ab 60 °C Messdaten von Kurve $X_{25-OH} = 0$ von Bornemann et al. <sup>40</sup> ] mit verschiedenen Stoffmengenanteilen von 25-Hydroxycholesterol $X_{25-OH} = 0$ (schwarz), 0,1 (hellblau) und 0,3 (dunkelblau). ....	27
Abb. 3.4: Analyse des Einflusses des Drucks auf den $GP$ -Wert von A) dem Einkomponentensystem DMPC bei $T = 40$ °C, B) dem Dreikomponentensystem DOPC:DPPC:Chol. bei $T = 60$ °C und C) dem Fünfkomponentensystem bei $T = 80$ °C mit verschiedenen Stoffmengenanteilen an 25-Hydroxycholesterol $X_{25-OH} = 0$ (schwarz), 0,1 (hellblau) und 0,3 (dunkelblau). ....	29
Abb. 3.5: Auftragung der lamellaren Schichtdicke $d$ gegen die Temperatur A) des Einkomponentensystems DMPC und B) des Dreikomponentensystems DOPC:DPPC:Chol. mit verschiedenen Stoffmengenanteilen an 25-Hydroxycholesterol: $X_{25-OH} = 0$ (schwarz), 0,1 (hellblau) und 0,3 (dunkelblau). ....	31
Abb. 3.6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Dreikomponentensystem DOPC:DPPC:Chol.(1:2:1) in Abhängigkeit der Temperatur mit verschiedenen Stoffmengenanteilen von 25-Hydroxycholesterol $X_{25-OH} = 0$ , 0,1 und 0,3; rot: $l_d$ Phase / schwarz: $l_o$ Phase. Skalenleiste: 20 $\mu$ m. ....	34
Abb. 3.7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Dreikomponentensystem DOPC:DPPC:Chol. (1:2:1) in Abhängigkeit des Druckes ( $T = 50$ °C) mit verschiedenen	

## 7.2. Abbildungsverzeichnis

---

- Stoffmengenanteilen von 25-Hydroxycholesterol:  $X_{25\text{-OH}} = 0, 0,1$  und  $0,3$ ; rot:  $l_d$  Phase / schwarz:  $l_o$  Phase. Skalenleiste:  $20 \mu\text{m}$ . ..... 35
- Abb. 3.8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Fünfkomponentensystem. in Abhängigkeit A) der Temperatur beziehungsweise B) des Druckes ( $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$ ) mit verschiedenen Stoffmengenanteil von 25-Hydroxycholesterol  $X_{25\text{-OH}} = 0, 0,1$  und  $0,3$ ; rot:  $l_d$  Phase/ schwarz:  $l_o$  Phase. Skalenleiste:  $20 \mu\text{m}$ . ..... 37
- Abb. 4.1: Schematische Darstellung der planaren Anordnung von vier Guanin-Molekülen (Tetrad). Die Guanin-Moleküle werden durch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen, als gestrichelte Linie verdeutlicht, sowie durch die Wechselwirkungen mit Kationen (+), die sich im zentralen Kanal der Quadruplexe befinden, stabilisiert. Als Kationen können Natrium- und Kaliumionen zum Einsatz kommen..... 41
- Abb. 4.2: Schematische Darstellung der drei möglichen Strukturen eines G-Quadruplexes, die sich in der Ausrichtung der Stränge und Schleifenstrukturen unterscheiden. Parallel: Vier Stränge in derselben Ausrichtung; antiparallel: zwei Stränge in entgegengesetzter Ausrichtung zu den beiden anderen Strängen und hybrid: ein Strang in entgegengesetzter Ausrichtung zu dem anderen Strängen. .... 42
- Abb. 4.3: Chemische Struktur des pflanzlichen Isochinolin-Alkaloids Berberin. Dieses planare Ligandenmolekül bindet an den G-Quadruplex und besitzt antivirale, anti-allergische und entzündungshemmende Eigenschaften..... 43
- Abb. 4.4: UV/Vis-Absorptionsspektren einer  $250 \mu\text{M}$  Berberinlösung bei steigenden Konzentrationen an RG-1 [ $0 \mu\text{M}$  (schwarz),  $10 \mu\text{M}$  (rot),  $20 \mu\text{M}$  (dunkelblau),  $40 \mu\text{M}$  (grün),  $60 \mu\text{M}$  (violett),  $80 \mu\text{M}$  (orange),  $100 \mu\text{M}$  (hellblau) und  $150 \mu\text{M}$  (pink)] in A)  $100 \text{ mM}$  Natriumchlorid und in B)  $100 \text{ mM}$  Kaliumchlorid bei  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ..... 47
- Abb. 4.5: Job's Plot für den Komplex Berberin/RG-1 in A)  $100 \text{ mM}$  NaCl beziehungsweise B)  $100 \text{ mM}$  KCl bei  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $1 \text{ bar}$ . Die Gesamtkonzentrationen der beiden Komponenten betrug  $60 \mu\text{M}$ . Die Anregungswellenlänge war  $443 \text{ nm}$  und die Fluoreszenzintensität wurde bei der Wellenlänge  $536 \text{ nm}$  aufgenommen. .... 49
- Abb. 4.6: Bindungsisotherme für den Komplex Berberin/RG-1 in A)  $100 \text{ mM}$  Natriumchlorid beziehungsweise B) Kaliumchlorid bei  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$  und  $1 \text{ bar}$ . Die blauen Linien stellen die beste Anpassung der experimentellen Daten nach einem äquivalenten und unabhängigen Bindungsstellenmodell mit der Stöchiometrie 2:1 Berberin:RG-1 dar. Die Berberinkonzentration beträgt  $15 \mu\text{M}$  und die Konzentration an RG-1 variierte zwischen

