Untersuchungen zum Einfluß freier Fettsäuren auf die Eigenschaften biologischer und Modellmembranen

elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)

der Martin-Luther-Universität

von Herrn Volker Oberle

geb. am: 01.02.1965 in: Freiburg i. Br.

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Schubert, Freiburg

2. Prof. Dr. R. Ulbrich-Hoffmann, Halle

3. Doz. Dr. U. Rothe, Halle

Halle (Saale), 20.01.1999

1 EINFÜHRUNG 5

2 PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN VON FETTSÄUREN: LÖSLICHKEIT, DISSOZIATIONSVERHALTEN, PHASENZUSTÄNDE 12

2.1 BESTIMMUNG DER LÖSLICHKEIT AUSGEWÄHLTER FETTSÄUREN 12

3 EINBAU VON FETTSÄUREN IN MODELL- UND ZELLMEMBRANEN 18

3.1 MESSUNG DER EINBAUGESCHWINDIGKEIT IN MEMBRANEN 18
3.1.1 Einbaugeschwindigkeit von Parinarsäure in Modellmembranen 18
3.1.2 Einbaugeschwindigkeit von Parinarsäure in Zellmembranen 23
3.2 BESTIMMUNG DER EINBAUMENGE VON FETTSÄUREN IN PHOSPHOLIPIDBILAYER MITTELS KAPILLARELEKTROPHORESE. 31
3.3 BESTIMMUNG DES WÄRMEEFFEKTS BEIM FETTSÄUREEINBAU IN MODELLMEMBRANEN DURCH ISOTHERMALE TITRATIONSKALORIMETRIE (ITC). 35

4 BESTIMMUNG DER FLIP-FLOP GESCHWINDIGKEIT VON FETTSÄUREN IM LIPIDBILAYER DURCH POTENTIALMESSUNGEN AN BLACK-LIPID MEMBRANES (BLM) 39

5 FETTSÄURE-INDUZIERTE SCHÄDIGUNG VON MEMBRANEN 42

5.1 FETTSÄURE-INDUZIERTE SCHÄDIGUNG AN MODELLMEMBRANEN 42
5.1.1 Bestimmung der Fettsäure-induzierten Permebilitätserhöhung von Biomembranen ..42
5.1.2 Fettsäureinduzierte Fusogenität von Phospholipidvesikeln 52
5.1.3 Größenmessungen der Vesikel mit dynamischer Laserlichtstreuung 58
5.1.4 Zusammenfassung: Fettsäure-induzierte Schädigung von Modellmembranen 61
5.2 FETTSÄURE-INDUZIERTE SCHÄDIGUNG VON ZELLMEMBRANEN 63

6 BESTIMMUNG DER LATERALPHASENSEPARATION UND DER PHASENZUSTÄNDE VON PHOSPHOLIPID/FETTSÄUREMISCHUNGEN. 71

7 ENTWICKLUNG FETTSÄUREHALTIGER, NICHT FUSOGENER DONORVESIKEL 82

8 ZUSAMMENFASSUNG 86

9 LITERATUR 91

Abbildung 1: Bestimmung der Löslichkeit von Myristinsäure in Wasser 13
Abbildung 2: Bestimmung der Löslichkeit von Linolsäure in Wasser 14
Abbildung 3: Temperatur und pH-abhängige Phasenzustände von Fettsäuren aus [Cistola et al.,1986] 15
Abbildung 4: Strukturformeln von *cis*- und *trans*-Parinarsäure 18
Abbildung 5: Fluoreszenzausbeute von Parinarsäure in unterschiedlichen Lösungsmitteln 19
Abbildung 6: Abnahme des Fluoreszenzsignals von Parinarsäure infolge der Oxidation an Luft 19
Abbildung 7: Abnahme des Fluoreszenzsignals von Parinarsäure unter Lichteinfluß in Argonatmosphäre 20
Abbildung 8: Zunahme des Fluoreszenzsignals von *cis*- und *trans*-Parinarsäure beim Einbau in HSPC/PG Vesikel 22
Abbildung 9 A-D: Anstieg der Fluoreszenzintensität in HaCaT-Zellen 0, 10, 20 und 30 Minuten nach Zugabe von *cis*-Parinarsäure 26
Abbildung 10: Zeitliche Änderung des Fluoreszenzsignals nach Zugabe von *cis*-Parinarsäure zu HaCaT-Zellen 27
Abbildung 11 A-D: Anstieg der Fluoreszenzintensität in HaCaT-Zellen 0, 10, 20 und 30 Minuten nach Zugabe von *trans*-Parinarsäure 29
Abbildung 12: Zeitliche Änderung des Fluoreszenzsignals nach Zugabe von *trans*-Parinarsäure zu HaCaT-Zellen 30
Abbildung 13: Charakterisierung des Einbaus von Fettsäuren in LUV´s mittels Kapillarelektrophorese Migrationszeiten von HSPC/PG Vesikeln mit variierender Fettsäurekonzentration 34
Abbildung 14: Bestimmung der Wärmeentwicklung während des Einbaus von Fettsäuren in HSPC/PG Vesikel durch ITC bei 10 C 37
Abbildung 15: Bestimmung der Wärmeentwicklung während des Einbaus von Fettsäuren in HSPC/PG Vesikel durch ITC bei 70 C 38
Abbildung 16: Durch Senkung des pH-Wertes hervorgerufene Änderung der Potentialdifferenz einer BLM 41
Abbildung 17: Molekülstruktur von 5-6 Carboxyfluoreszein 43
Abbildung 18: Anregungs- und Emissionsspektrum von 6-CF und Prinzip des 6-CF Leakage Assays 44
Abbildung 19: Konzentrationsabhängigkeit des Stearinsäure-induzierten 6-CF Leakages aus HSPC/PG Vesikeln 46
Abbildung 20: Konzentrationsabhängigkeit des Ölsäure-induzierten 6-CF Leakages aus HSPC/PG Vesikeln 47
Abbildung 21: Konzentrationsabhängigkeit des Linolsäure-induzierten 6-CF Leakages aus HSPC/PG Vesikeln 47
Abbildung 22: 6-CF Leakage aus HSPC/PG Vesikel induziert durch Zugabe von 5mol% freier Fettsäuren 48
Abbildung 23: 6-CF Leakage aus HSPC/PG Vesikel induziert durch Zugabe von 10 mol% freier Fettsäuren 49
Abbildung 24: 6-CF Leakage aus HSPC/PG Vesikel induziert durch Zugabe von 20 mol% freier Fettsäuren 50
Abbildung 25: 6-CF Leakage aus HSPC/PG Vesikel induziert durch Zugabe von 25 mol% freier Fettsäuren 50
Abbildung 26: 6-CF Leakage aus HSPC/PG Vesikel induziert durch Zugabe von 30 mol% freier Fettsäuren 51
Abbildung 27: Maximalwerte des 6-CF Leakage aus HSPC/PG Vesikeln induziert durch die Zugabe freier Fettsäuren 52
Abbildung 28: Mechanismus der Vesikelfusion [Wilschut et al., 1988] 53
Abbildung 29: Schema des Lipidmixingassays zur Bestimmung einer Liposomenfusion 54
Abbildung 30: Nachweis der Fettsäure-induzierten Fusion von HSPC/PG Vesikeln durch Resonanzenergietransfer zwischen NBD-PE und Rhodamin-PE 57
Abbildung 31: Fettsäure-induzierte Größenänderungen von HSPC/PG Vesikeln 60
Abbildung 32: Myristinsäure-induzierte Größenänderungen von HSPC/PG Vesikeln 61
Abbildung 33: Serie fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von fluoreszenzmarkierten Rinderaugenlinsenzellen nach Zugabe von Digitonin 66
Abbildung 34: Rel. Fluoreszenzangaben bestimmter Bildareale aus Abbildung 33 67

Abbildung 35: Serie fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von fluoreszenzmarkierten Rinderaugenlinsenzellen nach Zugabe von *cis*-Linolsäure 68
Abbildung 36: Rel. Fluoreszenzangaben bestimmter Bildareale aus Abbildung 35. 69
Abbildung 37: Schematische Darstellung einer Fluoreszenzfilmwaage nach dem Wilhelmyprinzip 72
Abbildung 38: Druck/Flächendiagramm eines Lipidmonolayers bei konstanter Temperatur 73
Abbildung 39: Domänenstruktur in einem DMPE Monolayer im L_C/L_E -Mischbereich 74
Abbildung 40: Druck/Flächendiagramm eines DMPE Monolayers mit verschiedenen Myristinsäurezumischungen bei konstanter Temperatur 75
Abbildung 41: Ausschnitt aus einem Phasendiagramm von Myristinsäure/DMPE Monolayern bei 25°C. 75
Abbildung 42: Domänenstruktur in einem DMPE Monolayer mit 10 mol% Myristinsäurezumischung im L_C/L_E -Mischbereich 76
Abbildung 43: Domänenstruktur in einem DMPE Monolayer mit 20 mol% Myristinsäurezumischung im L_C/L_E -Mischbereich 77
Abbildung 44: Druck/Flächendiagramm eines DMPE Monolayers mit verschiedenen Stearinsäurezumischungen bei konstanter Temperatur 77
Abbildung 45: Ausschnitt aus einem Phasendiagramm von Stearinsäure/DMPE Monolayern bei 25°C.78
Abbildung 46: Domänenstruktur in einem DMPE Monolayer mit 10 mol% Stearinsäurezumischung im L_C/L_E -Mischbereich 78
Abbildung 47: Domänenstruktur in einem DMPE Monolayer mit 20 mol% Stearinsäurezumischung im L_C/L_E -Mischbereich 79
Abbildung 48: Druck/Flächendiagramm eines DMPE Monolayers mit verschiedenen Linolsäurezumischungen bei konstanter Temperatur 80
Abbildung 49: Ausschnitt aus einem Phasendiagramm von Linolsäure/DMPE Monolayern bei 25°C. 80
Abbildung 50: Domänenstruktur in einem DMPE Monolayer mit 10 mol% Linolsäurezumischung im L_C/L_E -Mischbereich 81
Abbildung 51: Effekt von 20 mol% *cis*-Linolsäure auf die Fusion von durch PEG-PE geschützten HSPC/PG Vesikel. 83
Abbildung 52: Linolsäure-induzierter 6-CF-Efflux aus durch PEG-PE geschützte HSPC/PG Vesikel und aus ungeschützten HSPC/PG Vesikeln. 84
Abbildung 53: Fusion von HSPC/PG Vesikel durch Linolsäure aus fettsäurehaltigen durch PEG-PE geschützten HSPC/PG Donorliposomen 84

1

Einführung

Fettsäuren sind ubiquitäre Bestandteile aller lebenden Organismen auf unserem Planeten. Sie haben verschiedene Funktionen. So findet man sie als strukturbildende Bestandteile in den Lipiden, wobei die Phospholipide die Hauptfraktion in biologischen Membranen darstellen. Zugleich sind Fettsäuren als Nahrungsbestandteil Träger von chemischer Energie, die beim Fettsäureabbbau in ATP umgewandelt wird. Zunehmend wird auch eine Funktion als Botenstoff bei verschiedenen Signalstransduktionsabläufen in der Zelle diskutiert [GRABER et al., 1994; GLATZ et al., 1995; SIAFAKA-KAPADAI, 1997].

Die Eigenschaften von Lipiden werden im Wesentlichen von der Art der ihnen zugrundeliegenden Fettsäuren bestimmt. So werden Schmelzpunkt, molekularer Platzbedarf und das Wirken von intermolekularen Kräften zwischen Lipiden durch die Art ihrer Fettsäureketten determiniert. Die Fettsäureeigenschaften bestimmen darüber hinaus makroskopisch die Ausbildung und die Charakteristik biologischer Membranen. Membranen sind verantwortlich für die Trennung von Reaktionsräumen im lebenden Organismus. Sie ermöglichen durch Schaffung und Erhaltung von Konzentrationsgefällen die Energieversorgung der Zellen. Durch eine Vielzahl membran-incorporierter Proteine ist die Biomembran zugleich Reaktionsmatrix für enzymatische Reaktionen und nicht zuletzt stellt sie einen mechanischen Schutz der Zelle dar.

Eine weitere wichtige biologische Aufgabe erfüllen die Fettsäuren durch ihre Energiespeicher-funktion, wobei sie in Form von Fetten und Ölen in dafür spezialisierten Zellen eingelagert werden. Fette und Öle sind gemischte Glycerinester höherer Fettsäuren. Die biologische Bedeutung der Fette erklärt sich dabei aus ihrem hohen physiologischen Brennwert: Bei der Verbrennung von 1 g Fett werden 38 39 kJ (9 9,2 kcal) Energie frei. Die verbrennung von 1 g Kohlenhydrat od. Eiweiß ergibt dagegen nur 17 19 kJ (4 4,5 kcal). Die wasserunlöslichen Fette stellen damit den konzentriertesten und beständigsten natürlichen Reserve- und „Brennstoff“ dar. Nach der Abspaltung der einzelnen Fettsäuren vom Glycerin durch Lipasen, werden sie in den Mitochondrien durch eine Abfolge enzymkatalysierter Reaktionen (β-Oxidation) letztlich in weiterverwertbares AcetylCoA und Wasserstoff (in Form von NADH bzw. FADH) gespalten. Die freiwerdende Energie wird in Form von ATP gespeichert.

Die Fettsäureaktivierung beginnt mit der Bindung an Coenzym-A an der äußeren Mitochondrienmembran. Dieser aktivierte Thioester wird mit Hilfe von Carnitin und einer

Translokase auf die innere Seite der mitochondrialen Matrix transportiert. Dort findet die Fettsäureoxidation in separaten Schritten statt.

1. Schritt: Acyl-CoA + E-FAD $\rightarrow$ *trans*- 2-Enoyl-CoA + E-$FADH_2$
Dieser Schritt wird durch Acyl-CoA-Dehydrogenasen verschiedener Kettenlängenspezifität katalysiert.

2. Schritt: *trans*- 2 Enoyl-CoA + $H_2O \leftrightharpoons$ L-3-Hydroxyacyl-CoA
Für diesen Schritt ist das Enzym Enoyl-CoA-Hydratase (auch als Crotonase oder 3 Hydroxyacyl-CoA-Hydrolase bezeichnet) verantwortlich.

3. Schritt: L-3-Hydroxyacyl-CoA +$NAD^+ \leftrightharpoons$ 3-Ketoacyl-CoA +NADH + H^+
Diesen Reaktionsschritt katalysiert die L-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase.

4. Schritt: 3-Ketoacyl-CoA +CoA $\leftrightharpoons$ Acetyl-CoA + AcylCoA (verkürzt um C_2)
An diesem letzten Schritt ist die β-Ketothiolase (auch als Thiolase bezeichnet) beteiligt.

Das verkürzte Acyl CoA durchläuft die einzelnen Abbaureaktionsschritte solange bis, im Falle von Fettsäuren mit geradzahliger Kohlenstoffkette, das Endprodukt Acetyl-CoA vorliegt. Bei ungeradzahligen Ketten entsteht im letzten Schritt Propionyl-CoA.
Am Abbau von ungesättigten Fettsäuren sind außerdem eine Isomerase sowie eine Epimerase beteiligt. Die Isomerase katalysiert die Umwandlung von *cis*-Doppelbindungen in *trans*-Doppelbindungen. Die Epimerase überführt das D-Isomer des 3-Hydroxyacyl-CoA in ein L-Isomer, welches als Substrat von der L-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase genutzt werden kann.
Unter Energieaufwand ist der menschliche Organismus in der Lage, die wichtigsten Fettsäuren zu synthetisieren. Die Fettsäuresynthese findet im Cytosol unter Verbrauch von NADPH + H^+ statt. Katalysiert werden die Reaktionen von der Fettsäuresynthase, einem Multienzymkomplex. Als Endprodukt entsteht in der Regel Palmitat. Für die Kettenverlängerung und zur Einführung von Doppelbindungen in die synthetisierten Fettsäuremoleküle sind zusätzliche Enzyme nötig. Diese Enzyme kommen nicht in allen Organismen vor. Im Säuger ist z.B. kein Enzym zur Einführung von Doppelbindungen nach dem C-9 der Fettsäurekette vorhanden. Fettsäuren wie z.B. Linolsäure, Linolensäure und

Arachidonsäure müssen demzufolge mit der Nahrung aufgenommen werden. Man bezeichnet sie deshalb als essentielle Fettsäuren.

Eine der essentiellen Fettsäuren, die Arachidonsäure, dient als Ausgangsstoff für die Synthese von Prostaglandinen und Leukotrienen [STEINHILBER, 1994]. Die Bildung der Prostaglandine beginnt mit der Umwandlung von Arachidonsäure in die Endoperoxide PGG_2 und PGH_2. Katalysiert wird diese Reaktion durch eine mikrosomale Cyclooxygenase. Aus PGH_2 entstehen durch verschiedene Isomerisierungen PGD_2, PGE_2, Thromboxan A_2 oder PGI_2 (Prostacyclin). Aus PGD_2 und PGE_2 kann unter Einwirkung von Reduktasen PGF_{2a} entstehen. Während die Bildung der Prostaglandine und Thromboxane durch das Enzym Cyclooxygenase initiiert wird, benötigt die Leukotrien-Biosynthese die Einwirkung der 5-Lipoxygenase. Prostaglandine und Leukotriene werden nicht wie andere Hormone in Zellen gespeichert, sondern bei Bedarf jeweils neu gebildet. Diese sogenannten Gewebshormone entwickeln schon in sehr kleinen Mengen eine große biologische Wirksamkeit. Sie spielen eine Rolle bei der Neurotransmission, bei der Auslösung und Empfindung von Schmerz, der Regulation der Körpertemperatur, dem Geburtsvorgang und der Blutdruckregulation.

Auch bei der Phospholipidsynthese, die an bzw. in biologischen Membranen abläuft, dienen aktivierte Fettsäuren als Metabolite. Fettsäuren werden aus Phospholipiden abgespalten und von einem Phospholipid auf ein anderes übertragen. Die Abspaltungsreaktionen (Deacylierungen) werden von Phospholipasen A katalysiert, die je nach Abspaltungsort am Glycerol als Phospholipase A_1 oder A_2 bezeichnet werden. Die Übertragungsreaktionen, Transacylierung bzw. die Verknüpfung einer Fettsäure mit der glycerolhaltigen Kopfgruppe, werden von Transac(et)ylasen katalysiert. Sie spielen auch bei der Übertragung der Fettsäuren auf Coenzym A beim Fettsäureabbau eine wichtige Rolle. Die Möglichkeiten zur Acylierung und Deacylierung erlauben auch die Nutzung der Membran als temporären Speicher für Fettsäuren, die dabei je nach Bedarf zum Aufbau neuer Lipide oder zur Energiegewinnung genutzt werden können.

In den Phospholipiden der Membran findet man eine Vielzahl verschiedener Fettsäuren. Dabei ist das Fettsäuremuster der Membranen in verschiedenen Organismen für diese charakteristisch und paßt sich sowohl den Gegebenheiten der Umgebung, als auch der Funktion, die das durch Lipide gebildete Kompartiment in der Zelle zu erfüllen hat, an. Z.B. kann durch eine hohe Konzentration von gesättigten Fettsäuren in den Phospholipiden die Rigidität der Membran erhöht werden, während ein hoher Anteil von ungesättigten Fettsäureketten zu einer

Fluidisierung der Membran führt. Auf diese Weise passen Organismen ihre Membranen an Hitze, Kälte, hohe Feuchtigkeit oder Trockenheit in der Umgebung an.
Während in der Literatur die ernährungsphysiologischen und zellulären Fettsäureeffekte ausführlich diskutiert wurden, hat man bisher direkte Wirkungen der freien, nichtmetabolisierten Fettsäuren in der Membran wenig untersucht. Der Fettsäure-Metabolismus dient als biochemische Regelgröße, indem die Fettsäurekonzentration in der Membran über die Metabolisierungsgeschwindigkeit gesteuert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde vorrangig die Frage untersucht, ob eine plötzliche Erhöhung des Spiegels freier Fettsäuren einen Einfluß auf die strukturelle Integrität der Zellmembran hat.
Fettsäuren in freier Form treten nur in Spuren auf. In der Nahrung liegen sie mit Glycerin verestert als Fette vor. Nach der Resorption und Hydrolyse in der Darmmucosa werden die Fettsäuren im Blut an Serumalbumin gebunden. Nach dem Transfer durch die Zellmembran werden sie in der Zelle an cytosolische Transportproteine gekoppelt.
Mit Hilfe des Serumalbumins werden auch andere hydrophobe Stoffe, wie z.B. Steroidhormone, Bilirubin und unveresterte Fettsäuren im Blut transportiert. Serumalbumin gehört zur Klasse der Globulär- oder Sphäroproteine. Es besteht aus einer Polypeptidkette und hat eine Molmasse von 66000 [DEMANT und SEHESTED, 1993]. Albumin besitzt 6 spezifische Bindungsstellen [ZAKRZEWSKI und GOCH, 1968]. Darüber hinaus können Fettsäuren auch unspezifisch an Albumin gebunden und transportieret werden [ASHBROOK et al., 1975; KENYON und HAMILTON, 1994]. Die maximal gebundene Menge kann 6-13 mol Fettsäure pro mol Albumin betragen. Im menschlichen Organismus liegt das Verhältnis normalerweise zwischen 0,5 und 2,0. In seltenen Fällen kann es bis auf 4,0 ansteigen [WATANABE und SATO, 1996]. Die Konzentration ungebundener freier Fettsäuren im Blut wird mit 7,5 nM bei einer Standardabweichung von 2,5 nM angegeben [RICHIERI und KLEINFELD, 1995].
In der Zelle sind cytoplasmatische Transportproteine, die sogenannten cytoplasmatischen FABPs (**F**atty **A**cid **B**inding **P**rotein) für die Bindung und den Transport der Fettsäuren verantwortlich [OCKNER und MANNING, 1976]. FABP´s gehören zu einer Genfamilie lipidbindender Proteine mit einer Größe von 14-15 kDa. Die nach dem Gewebetyp ihrer Herkunft benannten Proteine besitzen eine Bindungsstelle, mit Dissoziationskonstanten von 2-1000 nM, je nach Protein und gebundener Fettsäure. Neben der Transportfunktion wurden weitere Aufgaben der FABPs beschrieben. So sind sie z.B. für die Regulation lokaler Fettsäurekonzentrationen in der Zelle verantwortlich. Bei Säugern nehemn sie extrazellulär Einfluß auf Wachstum und Differenzierung von Epithelzellen und induzieren eine Myocyten-

Hypertrophie nach Bindung an den korrespondierenden Rezeptor [VAN NIEUWENHOVEN et al., 1996]. Auch am Transport von Fettsäuren durch Zellmembran wird eine Beteiligung von FABPs diskutiert. Allerdings postuliert man hier andere als die bisher im Cytosol beschriebenen Proteine. Sie sollen membrangebunden sein und eine „Translokase“-Funktion für langkettige Fettsäuren übernehmen. Bisher wurde noch nicht geklärt, ob tatsächlich ein proteinabhängiges Transportsystem [SCHÜRER et al.,1994] für langkettige Fettsäuren benötigt wird oder ob Fettsäuren ausschliesslich diffusiv [COOPER et al., 1987] die Membranen überwinden. Klar ist dagegen, daß FABPs Fettsäuren binden, und eine hohe Affinität zur Plasmamembran besitzen. Daß Proteine an der Aufnahme von Fettsäuren beteiligt sind, begründet noch nicht die Notwendigkeit eines Transportsystems. In der vorliegenden Arbeit wird am proteinfreien Modellsystem gezeigt, daß ein effizienter Transport von Fettsäuren durch Membranen ohne speziellen Transporter stattfindet.

Das Modell des diffusiven Passierens von Membranen durch Fettsäuren wird auch von HAMILTON, 1998 vertreten, der die physikalischen Eigenschaften von Fettsäuren in Modellsystemen untersuchte. Er hält es trotz der geringen Wasserlöslichkeit von Fettsäuren für möglich, daß Fettsäuren ohne Protein durch die Membran diffundieren. Die Hydrophobizität und der Anteil nichtionisierter Fettsäuren in der Membran sollten die Diffusion ermöglichen. Die Regulation des Fettsäuretransportes durch die Membran hängt danach nur von einer Änderung des Konzentrationsgradienten der Fettsäuren über die Membran ab. Dieser Gradient wird durch die extrazelluläre Fettsäurekonzentration, die Membranvolumina der Zelle, der cytosolischen FABP-Konzentrationen und der Geschwindigkeit des Fettsäuremetabolismus reguliert [COOPER et al.,1987].

Da die Konzentration freier Fettsäuren im Organismus normalerweise sehr gering ist, haben kleine Änderungen in der Konzentration von Albumin und FABPs, oder eine Erhöhung der Fettsäurekonzentration schwerwiegende Folgen. So führen geringe Konzentrationen von *cis*-Linolsäure zu Schädigung von Epithelzellen der Rinderaugenlinsen [GLAESSER et al., 1996]. Möglicherweise ist das eine der Ursachen für das erhöhte Katharakt-Risiko bei Diabetikern, bei dem es zu einer Schädigung der Augenlinsenzellen mit nachfolgender Eintrübung kommt. Bei Patienten mit diabetischer Stoffwechsellage wurde ein gestörtes Verhältnis von Albumin zu freier Fettsäure im Augenkammerwasser festgestellt. Auch Pankreaszellen während einer akuten Pankreatitis [SCHMITZ-MOORMANN und BOGER, 1981] werden durch Fettsäuren geschädigt. Ölsäure, die durch Lipasen aus Olivenöl freigesetzt wird, schädigt die Wandungen von Venen und Arterien, begleitet von einer Reaktion der Leukocyten, was den Verlauf einer

akuten haemorrhagischen Pankreatitis widerspiegelt. Auf diese Weise wurde auch hier ein Schädigungseffekt von freien Fettsäuren auf Zellen und Gewebe nachgewiesen.
Auf welche Weise ein erhöhter Fettsäure-Spiegel zu Zell- und Organschädigungen führt, ist bislang nicht geklärt. Diskutiert wird die Schädigung von Zellen und Zellbestandteilen durch Oxidationsprodukte von Fettsäuren, z.B. Linolsäurehydroperoxid [AKEO et al., 1996]. YANG und SCHAICH, 1996 untersuchten die DNA Schädigung durch Lipidhydroperoxide und Aldehyde. NIKI et al.,1993 wiesen schon früher eine Membranschädigung durch Lipidoxidationsprodukte nach. Diese Studien konnten aber keine Erklärung für den Schädigungsmechanismus liefern. Eine weitere Hypothese der Zellschädigung ist die Rolle der Fettsäure als Trigger einer anderen schädlichen Substanz. QIAN und EATON, 1994 zeigten, daß aktivierte Neutrophile unter dem Einfluß freier Fettsäuren die Produktion von Hypochlorsäure mehr als verdoppelten, was zu einer erhöhten Cytotoxizität dieser Neutrophilen führte.
Die dritte, von uns favorisierte und untersuchte Möglichkeit der Fettsäure-induzierten Zellschädigung, ist die Änderung der Fettsäurekonzentration in der Membran, wodurch strukturelle Änderungen hervorrufen werden. Dieser dynamische Strukturwechsel bzw. die darauf folgende Strukturanpassung führen dazu, daß globale Membranparameter verändert werden. VENKATACHALAM et al.,1988 zeigten am Energiestoffwechsel der Zellmembran von Epithelzellen, den Einfluß einer Akkumulation freier Fettsäuren auf die Membranintegrität. Eine Störung des Lysophosphatidylcholin-Metabolismus lieferte die Begründung für die Schädigung von Lungengewebe durch Ölsäure für CASALS et al., 1990. Experimente am Myocyten von JANERO et al., 1988 zeigten unmittelbar den Einfluß nicht metabolisierbarer Modellfettsäuren auf die Zellen. Die Kontraktionsrate verringerte sich, Energie- und Glykogenspeicher in den Zellen wurden geleert und es wurde eine Zerstörung der Phospholipidmembranen beobachtet. Diese Veränderungen führten zum Tod dieser Zellen. LAVOIE et al., 1991 schliesslich zeigten, daß eine erhöhte Fettsäurekonzentration in Zellen zur Fusion von intrazellulären Membranen führte. Konkrete Hinweise zum Mechanismus der Membranlysis gaben RICHIERI und KLEINFELD, 1991. Sie untersuchten die Beteiligung freier Fettsäuren in der T-Zell induzierten Immunabwehr. Es scheint, daß in einem frühen Stadium die vermehrte Produktion freier Fettsäuren in der Zielzelle induziert wird, die an der Lyse der eigenen Zellmembran beteiligt sind.
Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Hinweisen für eine Fettsäure-induzierte Schädigung von Zellmembranen mit Hilfe eines Modellmembransystems nachzugehen. Da freie Fettsäuren strukturell den Detergentien verwandt sind, vermuteten wir einen analogen, lytischen Effekt

auf Membranen. Um einen umfassenden Überblick über den „Störmechanismus“ und das Verhalten der Fettsäuren in der Membran zu bekommen, war es notwendig, den Einbau und den Transport der Fettsäuren im Modellmembransystem zu klären. Die Schädigung der Zellmembran, als erstem betroffenen Zellorganell sollte, so unsere Vorstellung, zum Zelltod führen, oder als erster Schritt diesen Tod vorbereiten. Um unsere Untersuchungen präziser interpretieren zu können, verwendeten wir besser charakterisierbare Modellsysteme, d.h. Liposomen, Monolayer und BLMs. Unsere Ergebnisse in den Modellsystemen verglichen wir mit Messungen an intakten Zellen, um die Relevanz unserer Ergebnisse im biologischen System zu belegen.

2 Physikalische Eigenschaften von Fettsäuren: Löslichkeit, Dissoziationsverhalten, Phasenzustände

Als Fettsäuren wird die Gruppe aliphatischer Monocarbonsäuren bezeichnet. Der Name Fettsäuren geht darauf zurück, daß die natürlichen Fette aus Estern langkettiger Carbonsäuren mit Glycerin bestehen. Fettsäuren mit Kettenlängen unter 7 C-Atomen werden als niedere Fettsäuren, mit 8-12 C-Atomen als mittlere und mit Kettenlängen über 12 C-Atomen als höhere Fettsäuren bezeichnet.
Bei unseren Untersuchungen beschränkten wir uns auf die höheren Fettsäuren und unterschieden zwischen kurzkettigen 14-16 C-Atome und langkettigen Fettsäuren über 16 C-Atomen. Die verwendeten Fettsäuren waren im wesentlichen Tetradecansäure (Myristinsäure), Octadecansäure (Stearinsäure) als gesättigte Säuren unterschiedlicher Kettenlängen und Ölsäure, Linolsäure und Parinarsäure als Fettsäuren gleicher Kettenlänge, mit unterschiedlichem Sättigungsgrad.
Höhere Fettsäuren sind in organischen Lösungsmitteln gut, in Wasser dagegen fast nicht löslich. Die Löslichkeit von Fettsäuren in wäßrigen Medien ist in der Literatur bisher sehr ungenau beschrieben.Nur für wenige Fettsäuren liegen überhaupt Daten vor. Deshalb überprüften wir zunächst die Werte schon bekannter Löslichkeiten ermittelten anschließend die Löslichkeit von Linolsäure in Wasser.

2.1 Bestimmung der Löslichkeit ausgewählter Fettsäuren

In separaten Gefäßen wurden verschiedene Mengen Fettsäure in großen Volumina ultrareinem Wasser über mehrere Tage unter ständigem Rühren gelöst. Von diesen Ansätzen wurden Proben in einem Fluoreszenzspektrophotometer Hitachi F 2000 bei einer Anregungswellenlänge von 250 nm und der gleichen Emissionswellenlänge vermessen. Da der Detektor für das Emissionslicht im rechten Winkel zum Strahlengang des Anregungslichtes steht, kann eine Lichtemission nur dann gemessen werden, wenn das Anregungslicht durch die Probe im 90° Winkel auf den Detekor gestreut wird. Die Konzentration, an dem die Löslichkeit überschritten wird, ist der Beginn der Zunahme des Streulichtes in der Lösung (Abbildungen 1 und 2). Bei dieser Konzentration entstehen Aggregate, die groß genug sind, um das Licht zu streuen. Somit ist die molekulare Löslichkeit überschritten. Die bei höheren

Fettsäurekonzentrationen erfolgende Abnahme der Streuung ist auf die Teilchengeometrie, bzw. auf unsere Anordnung des Detektors im rechten Winkel zur Probe und die Winkelabhängigkeit der Lichtstreuintensität zurückzuführen [DÖRFLER, 1994].

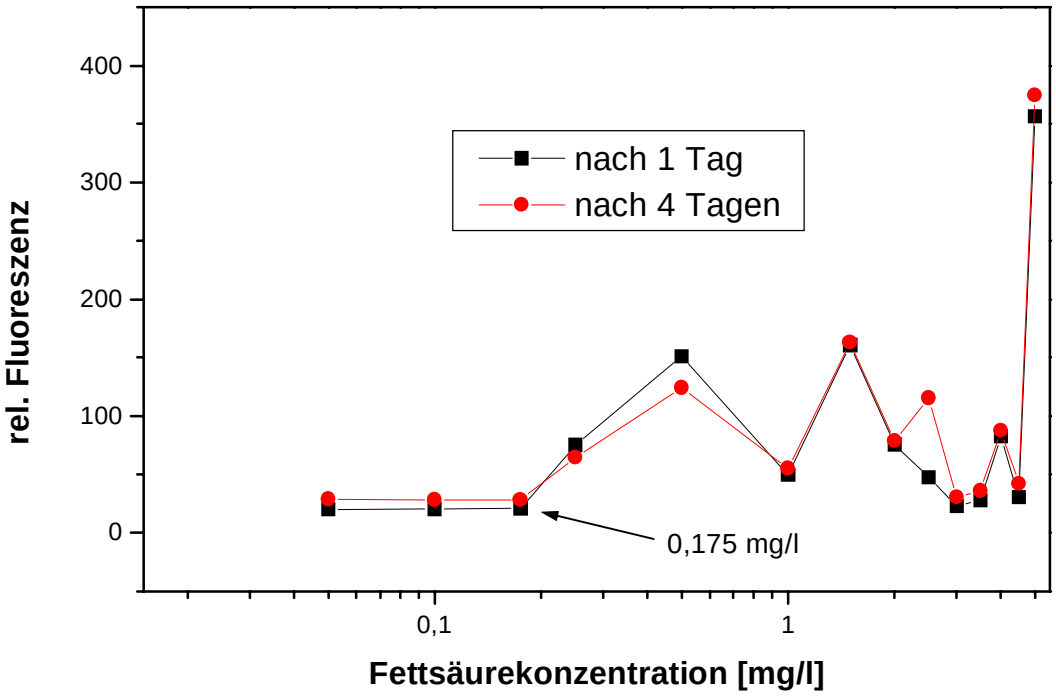


Abbildung 1: Bestimmung der Löslichkeit von Myristinsäure in Wasser. Der Anstieg der Streulichtintensität zeigt die Entstehung von unlöslichen Myristinsäurekristallen an. (λ_{Ex} = 250 nm, pH = 7 in Wasser, T = 20 C)

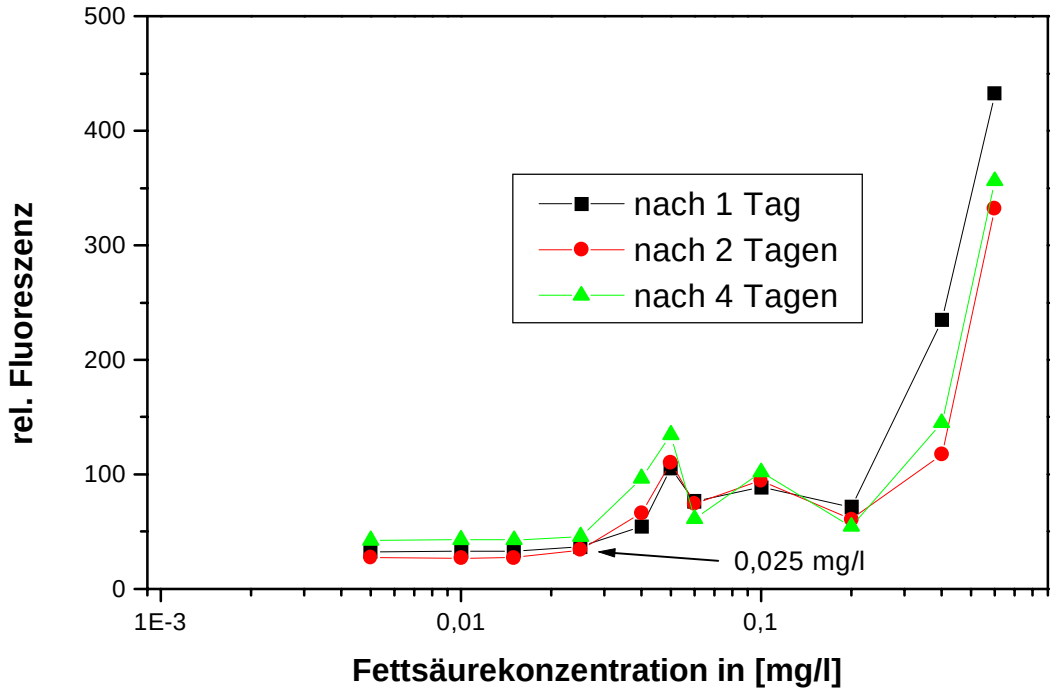


Abbildung 2: Bestimmung der Löslichkeit von Linolsäure in Wasser. Der Anstieg der Streulichtintensität zeigt die Entstehung von unlöslichen Linolsäuretropfen an.
(λ_{Ex} = 250 nm, pH = 7 in Wasser, T = 20°C)

Tabelle 1: Löslichkeiten verschiedener Fettsäuren in Wasser.