---

0 und 40 $\mu\text{M}$ . Die Anregungswellenlänge betrug 443 nm und die Emissionswellenlänge 536 nm, bei der die Intensität aufgenommen wurde. ....	50
Abb. 4.7: Zirkulardichroismus-Spektren für das RG-1 in A) 100 mM NaCl beziehungsweise in B) KCl in Anwesenheit von Berberin (rot) und in Abwesenheit von Berberin (schwarz) bei $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ und 1 bar.....	51
Abb. 4.8: Bindungsisotherme für den Komplex Berberin/RG-1 in A) 100 mM NaCl beziehungsweise B) 100 mM KCl bei $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ und 1 bar (schwarz), 500 bar (rot), 1000 bar (blau), 1500 bar (grün), and 1900 bar (violett). Die Linien stellen die beste Anpassung der experimentellen Daten nach einem äquivalenten und unabhängigen Bindungsstellenmodell mit der Stöchiometrie 2:1 = Berberin:RG-1 dar. Die Berberinkonzentration beträgt 15 $\mu\text{M}$ und die Konzentration von RG-1 variierte zwischen 0 und 40 $\mu\text{M}$ . Die Anregungswellenlänge betrug 443 nm und die Emissionswellenlänge 536 nm, bei der die Intensität aufgenommen wurde.....	53
Abb. 4.9: Auftragung des natürlichen Logarithmus von $K_b$ gegen den Druck für die Komplexbildung zwischen Berberin und RG-1 in Gegenwart von 100 mM NaCl (schwarz) und 100 mM KCl (blau). ....	55
Abb. 5.1: Assoziative Flüssig-Flüssig-Phasentrennung dargestellt A) anhand einer mikroskopische Aufnahme beider Phasen von einem Protein B) anhand eines Schemas, wobei 1) beide Komponenten beziehungsweise 2) eine einzig gelöste Komponente, die durch Assoziation in der Lage sind, eine dichte Tröpfchenphase auszubilden. Aus <sup>[129]</sup> dargestellt und modifiziert.....	62
Abb. 5.2: Schematische Darstellung des Peptids $\text{ACC}_{1-13}\text{K}_n$ , welches aus dem Fragment der A-Kette des Insulins ( $\text{ACC}_{1-13}$ ) und dem Oligolysin Segment ( $\text{K}_n$ ) mit unterschiedlicher Kettenlänge ( $n = 8, 16, 24, 32$ und $40$ ) besteht. Das Fragment der A-Kette besteht aus 13 Aminosäuren; G = Glycin, I = Isoleucin, V = Valin, E = Glutaminsäure, Q = Glutamin, C = Cystein, A = Alanin, S = Serin und L = Leucin. <sup>137</sup> .....	63
Abb. 5.3: Segregative Flüssig-Flüssig-Phasentrennung dargestellt A) anhand einer mikroskopische Aufnahme beider Phasen und B) einem Schema mit zwei Phasen, in denen jeweils einer der beiden Komponenten (lila/ gelb) dominiert. Aus <sup>[129]</sup> dargestellt und modifiziert. ....	64
Abb. 5.4: Schematische Darstellung der beiden Prozesse zum Tröpfchenwachstum. A) Bei der Fusion bilden zwei Tröpfchen über eine Zwischenform ein größeres sphärisches Tröpfchen. B) Bei der Ostwald-Reifung findet ein Materialaustausch zwischen zwei	

## 7.2. Abbildungsverzeichnis

---

- Tröpfchen statt, wobei ein Tröpfchen wächst und das andere kleiner wird. Das Resultat ist ein größeres Tröpfchen wie bei der Fusion. Aus <sup>[144]</sup> dargestellt und modifiziert. .... 65
- Abb. 5.5: A) Schematische Darstellung eines Phasendiagrammes eines wässrigen Zwei-Phasen-Systems und B) Phasendiagramm des PEG-Dextran-Systems, bei denen die Gewichtskonzentrationen beider Komponenten gegeneinander aufgetragen sind. Die Binodale (rote Kurve) trennt das Diagramm in zwei Bereiche. Oberhalb der Kurve befindet sich das wässrige Zwei-Komponenten-System im zweiphasigen Zustand, unterhalb im einphasigen Zustand. Aus <sup>[141]</sup> dargestellt und modifiziert..... 66
- Abb. 5.6: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Mischungen ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> und ATP in Abhängigkeit der Zeit. Nach einer Stunde wurden ThT fluoreszierende Aggregate erfasst, die unter den jeweiligen lichtmikroskopischen Aufnahmen dargestellt sind. .... 73
- Abb. 5.7: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Mischung kleiner unilamellarer Vesikel des Dreikomponentensystems (DOPC:DPPC:Chol.; 1:2:1) mit ATP und ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> in Abhängigkeit der Zeit. Nach einem Tag wurden ThT fluoreszierende Aggregate sowie nicht fluoreszierende Aggregate erfasst, die unter den jeweiligen lichtmikroskopischen Aufnahmen (oben) dargestellt sind. .... 74
- Abb. 5.8: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Mischung kleiner unilamellarer Vesikel des Fünfkomponentensystems (DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:DPPC; 20:5:45:5:25) und ATP und ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> in Abhängigkeit der Zeit. Nach einem Tag wurden ThT fluoreszierende Aggregate sowie nicht fluoreszierende Aggregate erfasst, die unter den jeweiligen lichtmikroskopischen Aufnahmen dargestellt sind. .... 75
- Abb. 5.9: Lichtmikroskopische Aufnahmen nach 22 Stunden der Mischungen von A) kleiner unilamellarer Vesikel (SUV) des Dreikomponentensystems (DOPC:DPPC:Chol.; 1:2:1) und ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> B) SUVs des 3KS und ATP C) SUVs des Fünfkomponentensystems (DOPC:DOPG:DPPC:DPPG:DPPC; 20:5:45:5:25) und ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> und D) SUVs des 5Ks und ATP, ..... 76
- Abb. 5.10: Schematische Darstellung der verschiedenen Stufen A) keiner und B) einer teilweisen Benetzung der Vesikel durch die Tröpfchen, sowie C) einer vollständigen Aufnahme in das Zellinnere (Endozytose), welche abhängig von der Stärke der Wechselwirkung zwischen der Membran und den Komponenten der proteinhaltigen Tröpfchen ist. .... 77
- Abb. 5.11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Mischungen aus A) 3KS (GUV) und ATP und ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> und B) 5KS (GUV) und ATP und ACC<sub>1-13</sub>K<sub>32</sub> in Abhängigkeit der