Fettsäuren	**Löslichkeit in Wasser**
Myristinsäure	0,2 mg/l (experimenteller Wert: 0,175 mg/l)
Stearinsäure	0,02 mg/l
Linolsäure	0,025 mg/l (experimentell ermittelt)

[CRC HANDBOOK OF BIOCHEMISTRY]

Fettsäuren, die in Konzentrationen über ihrer molekularen Löslichkeit in Wasser eingebracht werden, zeigen ein Phasenverhalten, wie es von CISTOLA et al.,1988 beschrieben wurde. Danach bilden Fettsäuren über ihrer Löslichkeit unter Standardbedingungen (pH ~ 7, Temp.~25°C) keine Mizellen aus, sondern liegen als Aggregate vor. Diese Aggregate sind je nach Phasenübergangstemperatur kristallin oder fluid (Tröpfchen). Erst bei extrem hohen pH Werten, wenn die Mehrzahl der Fettsäuremoleküle dissoziiert vorliegen, ist eine Mizellbildung möglich.

Fettsäuren zeigen ein spezielles Dissoziationsverhalten. Molekular gelöst haben sie einen pKa von ~ 4,7. Dieser pKa unterscheidet sich aber stark von dem pKa-Wert, den die Fettsäuren in einer Membran oder in Aggregaten besitzen. In der Literatur werden pKa-Werte von 7-9 [SANKARAM et al.,1990; STORCH und KLEINFELD, 1986; HAUSER et al., 1979] für membranständige Fettsäuren angegeben.

Da unsere Untersuchungen unter quasi-physiologischen Bedingungen (pH = 7,2, 25°C) stattfanden, konnten wir keine mizellare Lösung der Fettsäuren erreichen [CISTOLA et al.,1986], somit sind die CMC-Werte, wie sie von MUKERJEE und MYSELS, 1971 beschrieben wurden, auf unsere Systeme nicht anwendbar. Bei unseren Versuchen mußten wir die Fettsäureaggregate möglichst fein dispergieren, um lokal erhöhte Fettsäurekonzentrationen im Versuchsansatz zu vermeiden. Die molekulare Löslichkeit der Fettsäuren in den vorgestellten Experimenten wurde in jedem Fall überschritten. Die Fettsäuren lagen so, je nach Schmelztemperatur, als Tröpfchen, kleine Kristalle oder als molekular gelöste Fettsäure vor.

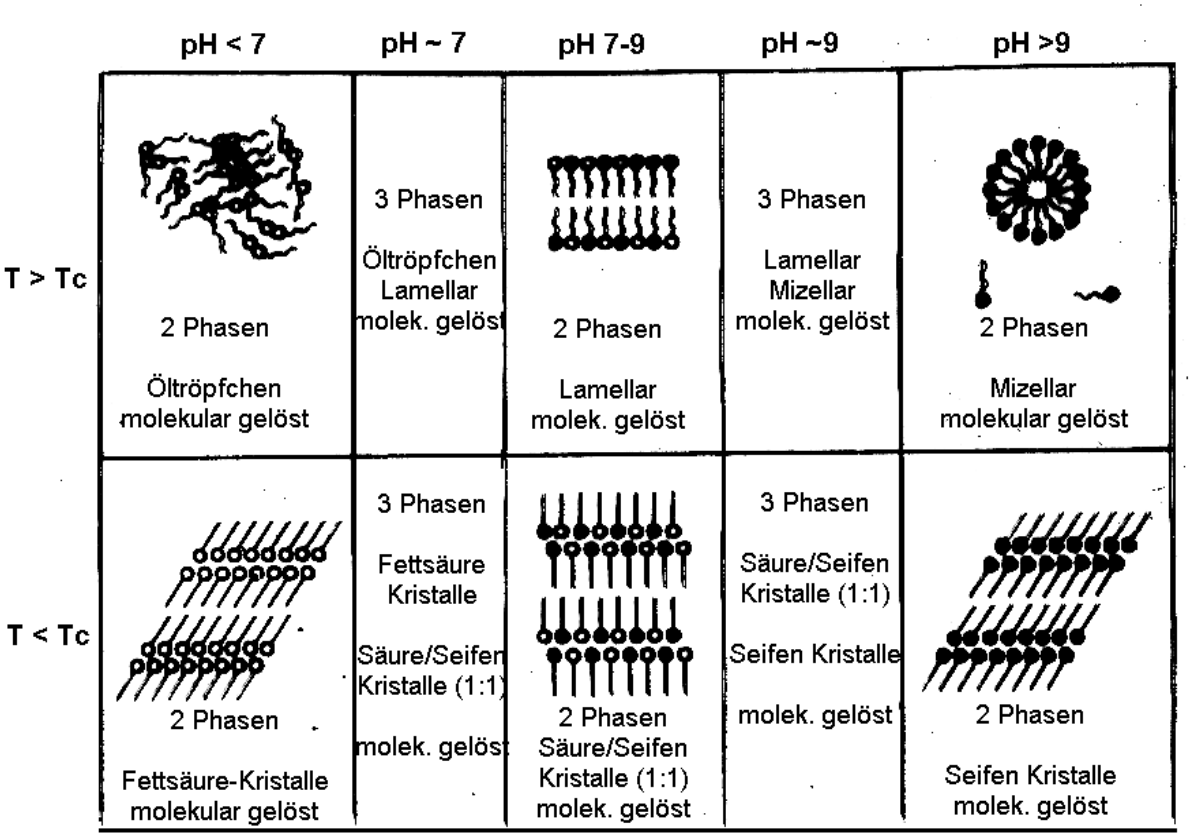


Abbildung 3: Temperatur und pH-abhängige Phasenzustände von Fettsäuren aus [CISTOLA et al.,1986]

In der Literatur wird der Transfer von Fettsäuren zwischen einzelnen hydrophoben Phasen als sehr schneller molekularer Austausch über die wäßrige Phase beschrieben [STORCH und KLEINFELD, 1986]. In Kapitel 7 wird dieser Vorgang des molekularen Transfers zwischen hydrophoben Phasen nachgewiesen.

Fettsäuren sind amphiphile Moleküle, d.h. sie haben sowohl hydrophobe, als auch hydrophile Eigenschaften. Diese Eigenschaften werden in der Tensidchemie mit Hilfe der sogenannten HLB-Zahl quantifiziert. HLB bedeutet **H**ydrophil **L**ipophil **B**alance, bezeichnet also die Summe der hydrophilen Eigenschaften der Kopfgruppe in Bezug auf die hydrophoben Eigenschaften der Kohlenwasserstoffkette. Fettsäuren unterscheiden sich in ihrem hydrophoben und hydrophilen Verhalten stark von anderen Tensiden. Ursprünglich wurde die HLB-Zahl durch experimentelle Bestimmung der Emulgatoreigenschaften gegen einen Tensidstandard bestimmt. Da dieses Verfahren sehr aufwendig ist, benutzt man sogenannte Inkrementsysteme, um die HLB-Zahl zu kalkulieren [BREZESINSKY und MÖGEL, 1993]. Dabei wird die HLB-Zahl summarisch aus allen Molekülteilen des Amphiphils berechnet. Es geht die Art und die Anzahl der Kohlenstoffatome der Alkylkette und die COOH-Gruppe bzw. die COONa-Gruppe, des Kopfes ein.

Die Sättigung der Kette spielt für die theoretische HLB-Zahl keine Rolle, da im Inkrementsystem -CH_2-Gruppen und -CH_3-Gruppen die selbe Gruppenzahl besitzen. Fettsäuren haben im nichtdissoziierten Zustand aufgrund der fehlenden Ladung und der kleinen hydrophilen Kopfgruppe eine negative HLB-Zahl, was bedeutet, daß der hydrophobe Molekülteil einen sehr viel stärkeren Einfluß auf die Eigenschaften des Fettsäure-Moleküls besitzt, als der hydrophile Teil. Dies ist auch der entscheidende Unterschied zu anderen Tensiden, deren hydrophile Kopfgruppe einen sehr viel höheren Einfluß auf die Moleküleigenschaften haben. Dieser Unterschied erklärt die fehlende Tendenz der undissoziierten Fettsäuren, Mizellen zu bilden sowie den fehlenden Unterschied zwischen der Wasserlöslichkeit von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren gleicher Kettenlänge. Der HLB-Wert der Fettsäuresalze liegt im Bereich nichtionischer Tenside bei 0-20.

Tabelle 2: Berechnung der HLB Zahl verschiedener Fettsäuren

Fettsäure	**Myristin-säure**	**Stearin-säure**	**Ölsäure**	**Linolsäure**	**Parinar-säure**
Anzahl der hydrophoben	13 mal -CH_3	17 mal -CH_3	15 mal -CH_3	13 mal -CH_3	9 mal -CH_3

Gruppen			2 mal $-CH_2$	4 mal $-CH_2$	8 mal $-CH_2$
Gruppenzahl der hydrophilen Säure-/Salzgruppe	2,1/19,1	2,1/19,1	2,1/19,1	2,1/19,1	2,1/19,1
Gruppenzahl der hydrophoben Gruppen	$-CH_3$ und $-CH_2$ -0,475	$-CH_3$ und $-CH_2$ -0,475	$-CH_3$ und $-CH_2$ -0,475	$-CH_3$ und $-CH_2$ -0,475	$-CH_3$ und $-CH_2$ -0,475
Gesamtwert Säure/Salz	-4,075/ 12,925	-5,975/ 11,025	-5,975/ 11,025	-5,975/ 11,025	-5,975/ 11,025

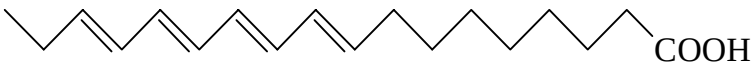
Bei Tensidmischungen werden die HLB-Werte mit den Masseprozenten der einzelnen Komponenten multipliziert und zu einer Gesamtzahl addiert. Dies wirft für unsere Versuche erneut die Problematik des Dissoziationsgrades der Fettsäuren unter unseren Versuchsbedingungen auf, da wir nicht genau die Masseprozente der undissoziierten und der ionisierten Fettsäure im Versuchsansatz bestimmen konnten.
Diese Überlegungen führten uns zu folgendem Schluß. Da CMC Werte für Fettsäuren unter unseren Versuchsbedingungen nicht existieren, charakterisieren die HLB-Werte das Verhalten von Fettsäuren in wäßrigen Systemen besser. Aufgrund der Ähnlichkeiten der HLB-Werte von Fettsäuren gleicher Kettenlänge, lassen sich die Unterschiede zwischen diesen Fettsäuren, wie wir sie im weiteren Verlauf der Arbeit gefunden haben, nicht aus ihrem molekularen Löslichkeitsverhalten im wäßrigen System erklären.

3 Einbau von Fettsäuren in Modell- und Zellmembranen

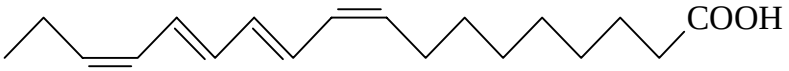
3.1 Messung der Einbaugeschwindigkeit in Membranen

3.1.1 Einbaugeschwindigkeit von Parinarsäure in Modellmembranen

Um den Mechanismus der Wirkung von Fettsäuren auf Membranen zu untersuchen, ist es notwendig den Zeitverlauf des Einbaus von Fettsäure in Membranen zu kennen. Zur Messung des Einbaus, ohne Überlagerung vorausgehender und nachfolgender Prozesse, nutzten wir ein Modellsystem. Der Einbau der natürlichen Fettsäure Parinarsäure in Liposomenmembranen läßt sich aufgrund ihrer Struktur (Abbildung 4) leicht detektieren. Parinarsäure aus *Impatiens Balsamina* ist eine C18 Fettsäure mit vier konjugierten Doppelbindungen



***trans*-Parinaric Acid**



***cis*-Parinaric Acid**

Abbildung 4: Strukturformeln von *cis*- und *trans*-Parinarsäure

Diesen konjugierten Doppelbindungen ist es zu verdanken, daß Parinarsäure eine Eigenfluoreszenz zeigt, deren Ausbeute lösungsmittelabhängig ist. In apolaren Medien ist die Fluoreszenzausbeute sehr viel höher als in polarer Umgebung (Abbildung 5). Diese Änderung der Fluoreszenz erlaubt es, den Übergang der Parinarsäure aus dem hydrophilen Puffer in den hydrophoben Bilayer des Liposomensystems im Fluoreszenzspektrophotometer zu verfolgen [SKLAR et al., 1977].

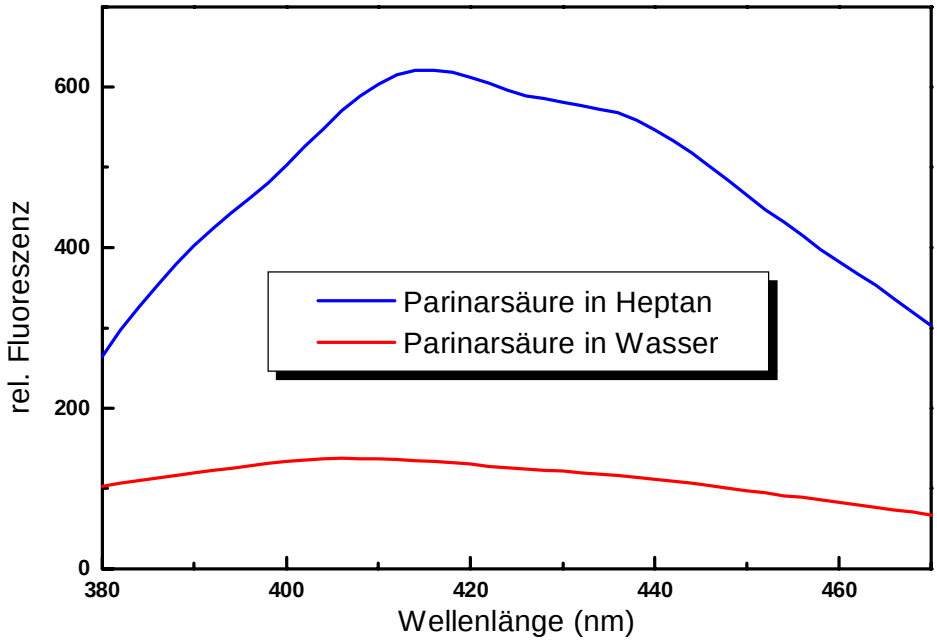


Abbildung 5: Fluoreszenzausbeute von Parinarsäure in unterschiedlichen Lösungsmitteln. (λ_{Ex} = 313 nm, λ_{Em} = 413 nm)

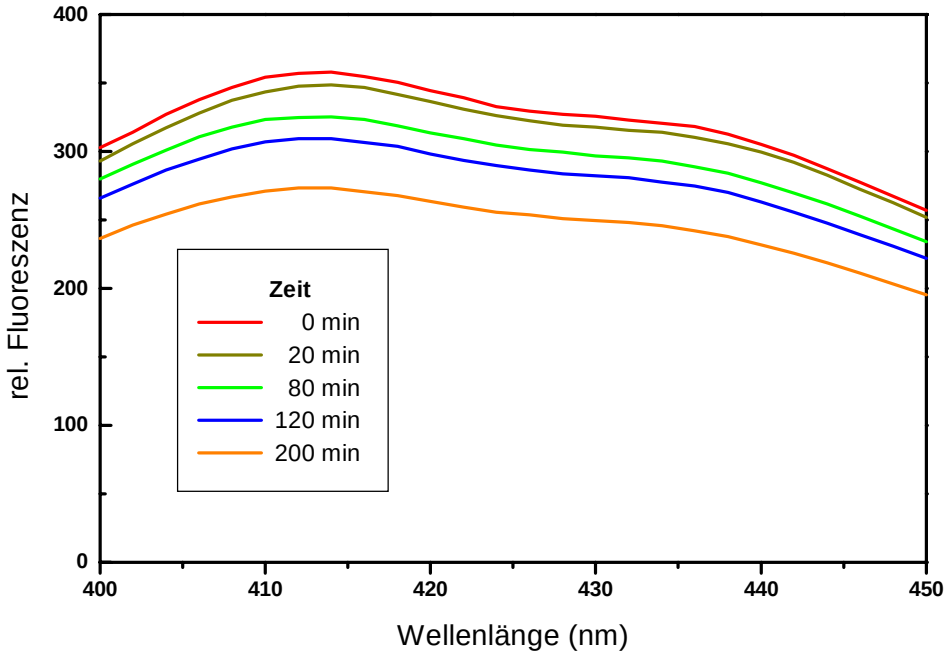


Abbildung 6: Abnahme des Fluoreszenzsignals von Parinarsäure infolge der Oxidation an Luft. (λ_{Ex} = 313 nm, pH = 7,4 in Wasser, unter Lichtausschluß)

Die vier konjugierten Doppelbindungen induzieren auch andere Veränderungen der Moleküleigenschaften. So ist Parinarsäure stark oxidationsempfindlich, was bei Messungen zur Quantifizierung der Lipidperoxidation von Vorteil [DINIS et al., 1993] ist, in unserem Falle jedoch einen Nachteil darstellt. Deshalb charakterisierten wir die Empfindlichkeit der Fettsäure gegenüber Licht und Sauerstoff (Abbildungen 6 und 7). Besonders unter Lichteinfluß, auch unter Sauerstoffausschluß, wird die Parinarsäure zerstört (Abbildung 7).

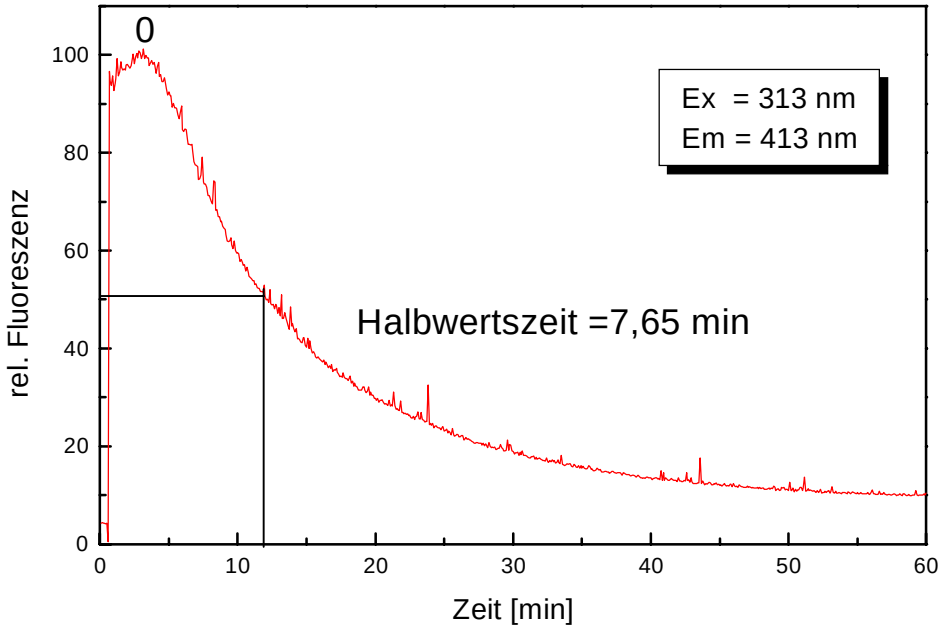


Abbildung 7: Abnahme des Fluoreszenzsignals von Parinarsäure unter Lichteinfluß in Argonatmosphäre. (pH = 7,4 in Wasser, Lichtquelle: Xe-Lampe 100W)

Der Abbau in der Dunkelheit nur durch Luftoxidation (Abbildung 6) erfolgt sehr viel langsamer als unter Lichteinfluß ohne Sauerstoff (Abbildung 7). Deshalb ist es möglich, ohne spezielle Vohrkehrungen (Argonspülung) unter Einsatz von kurzen Belichtungintervallen Messungen über 1h mit Fehlern unter 10% durchzuführen.

Material und Methoden

cis-Parinarsäure, SIGMA Chemical, St.Louis

trans-Parinarsäure, SIGMA Chemical, St.Louis

Hitachi F-2000 Fluoreszenzspektrophotometer, Spaltbreite je 10 nm, Quarzküvette bei 25o C temperiert und gerührt

PBS, pH = 7,2

Liposomenpräparation

Polycarbonatmembran, Costar, Deutschland

Extruder, Lipex Biomembrane, Kanada

LUV (Large Unilamellar Vesicles, Durchmesser: 200 nm) wurden durch Extrusion [OLSON et al., 1979] von multilamellaren Vesikeln hergestellt. Ein Lipidfilm (30µmol) hydratisiertes Sojabohnen Phosphatidylcholin/Phosphatidylglyzerol (10:1) wurde durch Entfernen des Lösungsmittels mittels Rotationsverdampfer an der Wandung eines 25 ml Rundkolbens hergestellt. 1ml einer Lösung von PBS pH = 7,2 mit 6-CF (100 mM) werden hinzugegeben. Durch das Erwärmen dieser Lösung über die Phasenumwandlungstemperatur der Lipidmischung entstehen unter Schütteln spontan multilamellare Vesikel verschiedener Größe. Diese Vesikel wurden durch eine Polycarbonatmembran mit 200 nm Porengröße mindestens fünf mal extrudiert (Polycarbonatmembran, Costar, Deutschland; Extruder, Lipex Biomembrane, Kanada). Um das Ergebnis der Präparation beurteilen zu können, wurden die Vesikel mit einer Laserlichtstreumethode auf ihre Größenverteilung untersucht. Die Liposomen wurden verwendet, wenn die Polydispersität unter 0,150 lag.

Versuchsdurchführung

In einer Quarzküvette wird 2 ml PBS vorgelegt, in dem 20 µl 30 mM Liposomensuspension einpipettiert und vermischt werden. Zu dieser Lösung wird eine Dispersion aus 6 mM Parinarsäure in 1 ml PBS mit einer Spritze durch ein Septum in die Küvette eingespritzt. Während dieser Zugabe ist der Deckel des Fluoreszenzspektrometers geschlossen und es werden bereits Messwerte erfaßt.

Ergebnisse und Diskussion

Der Einbau der Parinarsäure in die Vesikelmembranen läßt sich anhand des Fluoreszenzanstieges am Emissionsmaximum der Parinarsäure verfolgen (Abbildung 8).

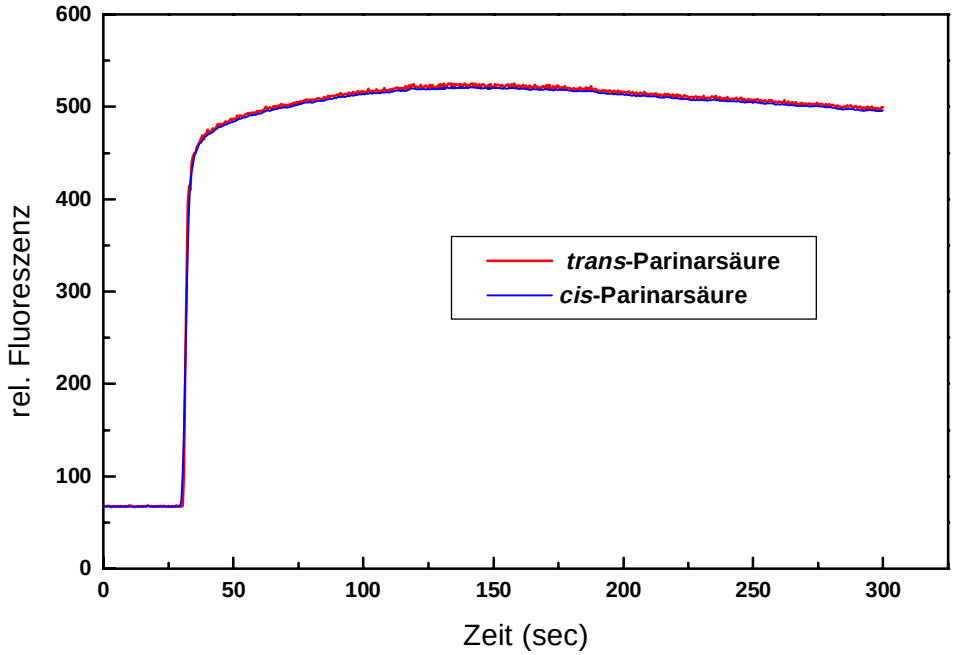


Abbildung 8: Zunahme des Fluoreszenzsignals von *cis*- und *trans*-Parinarsäure beim Einbau in HSPC/PG Vesikel. Die Geschwindigkeit der Fluoreszenzzunahme beim Übergang der Parinarsäure von hydrophiler in hydrophobe Umgebung ist ein Maß für die Einbaugeschwindigkeit. (pH = 7,4 in Wasser, λ_{Ex} = 313 nm, λ_{Em} = 413 nm)

Die maximal mögliche Menge sowohl von *cis*-Parinarsäure, als auch von *trans*-Parinarsäure wird innerhalb von 20 Sekunden in den Liposomenbilayer eingebaut. Nach dem Erreichen eines Plateaus konstanter Fluoreszenz beginnt ein leichter Fluoreszenzabfall, der den beginnenden Abbau der Parinarsäure repräsentiert. Die Geschwindigkeit des Einbaus ist von der Molekülstruktur und dem Aggregatzustand der Parinarsäure unabhängig. Unter den Versuchsbedingungen liegt *cis*-Parinarsäure, die in ihrer Molekülstruktur mit der ungesättigten Linolsäure vergleichbar ist, flüssig vor. *Trans*-Parinarsäure, die der gesättigten Stearinsäure entspricht, ist kristallin [SCHROEDER und SOLER-ARGIALA, 1983]. Trotz dieser Unterschiede zeigen beide Fettsäuren ein gleiches Einbauverhalten, im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Penetrationmessungen von *cis*- und *trans*-Linolsäure an Monolayern [MCDONALD und MCDONALD, 1988]. Ein Unterschied im Einbau der Fettsäuren in die Modellmembranen, wie er für zelluläre Systeme beschrieben wurde [HEYLIGER, 1996], ist nicht zu erkennen.

3.1.2 Einbaugeschwindigkeit von Parinarsäure in Zellmembranen

Um die Einbaugeschwindigkeit von freien Fettsäuren in Zellmembranen zu ermitteln, untersuchten wir den Einbau der Modellsubstanz Parinarsäure in Keratinozytenmembranen. Das System der HaCaT-Zellen ist in unserem Institut gut etabliert und kann deshalb unter idealen Bedingungen ohne unerwünschte Nebeneffekte untersucht werden. Fluoreszenzspektrometrische Untersuchungen mit dem Laser Scanning Mikroskop wurden auch schon zur Detektion von zeitlichen Veränderungen des intrazellulären Calciumgehalts mit Erfolg durchgeführt, was ähnliche meßtechnische Anforderungen an das System stellte [AOYAMA et al.,1995]. HaCaT-Zellen (**H**uman **a**dult low **Ca**lcium high **T**emperatur) sind eine unsterbliche, nichttumorigene Zelllinie von Hautkeratinozyten des Menschen [BOUKAMP et al., 1988].. HaCaT-Zellen haben eine kugelige Form, die es erlaubt im konfokalen Modus einen Schnitt durch die Zelle zu erzeugen, um die intrazelluläre Verteilung der Fluoreszenz zeitabhängig untersuchen zu können [OBERLE et al.,1997].

Material und Methoden

DMEM (**D**ulbecco´s **m**odified **E**agle´s **m**edium), SIGMA, Deisenhofen
FCS (**F**oetal **C**alv **S**erum), C. C. Pro, Karlsruhe
Penizillin, SIGMA Chemical, St.Louis
Streptomyzin, SIGMA Chemical, St.Louis
POC-Kammern, Bachhofer, Reutlingen
cis-Parinarsäure, SIGMA Chemical, St.Louis
trans-Parinarsäure, SIGMA Chemical, St.Louis
Laser Scanning Microscop LSM 410 von Zeiss, Oberkochen
HBS (**H**epes **B**uffered **S**aline), SIGMA, Deisenhofen

Zellpräparation

Die HaCaT-Zellen werden auf speziellen Objektträgern, die sich in die POC-Kammern einspannen lassen in DMEM mit 5% FCS, 100 U/ml Penizillin und 50 µg/ml Streptomycin subkultiviert. Diese Objektträger werden in die POC-Kammern mit einem Gesamtvolumen von 5 ml eingespannt und die Zellen mit HBS überschichtet und bei 37°C mikroskopiert.

Präparation der Parinarsäure

80 µl 1 mM Parinarsäure wurden in 150 µl Ethanol gelöst und gut verteilt in die Versuchskammer einpipettiert.

Mikroskopie

Die Eigenfluoreszenz der Parinarsäure wurde durch einen UV-Laser bei 364 nm angeregt und die Emission nach Passage durch einen Filter oberhalb 394 nm gemessen. Benutzt wurde ein Plan/Neofluar 40x/1.30 von Zeiss, Oberkochen.

Über eine Zeit von 40 Minuten wurden in 2-Minuten-Intervallen innerhalb eines fixen Fokusbereich Aufnahmen bestimmter Zellen aufgezeichnet, und die Bildfolge hinsichtlich der Fluoreszenzänderung ausgewertet. Die Zugabe der Parinarsäure erfolgte, nachdem 2 Zellaufnahmen als Basiswert aufgezeichnet wurden. Die Fokusebene wurde so gewählt, daß ein Schnitt durch die Mitte der kugelförmigen Zellen zu sehen war.

Ergebnisse und Diskussion

Aufnahme von cis-Parinarsäure in HaCaT-Zellen

Nach Zugabe von *cis*-Parinarsäure nimmt die Fluoreszenzintensität der Zellen zu, was den Einbau der Fettsäure anzeigt (Abbildung 9). Deutlich ist ein früher Fluoreszenzanstieg in der äußeren Zellmembran zu erkennen, was auf eine erste Anreicherung der Parinarsäure dort schließen läßt. Später verteilt sich die Parinarsäure über das Cytosol in intrazelluläre Membranen und reichert sich dort ebenfalls an. Nach ca. 30 min ist eine deutliche Abflachung der Kurve zu erkennen, was das Ende der Fettsäure-Inkorporation anzeigt (Abbildung 10).

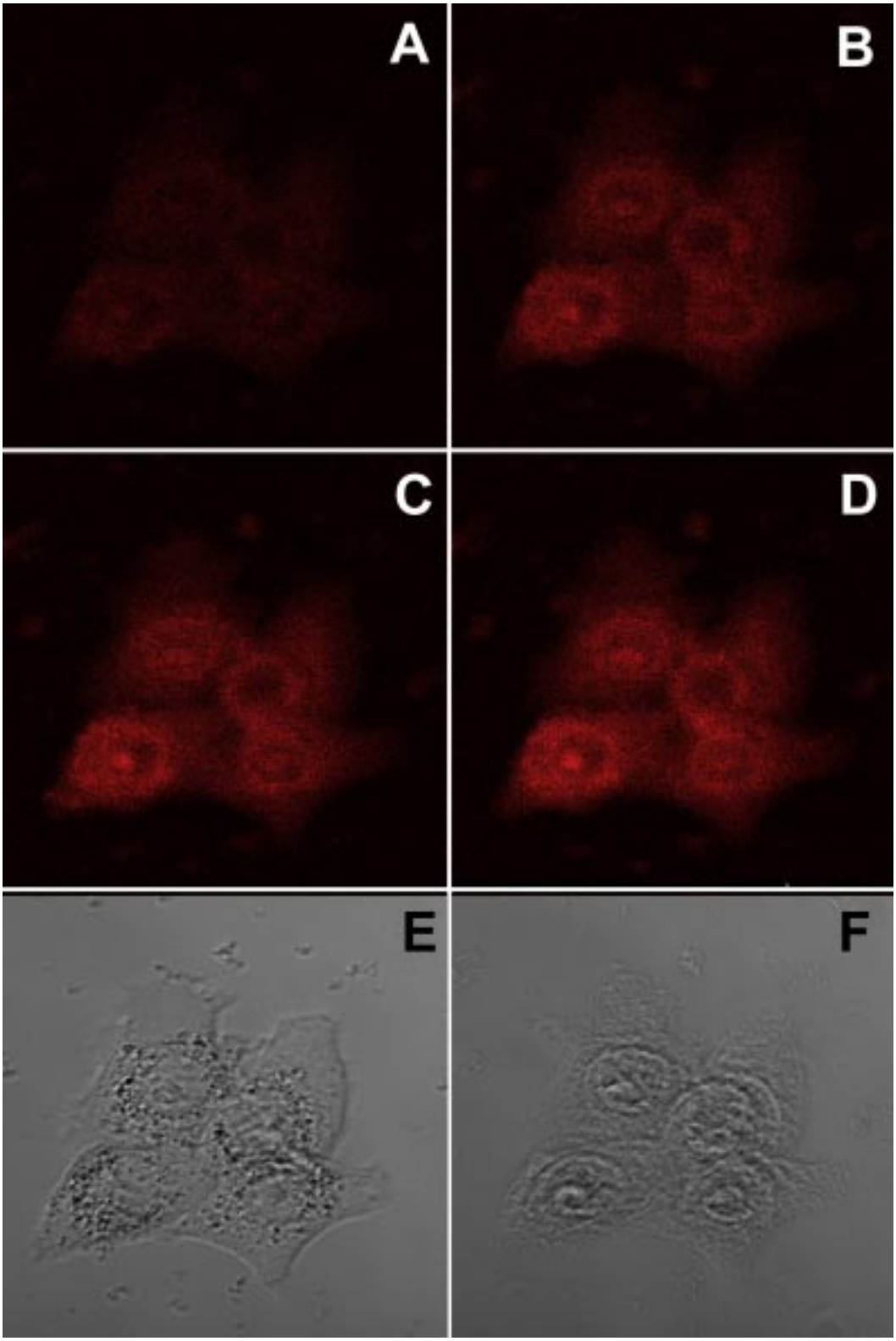

A
B
C
D
E
F

Abbildung 9 A-D: Anstieg der Fluoreszenzintensität in HaCaT-Zellen 0, 10, 20 und 30 Minuten nach Zugabe von *cis*-Parinarsäure. (λ_{Ex} = 364 nm, λ_{Em} > 450 nm, pH = 7,4 in HBS-Medium)**; E und F: Gleicher Bildausschnitt im Durchlicht vor und nach der Zugabe von *cis*-Parinarsäure.**

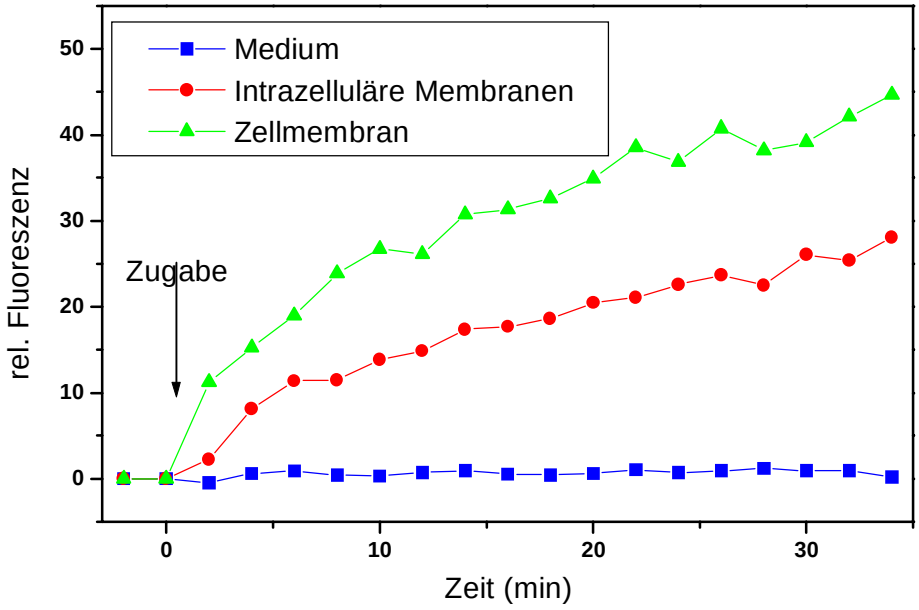


Abbildung 10: Zeitliche Änderung des Fluoreszenzsignals nach Zugabe von *cis*-Parinarsäure zu HaCaT-Zellen. Die rel. Fluoreszenzangaben wurden aus der Intensitätsverteilung bestimmter Bildareale einer Serie von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit dem LSM berechnet. (λ_{Ex} = 364 nm, λ_{Em} > 450 nm).