---

Zeit. Bis zu 60 Minuten wurde die $l_d$ Phase (rot) der Vesikel dargestellt. Nach 22 Stunden wurden ThT fluoreszierende Aggregate (grün) erfasst. ....	78
Abb. 5.12: Erhaltene ATPS-haltige GUVs (DOPG:DPPG:DOPC:Chol:DPPC; 5:5:20:25:45) nach der PVA-Methode bei Raumtemperatur. Die blaue Farbe zeigt die Dextranreiche-Phase, die rote Farbe die $l_d$ und die grüne Farbe die $l_o$ -Phase. Skalierbalken: 10 $\mu\text{m}$ .....	79
Abb. 5.13: ATPS-haltige GUVs (DOPG:DPPG:DOPC:Chol:DPPC; 5:5:20:25:45) nach der Elektroformationsmethode bei Raumtemperatur. Die blaue Farbe zeigt die Dextranreiche-Phase, die rote Farbe die $l_d$ und die grüne Farbe die $l_o$ -Phase. Skalierbalken: 10 $\mu\text{m}$ .....	80
Abb. 5.14: Temperaturabhängige Untersuchung des anionischen Fünfkomponentensystems eingekapselt mit der 4,6 kDa PEG/ 10kDa Dextran Mischung. rot entspricht <i>N</i> -Rh DHPE = $l_d$ Phase-Marker, grün entspricht NBD DHPE = $l_o$ Phase-Marker und blau entspricht Dextran-Alexa647 = Dextranreiche-Phase-Marker.....	81
Abb. 5.15: Zugabe einer 4,6 kDa PEG/ 10kDa Dextran Mischung (jeweils 0,5 wt%) zu den anionischen (DOPG:DPPG:DOPC:Chol:DPPC; 5:5:20:25:45) Vesikeln, die daraufhin temperaturabhängig untersucht wurden sind. ....	82
Abb. 7.1: Die aufgenommenen Fluoreszenzspektren für das Fünfkomponentensystem mit unterschiedlichen Stoffmengenanteilen von 25-Hydroxycholesterol in Abhängigkeit der Temperatur (oben) und in Abhängigkeit des Drucks bei 80 °C (unten).....	I
Abb. 7.2: Die gemessenen Streukurven des Einkomponentensystems (links) und des Dreikomponentensystems (rechts) mit unterschiedlichen Stoffmengenanteilen von 25-Hydroxycholesterol in Abhängigkeit der Temperatur.....	I
Abb. 7.3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von DMPC Vesikel mit verschiedenen Stoffmengenanteil von 25-Hydroxycholesterol $X_{25\text{-OH}} = 0$ (links) und 0.3 (rechts) bei 24°C. rot: $l_d$ Phase/ schwarz: $l_o$ Phase. Skalenleiste: 20 $\mu\text{m}$ . ....	II
Abb. 7.4: Aufgenommene CD-Spektrum vom RG-1 bei einer Temperatur von 25 °C (schwarz) und bei einer Temperatur von 75 °C (blau).....	II
Abb. 7.5: Strukturformel der Aminosäuren Alanin, Cystein, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Serin und Valin. ....	III