Aufnahme von trans-Parinarsäure in HaCaT-Zellen

Bei Zugabe von *trans*-Parinarsäure zu HaCaT Zellen zeigt sich ein ähnliches Bild (Abbildung 11). Die Einbauraten in die verschiedenen Zellbereiche liegen über die Dauer des gesamten Experiments im gleichen Bereich wie die der *cis*-Parinarsäure. Wiederum ist ein verzögerter Fluoreszenzanstieg in den intrazellulären Membranen zu beobachten (Abbildung 12). Es zeigt sich, daß sowohl *cis*- als auch *trans*-Parinarsäure mit gleicher Geschwindigkeit in die Zellmembran eingebaut werden.

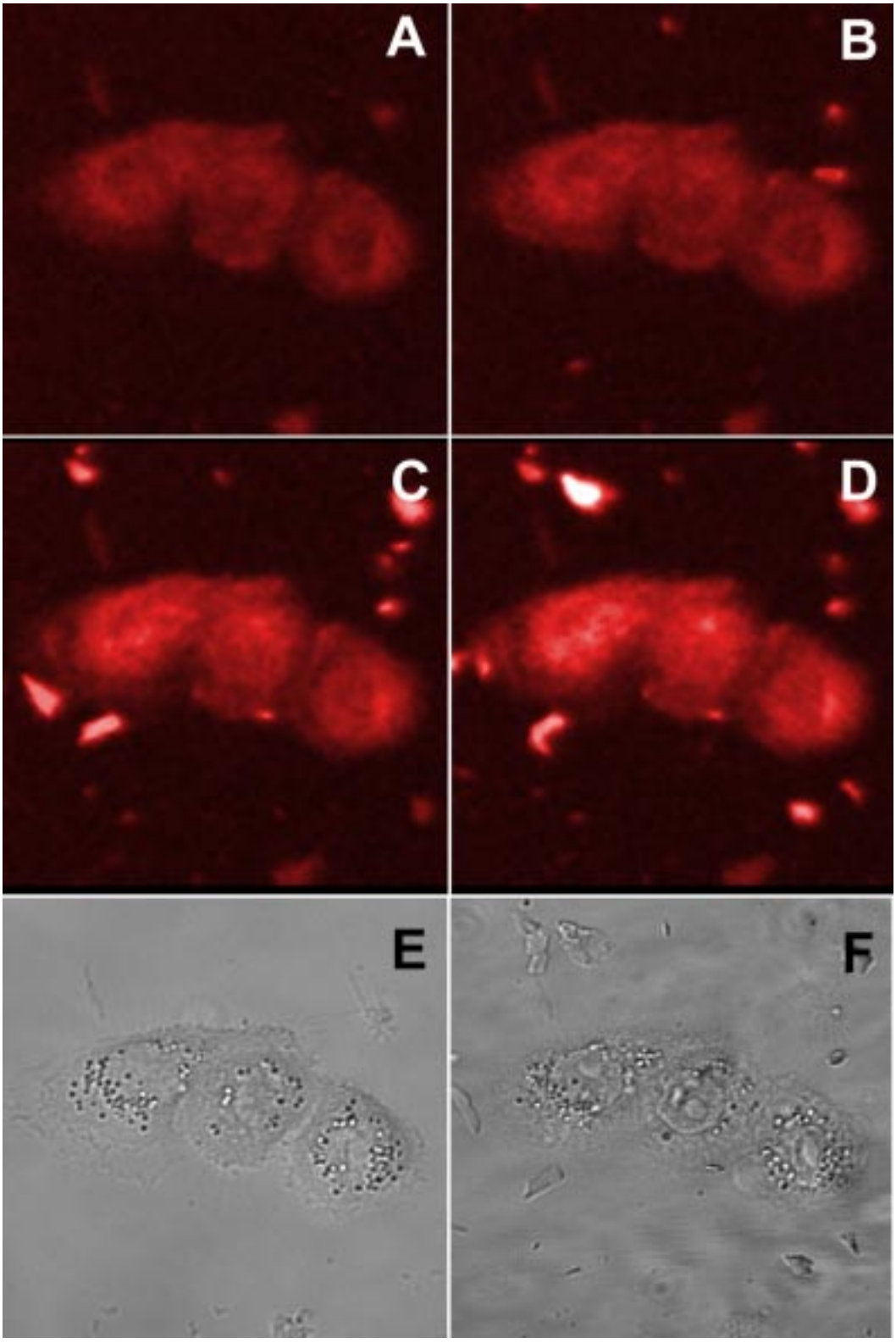

A
B
C
D
E
F

Abbildung 11 A-D: Anstieg der Fluoreszenzintensität in HaCaT-Zellen 0, 10, 20 und 30 Minuten nach Zugabe von *trans*-Parinarsäure. (λ_{Ex} = 364 nm, λ_{Em} > 450 nm, pH = 7,4 in HBS-Medium)**; E und F: Gleicher Bildausschnitt im Durchlicht vor und nach der Zugabe von *trans*-Parinarsäure.**

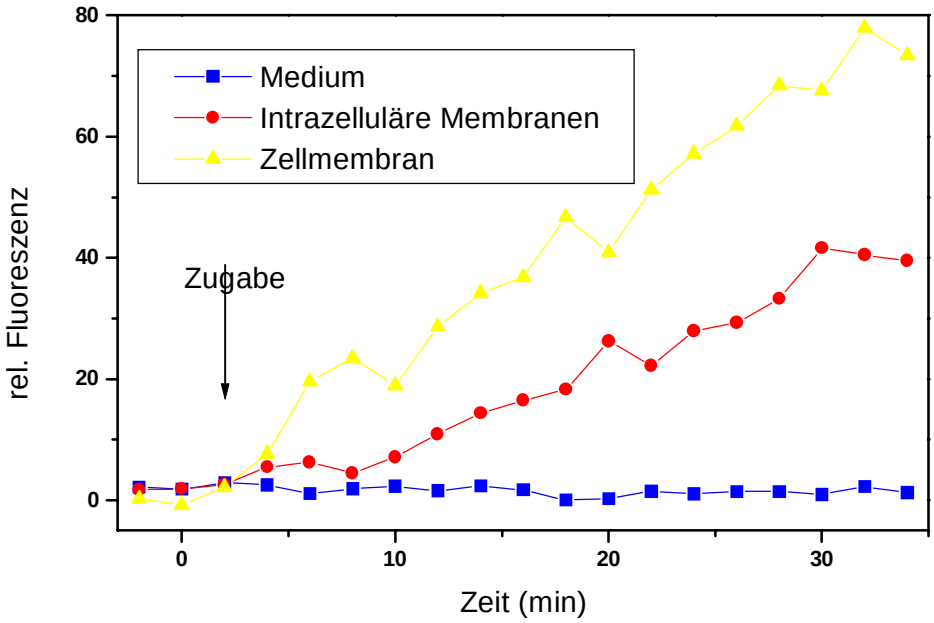


Abbildung 12: Zeitliche Änderung des Fluoreszenzsignals nach Zugabe von *trans*-Parinarsäure zu HaCaT-Zellen. Die rel. Fluoreszenzangaben wurden aus der Intensitätsverteilung bestimmter Bildareale einer Serie von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit dem LSM berechnet. (λ_{Ex} = 364 nm, λ_{Em} > 450 nm)**.**

Das Aufnahmeverhalten der Fettsäure hängt also auch im zellulären System nicht vom Aggregatzustand und der Molekülkonformation ab, wie schon am Liposomenmodell gezeigt wurde. Dieses Modellsystem zeigt eine „scheinbare Sättigbarkeit“ der Fettsäureaufnahme. Dieser Effekt wird in der Literatur im Zellsystem mit einer Proteinbeteiligung an der Fettsäureaufnahme erklärt [FITSCHER et al.,1996]. Da unser Modellsystem aber ohne Proteine arbeitet, ist die Beteiligung eines Proteins am Fettsäuretransport in die Membranen eher unwahrscheinlich. Die sehr viel langsamere Abflachung der Kurve im Vergleich zu den Messungen im Liposomensystem und der verzögerte Abschluß des Einbauprozesses zeigt dagegen die Beteiligung eines sehr viel größeren hydrophoben Volumens (intracytoplasmatische Membranen in der Zelle; sowie FABP´s) an. Da sich im Verlauf des Einbaus in intrazelluläre Membranen ständig neue Gleichgewichte einstellen (FS-Einbau in die Membran bzw. Abdissoziation), ist der Gesamtvorgang im Zellsystem zu einem späteren Zeitpunkt als im Modellsystem abgeschlossen. Auch am Zellsystem ist, obgleich nur an der äußeren Zellmembran, die schnelle Einbaukinetik unseres Fettsäuremodells zu erkennen.

3.2 Bestimmung der Einbaumenge von Fettsäuren in Phospholipidbilayer mittels Kapillarelektrophorese.

Die Einbaumenge aus der Fluoreszenzausbeute der eingebauten Parinarsäure zu bestimmen war aufgrund der Empfindlichkeit der Parinarsäure gegenüber Licht und Sauerstoff und der Schwierigkeit dieser Menge einen Fluoreszenzwert zuzuordnen nicht praktikabel. Auch zur Beantwortung der Frage nach Unterschieden zwischen den gesättigten und ungesättigten Fettsäuren leistet die Parinarsäure allein keinen Beitrag, so daß unter diesen Gesichtspunkten einem Assay der Vorzug gegeben wurde, mit dem alle Fettsäuren, auch die nicht fluoreszierenden, untersucht werden konnten.
Die Wahl fiel auf eine elektrophoretische Methode, und basiert auf der Tatsache, daß sich durch den Einbau von Fettsäuren die Nettoladung von Vesikeln verändern, und sich dieser Effekt in einer unterschiedlichen Mobilität der Vesikel in einem elektrischen Feld niederschlägt. BARTHEL et al., 1988 und JISKOOT et al., 1986 untersuchten mit diesem Verfahren den Einfluß amphiphiler Arzneistoffe auf Liposomen.
Gleichzeitig konnten mit Hilfe der Kapillarelektrophorese nicht eingebaute Fettsäuren abgetrennt werden. Diese Möglichkeit bietet auch die Free-Flow Elektrophorese, mit deren Hilfe KESSLER und MANZ, 1990 die Homogenität von Liposomen nachwiesen. Die Kapillarelektrophorese wurde bisher nur selten in Zusammenhang mit Liposomen genutzt, z.B. nutzten ZHANG et al., 1995 Liposmen als stationäre Phase bei der Kapillarelektrophorese, was auch beweist, daß die Liposomen während der Messung nicht zerstört werden. Daß die Vesikel intakt bleiben, zeigten auch OLLIVON et al., 1986 mit HPLC .

Material und Methoden

Beckmann PACE 5000/1 Kapillarelektrophorese mit einem LIF-Detektor
(LIF = **L**aser **i**nduzierte **F**luoreszenz)
Kapillardurchmesser: 50 µm, Material: Fused Silica
Spannung: 28 kV, Samplingrate: 5,0
Elektrophoresepuffer: 10 mM PBS pH = 7,4, bzw. 10 mM Boratpuffer pH = 8,9
NBD-PE [(6-(7-**n**itro**b**enz-2-oxa-1,3-**d**iazol-4-yl)amino)-**p**hospho**e**thanolamin], AVANTI Polar Lipids, Alabama, USA
HSPC (**H**ydriertes **S**ojabohnen **L**ecitin), AVANTI Polar Lipids, Alabama, USA
DPPG (**D**i**p**almitoyl**p**hosphatidyl**g**lycerol), AVANTI Polar Lipids, Alabama, USA

cis-Linolsäure, SIGMA Chemical, St.Louis

Stearinsäure, SIGMA Chemical, St.Louis.

Liposomenpräparation

LUV (**L**arge **U**nilamellar **V**esicles, Durchmesser: 200 nm) wurden durch Extrusion von multilamellaren Vesikeln hergestellt. Ein Lipidfilm (30µmol) hydratisiertes Sojabohnen Phosphatidylcholin/Phosphatidylglyzerol (10:1) mit 1 mol% NBD-PE wurde durch entfernen des Lösungsmittels mittels Rotationsverdampfer an der Wandung eines 25 ml Rundkolbens hergestellt. 1 ml einer Lösung von PBS pH = 7,2 werden hinzugegeben. Das Erwärmen dieser Lösung über die Phasenumwandlungstemperatur der Lipidmischung entstehen unter Schütteln spontan multilamellare Vesikel verschiedener Größe.

Diese Vesikel wurden durch eine Polycarbonatmembran mit 200 nm Porengröße mindestens fünf mal extrudiert (Polycarbonatmembran, Costar, Deutschland; Extruder, Lipex Biomembrane, Kanada).

Meßprinzip

Zur Untersuchung einer Fettsäure wurden von sechs Proben die Migrationszeiten in der Kapillarelektrophorese gemessen. Es wurden drei Vesikelpopulationen mit 5 mol%, 10 mol% und 15 mol% Fettsäurezumischung hergestellt, mit NBD-PE markiert und auf 200 nm Vesikeldurchmesser extrudiert. Danach wurde die Vesikelgröße durch dynamische Lichtstreuung verifiziert. Drei weitere Vesikelpopulationen wurden ohne Zumischung von Fettsäure analog hergestellt, und die Fettsäure in gleichen Konzentrationen von außen ins Medium zugegeben. Nach einer Inkubation von 1,5 h war der Einbau der Fettsäuren in die Vesikelmembranen beendet und die Proben konnten elektrophoretisch gemessen werden. Die ersten Proben dienten als Eichwerte, die einen 100% Einbau darstellten. Die Differenz der anderen drei Proben zu diesen Eichwerten ist ein Maß für die Konzentration nicht eingebauter Fettsäure. Da die Vesikel während des Einbaus von Fettsäuren über das Medium, nicht größenstabil sind, wurde die resultierende Vesikelgröße nach dem Einbau durch dynamische Laserlichtstreuung bestimmt. Sie betrug im Mittel 250 nm.

Ergebnisse und Diskussion

Die Zumischung von Fettsäuren zu den HSPC/PG Vesikeln verlängerte bei neutralem pH-Wert deren Migrationszeit Richtung Anode (Abbildung 13)., Da bei pH = 7,2 nur ein Teil der Fettsäuren dissoziiert vorliegt, wird die negative Nettoladung der Vesikel vermindert.
Die Migrationszeiten im Boratpuffer bei pH = 8,9 unterschieden sich bei unterschiedlicher Fettsäurezumischung nicht. Bei basischem pH-Wert liegen alle Fettsäuren dissoziiert vor, beeinflussen deshalb die Nettoladung der Liposomen nicht. Die Daten werden deshalb nicht in das Diagramm aufgenommen. Wegen der Änderungen der Vesikelgrößen während des Fettsäureeinbaus mußten die Migrationszeiten auf den jeweiligen Vesikelradius umgerechnet werden. Dazu diente die gleiche Formel, mit der auch die Menge der eingebauten Fettsäuren berechnet wurde:

$$\mu = q / 6\pi\eta r$$

Wobei **μ** die gemessene elektrophoretische Mobilität ist, **q** für die Nettoladung der Vesikel steht und **r** den Vesikelradius angibt, der durch dynamische Laserlichtstreuung bestimmt wurde. **η** bezeichnet die Viskosität des Mediums und bleibt unter den Versuchsbedingungen konstant.
Da der Vesikelradius bei allen Fettsäurezumischungen konstant blieb, wurde die Formel nach **r** aufgelöst. Durch Einsetzen der gemessenen Migrationszeiten konnten dann die Ladungsunterschiede in der Vesikelmembran berechnet werden.
Die Ladung konnte dabei nicht als Absolutwert angegeben werden, sondern wurde als prozentuale Abweichung vom zugehörigen Eichwert dargestellt. Aus ihr läßt sich die Menge inkorporierter Fettsäure direkt ablesen (Insert Abbildung 13).

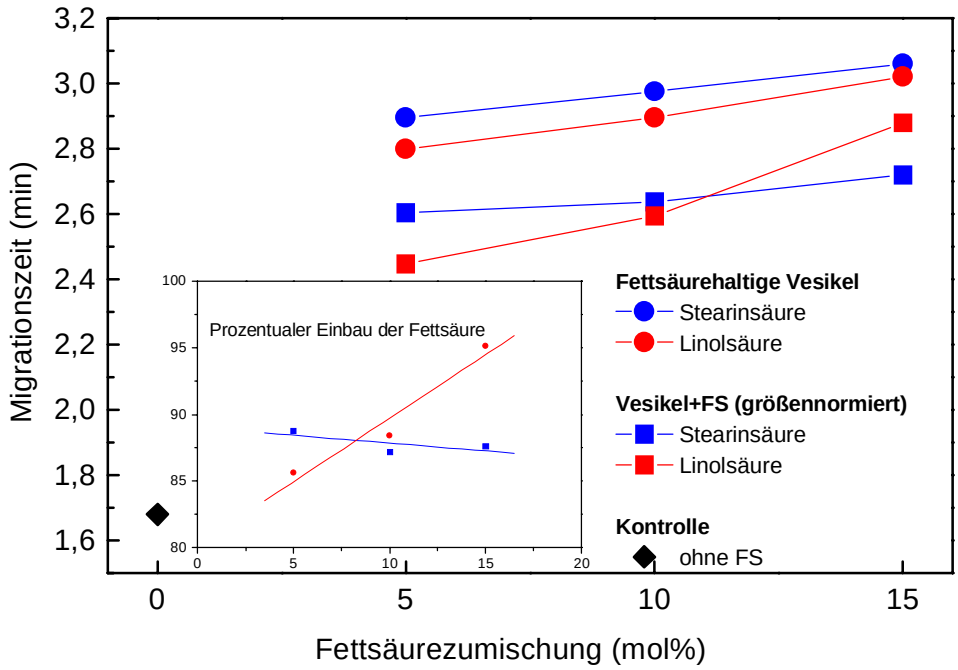


Abbildung 13: Charakterisierung des Einbaus von Fettsäuren in LUV´s mittels Kapillarelektrophorese Migrationszeiten von HSPC/PG Vesikeln mit variierender Fettsäurekonzentration. Vergleich zwischen fettsäurehaltigen Vesikeln (Zumischung vor der Präparation) und Vesikeln, bei denen der Fettsäureeinbau nachträglich über die wäßrige Phase erfolgte. Insert: Liposomal aufgenommener Fettsäureanteil bezogen auf die Gesamtmenge an FFA im Medium. (pH = 7,2 in PBS, Kapillardurchmesser: 50 µm, Material: Fused Silica, Spannung: 28 kV, Samplingrate: 5,0)

Die Ergebnisse zeigten sowohl für *cis*-Linolsäure als auch Sterarinsäure einen fast vollständigen Einbau in die Vesikelmembranen, was unter Beachtung der Partitionierungsexperimente mit Fettsäuren von PJURA et al., 1984 zu erwarten war. Zusammen mit den Ergebnissen der Einbaugeschwindigkeit der Modellfettsäure zeigte sich, daß der Fettsäureeinbau in Membranen, unabhängig vom Sättigungsgrad und Phasenzustand der Fettsäure, sehr schnell und vollständig abläuft.

Das Auftreten von jeweils einem Peak im Elektropherogramm zeigte außerdem die Einheitlichkeit aller eingesetzten Vesikelpopulationen. Die Vesikel unterliegen folglich während des Einbauprozesses einer Größenveränderung, was aus den Messergebnissen der dynamischen Lichtstreung (Kapitel 5.1.3) abgeleitet wurde. Nach einer gewissen Zeit (in diesem Fall 1,5 Stunden) bilden sich stabile einheitliche Endvesikel. Die Kapillarelektrophorese

ist, wie gezeigt wurde, eine geeignete Methode, um den Einbau von Substanzen in Modellmembranen zu quantifizieren, die die Oberflächenladung von Liposomen ändern.

3.3 Bestimmung des Wärmeeffekts beim Fettsäureeinbau in Modellmembranen durch isothermale Titrationskalorimetrie (ITC).

Um den Einbau von Fettsäuren in Phospholipid Bilayer energetisch beurteilen zu können, nutzten wir die Technik der ITC (**I**sothermalen **T**itrationsk(**C**)alorimetrie). Diese Technik erlaubt es, während der Titration eines Stoffes die Wärmeentwicklung innerhalb eines geschlossenen Systems zu messen. Die Temperatur dieses Systems bleibt dabei konstant (Isotherm). Diese Meßmethode wurde durch HEERKLOTZ et al., 1996 und KELLER et al., 1997 bereits zur Messung von Membransolubilisierungen durch Detergentien genutzt. Da die von uns untersuchten Fettsäuren prinzipiell Eigenschaften von Detergentien besitzen, untersuchten wir die Wärmeeffekte, die bei der Wechselwirkung (Einbau) freier Fettsäuren mit Modellmembranen erzeugt werden.

Material und Methoden

Differential Titrations Kalorimeter von MicroCal, Northampton, USA
PBS pH = 7,2 (ohne Ca2+ oder Mg2+)
HSPC, SIGMA Chemical, St.Louis
DPPG, SIGMA Chemical, St.Louis
cis-Linolsäure, SIGMA Chemical, St.Louis
Myristinsäure, SIGMA Chemical, St.Louis.
Stearinsäure, SIGMA Chemical, St.Louis

Liposomenpräparation

LUV wurden durch Extrusion von multilamellaren Vesikeln hergestellt. Ein Lipidfilm (30µmol) hydratisiertes Sojabohnen Phosphatidylcholin/Phosphatidylglyzerol (10:1) wurde durch entfernen von Lösungsmittel durch einen Rotationsverdampfer an der Wandung eines 25 ml Rundkolbens hergestellt. 1 ml einer Lösung von PBS pH = 7,2 werden hinzugegeben. Durch das Erwärmen dieser Lösung über die Phasenumwandlungstemperatur der Lipidmischung entstehen unter Schütteln spontan multilamellare Vesikel verschiedener Größe.

Diese Vesikel wurden dann durch eine Polycarbonatmembran mit 200 nm Porengröße mindestens fünf mal extrudiert (Polycarbonatmembran, Costar, Deutschland; Extruder, Lipex Biomembrane, Kanada).Um das Ergebnis der Präparation beurteilen zu können wurden die Vesikel mit einer Laserlichtstreumethode auf ihre Größenverteilung untersucht.
Die Größenbestimmung ergab eine mittlere Größe von 190 nm mit einer Polydispersität unter 0,15. Die Abweichung verschiedener Liposomenpräparationen von diesen Charakteristika betrugen unter 5%, oder sie wurden verworfen und nicht zur Messung genutzt.

Titrationskalorimetrie

Ein Titrationskalorimeter besteht prinzipiell aus zwei gegen die Umwelt wärmeisolierten Meßkammern. In eine Meßkammer wird eine Referenzsubstanz eingefügt, die dem Lösungsmittel entspricht, in dem der Versuch stattfindet. In die zweite Meßkammer wird die Probe vorgelegt, in die eine zweite Substanz titriert wird.
Das gesamte System wird auf eine bestimmte Temperatur vorgeheizt, die durch die Isolierung und einen Thermostaten im Inneren, konstant gehalten wird. In dieses System wird in die zweite Meßkammer eine Substanz eintitriert, die einen Wärmeeffekt verursacht, der durch den Thermostaten zwischen beiden Kammern ausgeglichen wird. Die Energie, die dabei durch den Thermostaten verbraucht wird, kann in Wärme umgerechnet werden, die entweder frei (exothermer Effekt) oder verbraucht wird (endothermer Effekt).
Zu 6 mM Liposomensuspension in PBS wurden 1,2 mM Fettsäuredispersion, das entspricht 20 mol% bezogen auf das liposomale Lipid, in 1 mol% Schritten hinzutitriert. Als Leerwert zur Bestimmung der Lösungswärme der Fettsäuren im Puffer wurde der gleiche Versuch ohne Liposomensuspension in der Vorlage wiederholt.

Ergebnisse und Diskussion

Von der bei der Wechselwirkung von Fettsäuren mit Phospholipidvesikeln entstandenen Wärme, wurden die Werte der Wärmetönung, die bei der Titration von Puffer in Puffer und der Titration von Fettsäure in Puffer gemessen wurden, abgezogen. Die drei Kurven bei 10°C zeigen zwischen den Fettsäuren gleicher Kettenlänge (Stearinsäure und Linolsäure) keinen Unterschied in der Wärmetönung (Abbildung 14). Ein geringer exothermer Effekt von ca. 25 kcal/mol nach Zugabe von 1 mol% Fettsäure wurde ermittelt. Bei der kürzerkettigen Myristinsäure ist die Wärmeentwicklung, infolge ihres Einbaus in Vesikelmembranen, deutlich

höher. Der exotherme Effekt nimmt von mehr als 100 kcal/mol bei der ersten Zugabe auf ca. 35 kcal/mol bei der letzten Zugabe ab.

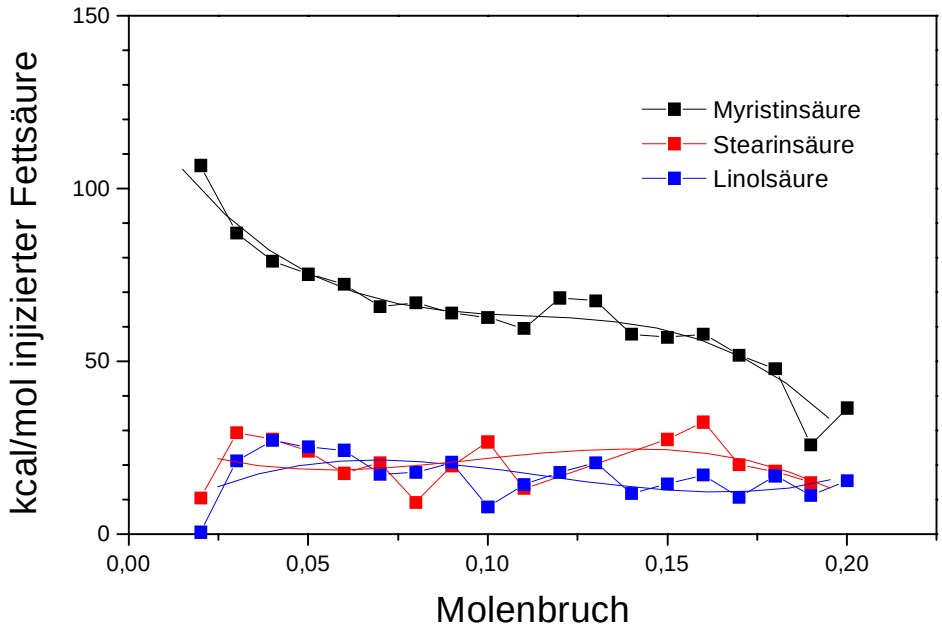


Abbildung 14: Bestimmung der Wärmeentwicklung während des Einbaus von Fettsäuren in HSPC/PG Vesikel durch ITC bei 10 C. (pH = 7,2 in PBS)

Bei 70°C zeigt sich ein anderes Bild (Abbildung 15). Die Wechselwirkung von Linolsäure mit Liposomen ist ein stark exothermer Vorgang mit 850 kcal/mol pro Zugabe. Die beiden anderen Fettsäuren (Stearinsäure und Myristinsäure) zeigen beide eine Wärmeentwicklung um 0 kcal/mol. Die Meßgenauigkeit war bei der hohen Temperatur durch starke Schwankungen der Werte eingeschränkt.

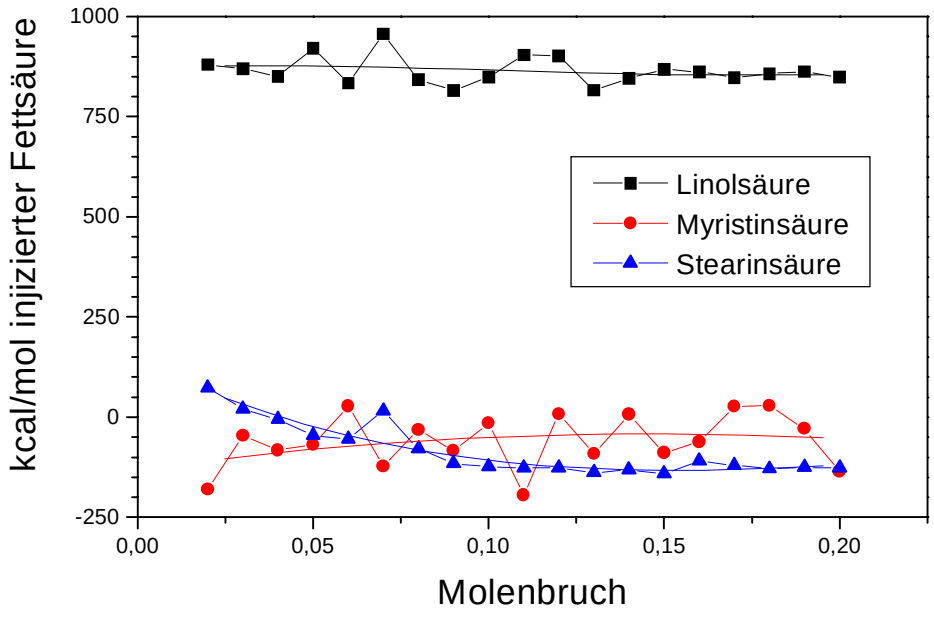


Abbildung 15: Bestimmung der Wärmeentwicklung während des Einbaus von Fettsäuren in HSPC/PG Vesikel durch ITC bei 70 C. (pH = 7,2 in PBS)

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß bei niederen Temperaturen die Höhe der Lösungswärme der Fettsäure im Puffer, die von der Kettenlänge der eingesetzten Fettsäuren abhängt, die Wärmetönung entscheidend bestimmt. Bei hohen Temperaturen dagegen, wenn alle Fettsäuren den gleichen Phasenzustand besitzen, bestimmt der Sättigungsgrad der Fettsäure, und damit ihre Molekülstruktur die Wärmetönung des Einbaus.

4 Bestimmung der Flip-Flop Geschwindigkeit von Fettsäuren im Lipidbilayer durch Potentialmessungen an Black-Lipid Membranes (BLM)

Nach dem Einbau der Fettsäure in die Membran erfolgt der eigentliche Transport durch den Phospholipidbilayer. Die Art des Transportes von langkettigen Fettsäuren durch Zellmembranen wird sehr kontrovers diskutiert. Die Diskussion konzentriert sich dabei auf zwei Modelle, den proteinvermittelten Transport und die freie Diffusion der Fettsäuren durch die Membran.

Argumente für den proteinvermittelten Transport [FITSCHER et al.,1996] sind:

- die Fettsäureaufnahme in Muskelzellen ist sättigbar und kann je nach Trainingszustand unterschiedlich sein.
- die Fettsäureaufnahme in die Zelle kann durch verschiedene Stoffe inhibiert werden, z.B. DIDS oder Phloretin.
- die Aufnahmerate von Fettsäuren ist zellspezifisch.
- durch die Stimulation von fettsäurebindenden Proteinen in E-Coli wird die Fettsäureaufnahme erhöht.

Argumente, die gegen eine Proteinbeteiligung sprechen, sind [ZAKIM, 1996]:

- da die Membranphase und die Konzentration der angebotenen Fettsäure limitiert ist, wird eine Sättigung vorgetäuscht.
- die Inhibitoren der Fettsäureaufnahme beeinflussen auch den Fettsäuremetabolismus der Zelle, was die Änderung der Fettsäureaufnahme durch Gleichgewichtsverschiebung verursacht.
- auch die Zellspezifität und die Stimulierbarkeit können durch Gleichgewichtsverschiebungen erklärt werden.
- auch nach der Denaturierung der Membranproteine findet ein Fettsäuretransport statt.

Da auch in unseren proteinfreien Modellsystemen ein Fettsäuretransport stattfindet, glauben wir zusätzliche Evidenzien dafür gefunden zu haben, daß der Fettsäuretransport in Zellen zumindest teilweise proteinunabhängig verläuft.
Nach der Aufnahme der Fettsäure in den äußeren Teil des Phospholipidbilayers gelangt die Fettsäure durch einen Flip-Flop Mechanismus auf die innere Seite der Doppelschicht. Die

Geschwindigkeit dieses Flip-Flops ist zur mechanistischen Erklärung der „Schädigungswirkung“ von Bedeutung. Fettsäuren unterliegen dem Flip-Flop in ihrer unionisierten Form und führen deshalb zu einer H^+-Ionen Translokation durch die Membran [GUTKNECHT, 1992]. Auf diese Tatsache stützen sich die meisten Untersuchungsmethoden zur Messung des Fettsäure Flip-Flops.

Eine dieser Meßmethoden ist die Erfassung der Änderung des pH-Wertes im Inneren von Phospholipidvesikeln mit Hilfe des pH-sensitiven Fluorophors Pyranin. Mit diesem System haben KAMP et al., 1995 die Halbwertszeit des Flip-Flops von maximal 35 msec von verschiedenen natürlichen Fettsäuren ermittelt.

Ein anderes Verfahren von KLEINFELD et al., 1997 nutzte den Resonanzenergietransfer zwischen Anthroyloxy-gelabelten Fettsäuren und in Vesikeln eingeschlossenem 6-Carboxyfluoreszein. Die Zeitbasis dieser Messungen liegt bei einer Halbwertszeit über 50 sec.

Da uns eine Stopped-Flow Apparatur nicht zur Verfügung stand, wir aber trotzdem eine Zeitbasis für den Flip-Flop in unserem System bestimmen wollten, untersuchten wir diesen mittels Potentialmessungen an **B**lack **L**ipid **M**embranes (BLM).

Material und Methoden

Zusammensetzung der BLM

20 mg/ml Diphytanoylphosphatidylcholin, Avanti Polar Lipids, USA
40 mol% Myristinsäure, Sigma, St.Louis
1 mM Tris (**Tris**-(hydroxymethyl)-aminomethan), Fluka, Buchs, Schweiz
1 mM Mes, Boehringer, Mannheim
100 mM KCl, Buchs, Schweiz

Die BLM wurden durch eine Methode von MUELLER et al., 1963 über einer Öffnung mit dem Durchmesser von 0,8 mm hergestellt. Diese Öffnung befindet sich in einem Diaphragma, das zwei Hälften einer PTFE-Kammer voneinander abtrennt. Der Transmembranflux wurde durch Potentialdifferenzmessungen mit Hilfe einer pH-Elektrode und einer Referenzelektrode erfaßt [POHL et al., 1993 a,b]. Der Flip-Flop der Fettsäure wurde durch einen plötzlichen pH-Sprung, hervorgerufen durch die Zugabe von Salzsäure auf einer Seite der Membran, induziert. Die nachfolgende Änderung des Potentials kann zeitabhängig verfolgt werden.

Ergebnisse und Diskussion

Obwohl die Auflösung nicht im Subsekunden-Bereich lag, konnten wir doch die Zeitbasis bestimmen, in der der Fettsäure-Flip-Flop stattfand.

Nach der Änderung des pH-Wertes stieg das Potential sofort steil an, erreichte einen Maximalwert und relaxierte bei einem Wert oberhalb des Ausgangspotentials (Abbildung 16). Der Anstieg zwischen der Zugabe und dem Erreichen des Maximalwertes repräsentiert den Fettsäure Flip-Flop.

Der Flip-Flop, der durch diesen pH-Gradient erzwungen wurde, endete nach 10 Sekunden, was einer Halbewertszeit von 5 Sekunden entspricht. Da die zeitliche Auflösung der Meßanordnung aber keine genaueren Aussagen zuließ, mußte ein Fehler von 50% einkalkuliert werden.

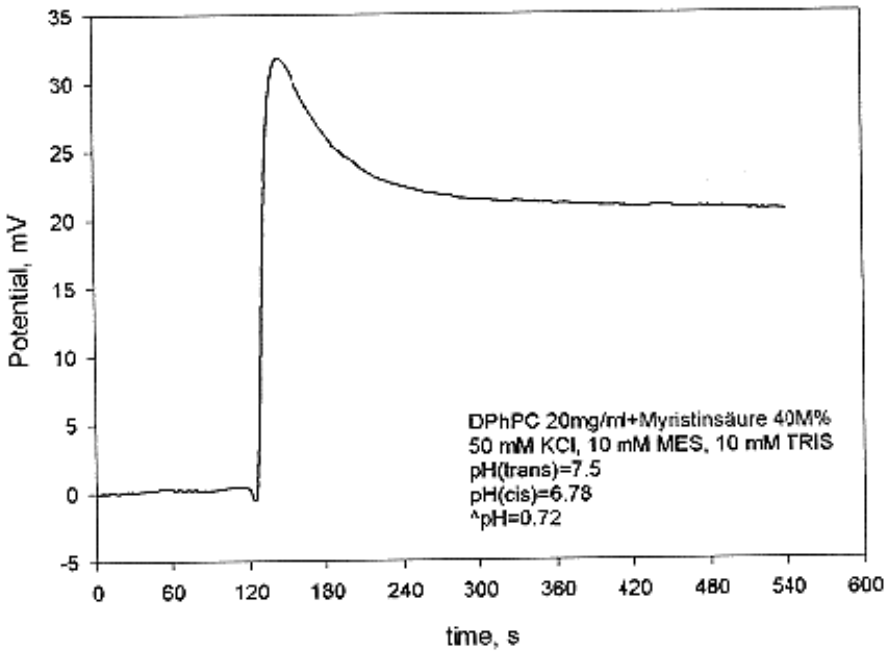


Abbildung 16: Durch Senkung des pH-Wertes hervorgerufene Änderung der Potentialdifferenz einer BLM.

Die enorme Geschwindigkeit des Fettsäuretransports in proteinfreien Modellsystemen läßt die Beteiligung eines proteinabhängigen Transports fraglich erscheinen.Die postulierte Transportfunktion von fettsäurebindenden, membranständigen Proteinen konnte bisher nicht bewiesen werden. [ZHOU et al., 1992 und SCHMIDER et al., 1996].

5 Fettsäure-induzierte Schädigung von Membranen

5.1 Fettsäure-induzierte Schädigung an Modellmembranen

Um einen detergensähnlichen „Schädigungseffekt“ der Fettsäuren an Modellmembranen nachzuweisen, wählten wir drei Parameter, die sowohl strukturelle Änderungen, als auch einen Funktionsverlust der Liposomenmembran sichtbar machen können.
Der erste Parameter, der auch bei biologischen Membranen eine große Rolle spielt, ist die Impermeabilität der intakten Membran gegenüber hydrophilen Stoffen. Dieser Parameter wurde bereits herangezogen, um den Einfluß von synthetischen Detergentien auf Liposomen [LASCH, 1995] zu charakterisieren, sowie die Schädigung der Membran durch Lipidperoxidationsprodukte [ZHANG et al., 1993] nachzuweisen.
Der zweite Parameter, der eigentlich zur Charkterisierung von Liposomen herangezogen wird, jedoch auch Einblicke in den Mechanismus der Schädigung zuläßt, ist die Messung der Größe von Vesikeln bzw. deren Größenänderung. Diese Methode wurde zeitabhängig bisher meistens zur Charakterisierung der Lagerungsstabilität [KIBAT und STRICKER, 1986] oder in stationären Systemen als zusätzliche Meßmethode zu kalorimetrischen Untersuchungen von Solubilisierungsenergien verwendet [KELLER, 1997].
Der dritte Parameter, der sich aus dem zweiten direkt ableitet, ist die Stabilität der Vesikel gegenüber Fusion. Durch Fusionsereignisse lassen sich Hinweise auf Änderungen der Mikrostruktur im Liposomenbilayer finden.

5.1.1 Bestimmung der Fettsäure-induzierten Permebilitätserhöhung von Biomembranen

Eine generelle Eigenschaft von Biomembranen ist die Abgrenzung von hydrophilen Reaktionsräumen in Zellen. Deshalb ist es ein wichtiges Funktionskriterium, hydrophile Stoffe nicht permeieren zu lassen. Der Durchtritt solcher Stoffe ist ein Parameter zur Erkennung struktureller Störungen der Membran. Wir bezeichnen die Erhöhung der Permeabilität einer Membran als „Schädigung“, weil im Zellsystem ein Ausfall dieser Barriere zum Zelltod führt.
Im liposomalen Modellsystem wird oft ein 6-**C**arboxy**f**luoreszein (6-CF) Leakage Test (Abbildung 18) als Kriterium der Permeabilität der Membran für hydrophile Stoffe genutzt [WEINSTEIN et al. 1977; BLUMENTHAL et al. 1977].

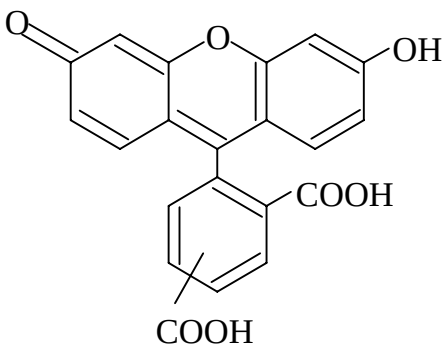


Abbildung 17: Molekülstruktur von 5-6 Carboxyfluoreszein

Hydrophiles 6-CF wird in selbstquenchender Konzentration im Inneren von Liposomen eingeschlossen und zeigt dort nur eine geringe Grundfluoreszenz. Wird die Membran permeabel, fließt das 6-CF aus und wird dabei im hydrophilen Außenvolumen verdünnt, was einen Anstieg der Fluoreszenz zur Folge hat .

Damit die Membran für 6-CF durchlässig wird, genügt es nicht, daß ihre Struktur nur geringfügig verändert wird, vielmehr müssen in der Membran porenartige Störstellen in solcher Größenordung enstehen, daß das Molekül einschließlich Hydrathülle durch die Lipiddoppelschicht passieren kann. Nach Zugabe von Cholsäure [SCHUBERT und SCHMIDT, 1988] und Gallensalzen [SCHUBERT et al.,1986] wurde die Existenz solcher Löcher durch Effluxmessungen mit Dextranen, Inulin und Raffinose nachgewiesen.

Material und Methoden

PBS pH = 7,2 (ohne Ca^{2+} oder Mg^{2+})

HSPC, SIGMA Chemical, St.Louis

DPPG, SIGMA Chemical, St.Louis

cis-Linolsäure, SIGMA Chemical, St.Louis

6-Carboxyfluoreszein (6-CF), SIGMA Chemical, St.Louis.

Myristinsäure, SIGMA Chemical, St.Louis.

Stearinsäure, SIGMA Chemical, St.Louis

Ölsäure, SIGMA Chemical, St.Louis.

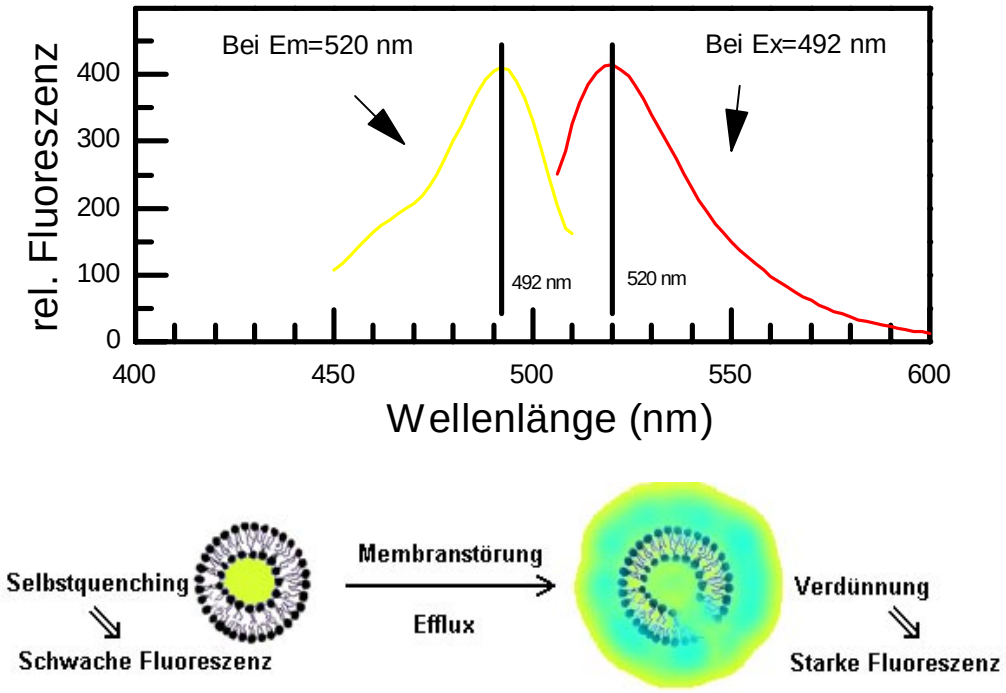


Abbildung 18: Anregungs- und Emissionsspektrum von 6-CF und Prinzip des 6-CF Leakage Assays

Liposomenpräparation

LUV wurden durch Extrusion von multilamellaren Vesikeln hergestellt. Ein Lipidfilm (30 µmol) hydratisiertes Sojabohnen Phosphatidylcholin/Phosphatidylglyzerol (10:1) wurde durch Entfernen des Lösungsmittels durch einen Rotationsverdampfer an der Wandung eines 25 ml Rundkolbens hergestellt. 1 ml einer Lösung von PBS pH = 7,2 mit 6-CF in selbsquenchender Konzentration, 100 mM, werden hinzugegeben. Durch das Erwärmen dieser Lösung über die Phasenumwandlungstemperatur der Lipidmischung entstehen unter Schütteln spontan multilamellare Vesikel verschiedener Größe.

Diese Vesikel wurden durch eine Polycarbonatmembran mit 200 nm Porengröße mindestens fünfmal extrudiert (Polycarbonatmembran, Costar, Deutschland; Extruder, Lipex Biomembrane, Kanada). Anschließend wurde diese Liposomenlösung gegen PBS dialysiert, um überschüssiges, nicht in Liposomen eingeschlossenes 6-CF zu entfernen. Um das Ergebnis der Präparation beurteilen zu können, wurden die Vesikel mit einer Laserlichtstreumethode auf ihre Größenverteilung untersucht, und danach die Gesamtmenge des eingeschlossenen 6-CF

durch Messung der Fluoreszenz nach vollständiger Solubilisierung einer Probe der Liposomen durch Ultrabeschallung bestimmt.
Die Größenbestimmung ergab eine mittlere Größe von 190 nm mit einem Polydispersitätsindex unter 0,15. Die Einschlußkonzentration des 6-CF betrug 1mM. Die Abweichung verschiedener Liposomenpräparationen von diesen Charakteristika lag unter 5%, andernfalls wurden die Präparationen verworfen und nicht zur Messung genutzt. Die Lagerstabilität dieser Liposomen betrug mindestens 2 Monate bei Kühlschranktemperatur. Das 6-CF Leakage lag in diesem Zeitraum unter 5%, die Größenstabilität blieb noch länger erhalten. Um möglichst definierte Vesikel einzusetzen, wurden einzelne Liposomenchargen
höchstens 1 Monat verwendet.

6-CF Leakage Assay

5 µl der Liposomensuspension wird in einer Fluoreszenzküvette mit 2 ml PBS gemischt. Danach wird eine halbe Stunde der Leerwert bestimmt, d.h. es wird der 6-CF Efflux ohne Zugabe von Effektoren von außen verfolgt. Zu dieser Mischung wird mit Ultraschall dispergierte Fettsäure in 1 ml PBS hinzugegeben und der Anstieg der Fluoreszenz des entquenchten 6-CF verfolgt.
Küvette mit interner Magnetrührung, Temp.: 25°C, Hitachi 2000 Fluoreszenzspektrometer: λ_{Ex} = 491 nm, λ_{Ex} = 520 nm, Spaltbreite je 5 nm.

Ergebnisse und Diskussion

Der Einfluß von Fettsäuren auf die Permeabilität von Modellmembranen wurde bisher nur im Zusammenhang mit der Bildung von Lysolipiden und Fettsäuren durch enzymatische Hydrolyse von Phospholipiden gemessen [GRIT und CROMMELIN, 1992]. HUANG, 1992 erreichte durch pH Änderung eine Permeabilisierung von Liposomen, die aus einer Fettsäure/PC Mischung bestanden. Unter physiologischen Bedingungen untersuchten DE LA MAZA und PARRA 1996 und LASCH et al. 1990 die Zeitabhängigkeit des Einflusses von Detergentien auf Phospholipidbilayer. Das Ergebnis beider Untersuchungen war eine Erhöhung der Membranpermeabilität für 6-CF als Folge steigender Detergenszugabe zu den Vesikeln.
Die Abbildungen 19 bis 21 zeigen den Einfluß der dem Versuchsansatz zugegebenen Fettsäuremenge auf das 6-CF-Leakage der Vesikel. Alle Kurven zeigen einen biphasigen Verlauf. Ein starkes, schnelles Leakage innerhalb der ersten 2 Minuten wird gefolgt von einem flacheren zweiten Kurvenabschnitt der ein langsameres, weniger ausgeprägtes Leakage zeigt.

Nach einer Stunde ist das Leakage bei allen Versuchen abgeschlossen, ohne daß der gesamte 6-CF Inhalt ausgelaufen ist. Nach dieser Zeit wurde ein stabiler Endzustand erreicht und es ist eine neue impermeable Vesikelpopulation entstanden. Nur bei Zugabe sehr hoher Fettsäurekonzentrationen wird ein fast vollständiges Leakage erreicht.

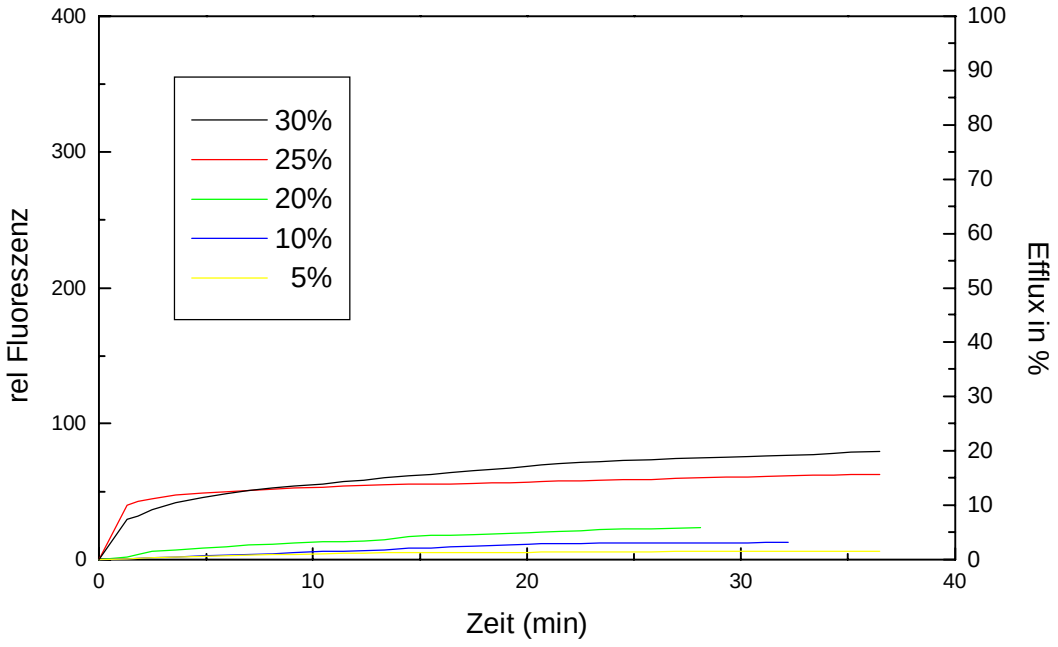


Abbildung 19: Konzentrationsabhängigkeit des Stearinsäure-induzierten 6-CF Leakages aus HSPC/PG Vesikeln. (λ_{Ex} = 492 nm, λ_{Em} = 520 nm, pH = 7,2 in PBS)

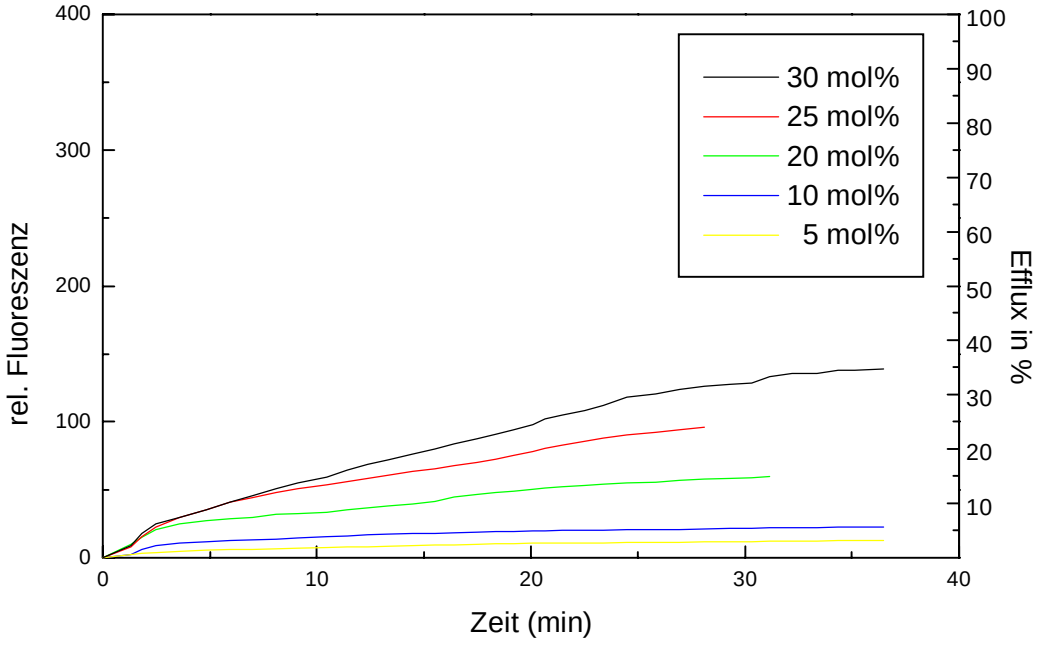


Abbildung 20: Konzentrationsabhängigkeit des Ölsäure-induzierten 6-CF Leakages aus HSPC/PG Vesikeln. (λ_{Ex} = 492 nm, λ_{Em} = 520 nm, pH = 7,2 in PBS)

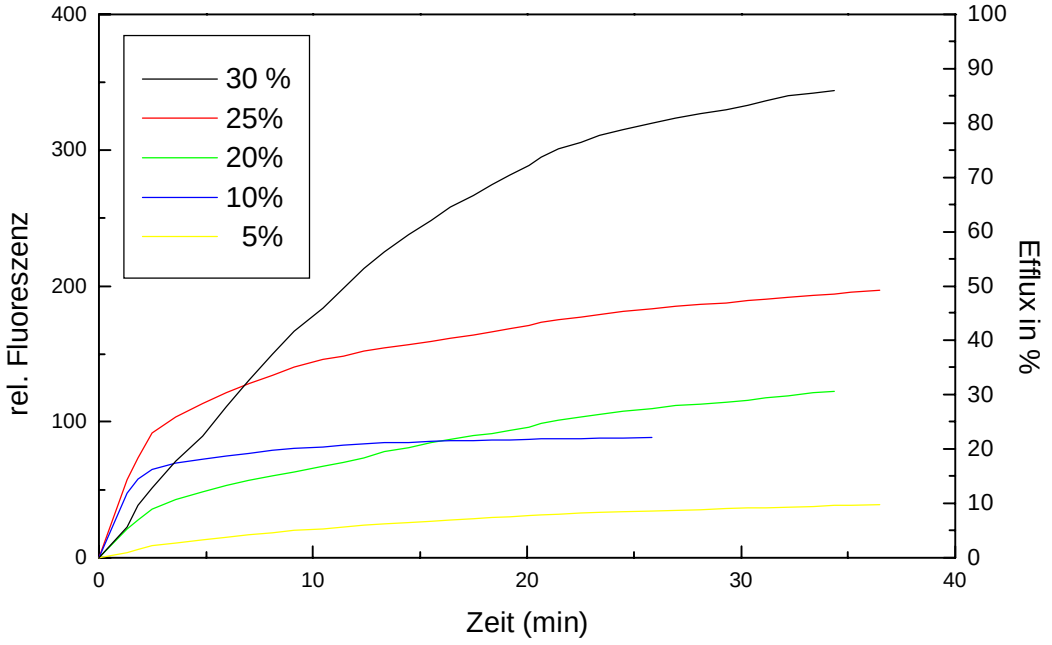


Abbildung 21: Konzentrationsabhängigkeit des Linolsäure-induzierten 6-CF Leakages aus HSPC/PG Vesikeln. (λ_{Ex} = 492 nm, λ_{Em} = 520 nm, pH = 7,2 in PBS)

Einen überraschend ausgeprägten Effekt zeigt die Darreichungsform der Fettsäuren. Fettsäuren, die zuvor in die Liposomen eingebaut wurden, verhielten sich völlig anders als Fettsäuren, die sich aus dem hydrophilen Medium in die Membranen. So blieben Liposomen mit 20 mol% zugemischter Fettsäure für mehr als zwei Wochen größenstabil und zeigten über diese Zeit nur ein sehr geringes Leakage, vergleichbar mit dem fettsäurefreier Liposomen (Daten sind nicht gezeigt).

Die aus dem Medium aufgenommenen Fettsäuren verursachen dagegen große Störungen der Membranintegrität kurze Zeit nach ihrem Einbau in die Membran. Bei Fettsäuremengen unterhalb einer lytischen Konzentration ist dieser Vorgang nach einer Stunde beendet.

Die Stärke der Membranstörung hängt nicht nur von der Menge der zugegebenen Fettsäure, sondern auch von der Art der Fettsäure ab. Die Abbildungen 22-26 zeigen die Abhängigkeit des 6-CF Leakages von der Art der zugesetzten Fettsäure bei unterschiedlichen Konzentrationen.

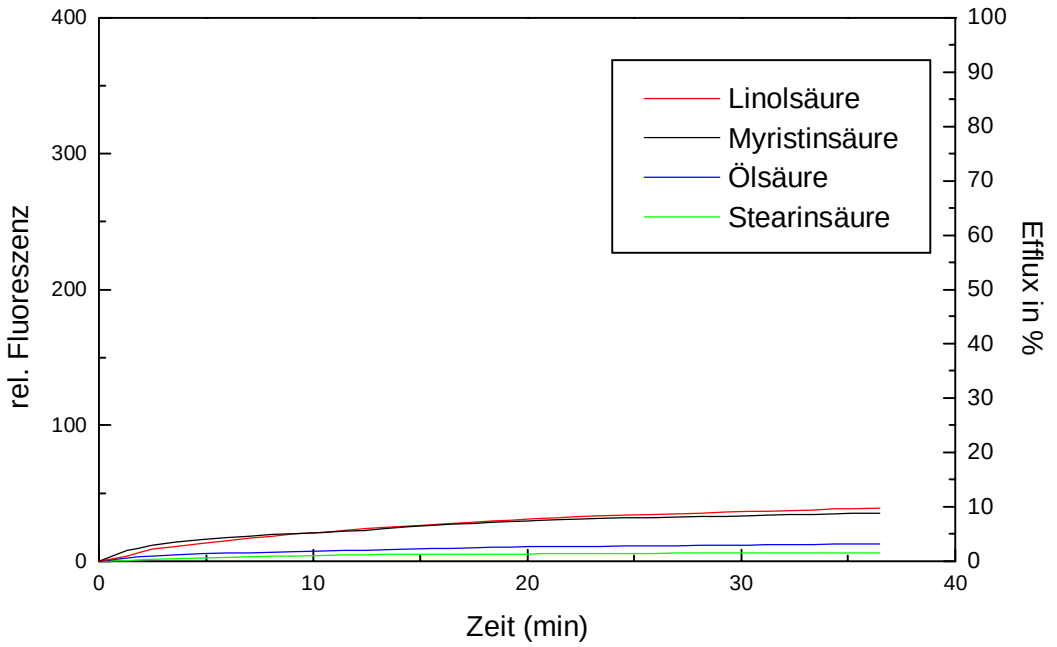


Abbildung 22: 6-CF Leakage aus HSPC/PG Vesikel induziert durch Zugabe von 5mol% freier Fettsäuren. (λ_{Ex} = 492 nm, λ_{Em} = 520 nm, pH = 7,2 in PBS)

Bereits bei einer Konzentration von 5 mol% Fettsäure, bezogen auf den Gesamtlipidgehalt, unterscheidet sich das Permeabilisierungsvermögen gesättigter und ungesättigter Fettsäuren gleicher Kettenlänge ebenso, wie lang- und kurzkettiger Fettsäuren. Bei höher konzentrierten

Zumischungen sind diese Effekte noch ausgeprägter. Je kürzerkettig und je ungesättigter die zugegebene Fettsäure ist, umso stärker ist das 6-CF Leakage.

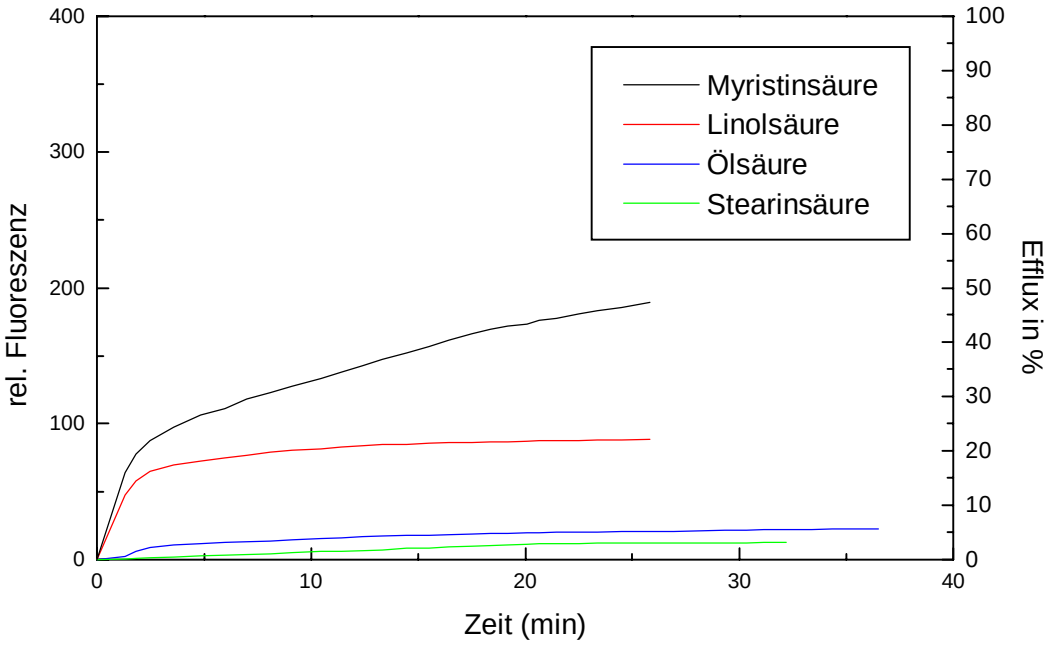


Abbildung 23: 6-CF Leakage aus HSPC/PG Vesikel induziert durch Zugabe von 10 mol% freier Fettsäuren. (λ_{Ex} = 492 nm, λ_{Em} = 520 nm, pH = 7,2 in PBS)

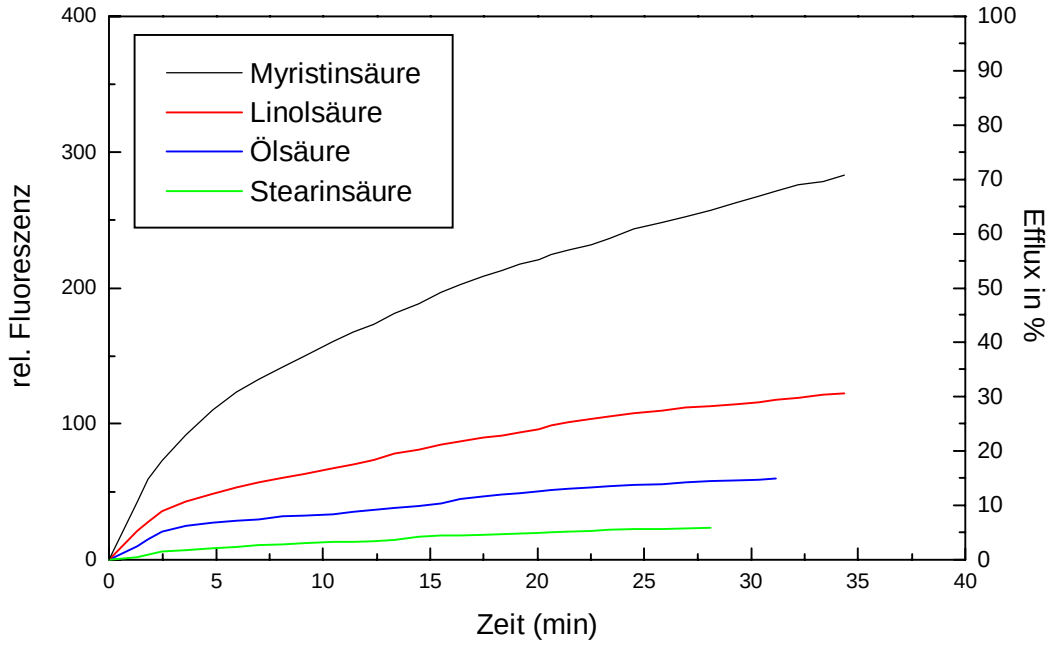


Abbildung 24: 6-CF Leakage aus HSPC/PG Vesikel induziert durch Zugabe von 20 mol% freier Fettsäuren. (λ_{Ex} = 492 nm, λ_{Em} = 520 nm, pH = 7,2 in PBS)

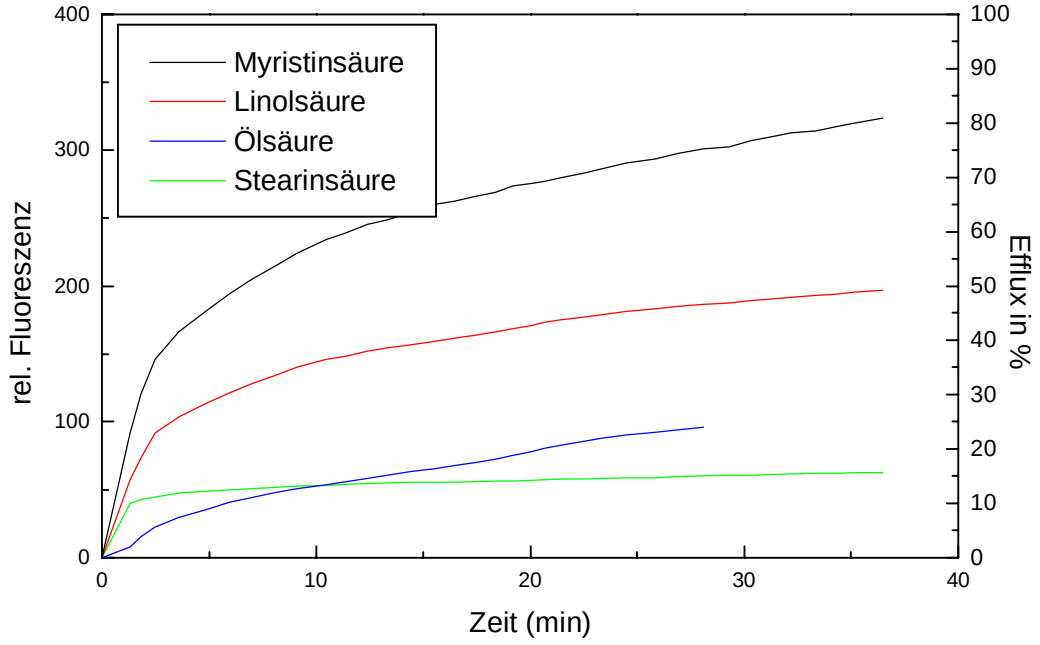


Abbildung 25: 6-CF Leakage aus HSPC/PG Vesikel induziert durch Zugabe von 25 mol% freier Fettsäuren. (λ_{Ex} = 492 nm, λ_{Em} = 520 nm, pH = 7,2 in PBS)

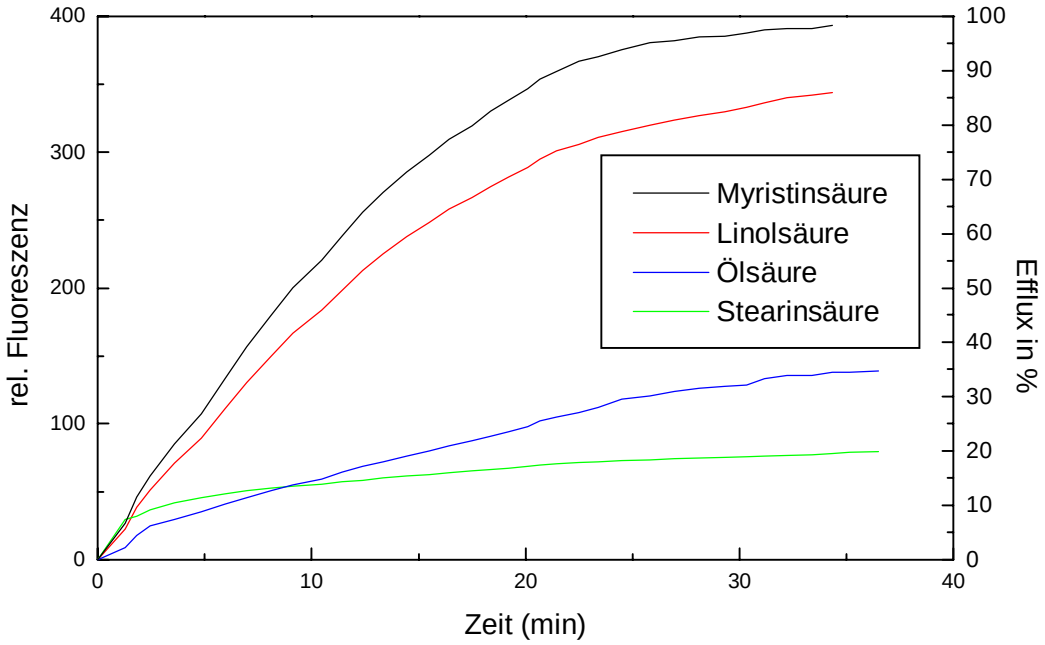


Abbildung 26: 6-CF Leakage aus HSPC/PG Vesikel induziert durch Zugabe von 30 mol% freier Fettsäuren. (λ_{Ex} = 492 nm, λ_{Em} = 520 nm, pH = 7,2 in PBS)

Die kurzkettige Myristinsäure unterscheidet sich im gemessenen Konzentrationsbereich darüber hinaus von den anderen Fettsäuren. Ab Konzentrationen über 10 mol % kommt es auch nach 60 Minuten zu keinem stabilen Endwert der Fluoreszenzintensität. Vielmehr wird ein fast vollständiger Ausfluß des 6-CF über mehrere Stunden beobachtet. Daraus folgt, daß Myristinsäure in Konzentrationen über 10 mol% die Membran vollständig solubilisiert.

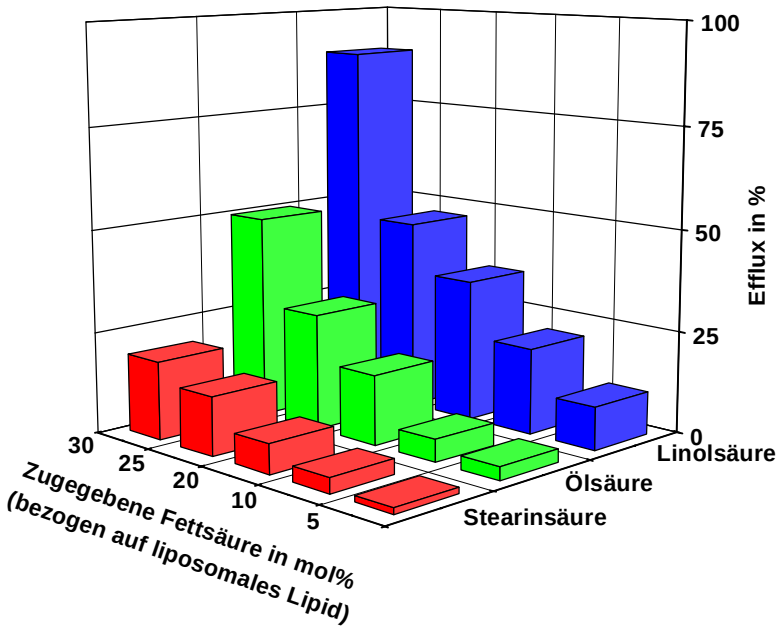


Abbildung 27: Maximalwerte des 6-CF Leakage aus HSPC/PG Vesikeln induziert durch die Zugabe freier Fettsäuren. (λ_{Ex} = 492 nm, λ_{Em} = 520 nm, pH = 7,2 in PBS)

In Abbildung 27 sind die maximalen Auslaufmengen für die untersuchten Fettsäuren dargestellt. Für kleine Fettsäurekonzentrationen gilt eine proportionale Abhängigkeit der Auslaufmenge von der Konzentration der zugesetzten Fettsäure. Im Falle der Linolsäure tritt bei einer Zumischung von mehr als 25 mol% kein stabiler Endzustand auf. Die Vesikel zeigen ab dieser Konzentration fast vollständiges Leakage. Da die Solubilisierungskonzentration der Myristinsäure schon bei 10 mol% erreicht wurde, wurde sie nicht in Abbildung 27 aufgenommen.

5.1.2 Fettsäureinduzierte Fusogenität von Phospholipidvesikeln

Eine weitere Membraneigenschaft, die Aussagen über die Stabilität und die strukturelle Integrität einer Membran ermöglicht, ist ihre Tendenz mit anderen Membranen zu fusionieren. Fettsäuren werden schon seit langem als fusogene Substanzen diskutiert. Messungen wurden dabei an Erythrozytenghosts [CULLIS und HOPE, 1978; AHKONG et al., 1973], sowie an

gemischten Fettsäure/PC Vesikeln [ZELLMER et al., 1994, HUANG, 1992; WILSCHUT et al., 1992] oder in verschiedenen liposomalen Modellmembransystemen, aus denen enzymatisch Fettsäuren und Lysolipiden freigesetzt wurden [HOWELL et al., 1973], durchgeführt. In allen Fällen wurde eine verstärkte Tendenz zu Membranfusionen beobachtet.

Den Fusionsvorgang von Liposomen gliedert man heute in drei Schritte (Abbildung 28):

1. die Aggregation,
2. die Ausbildung eines molekularen Kontaktes der Liposomenoberflächen und
3. die Destabilisierung der Bilayer. [WILSCHUT et al., 1988].

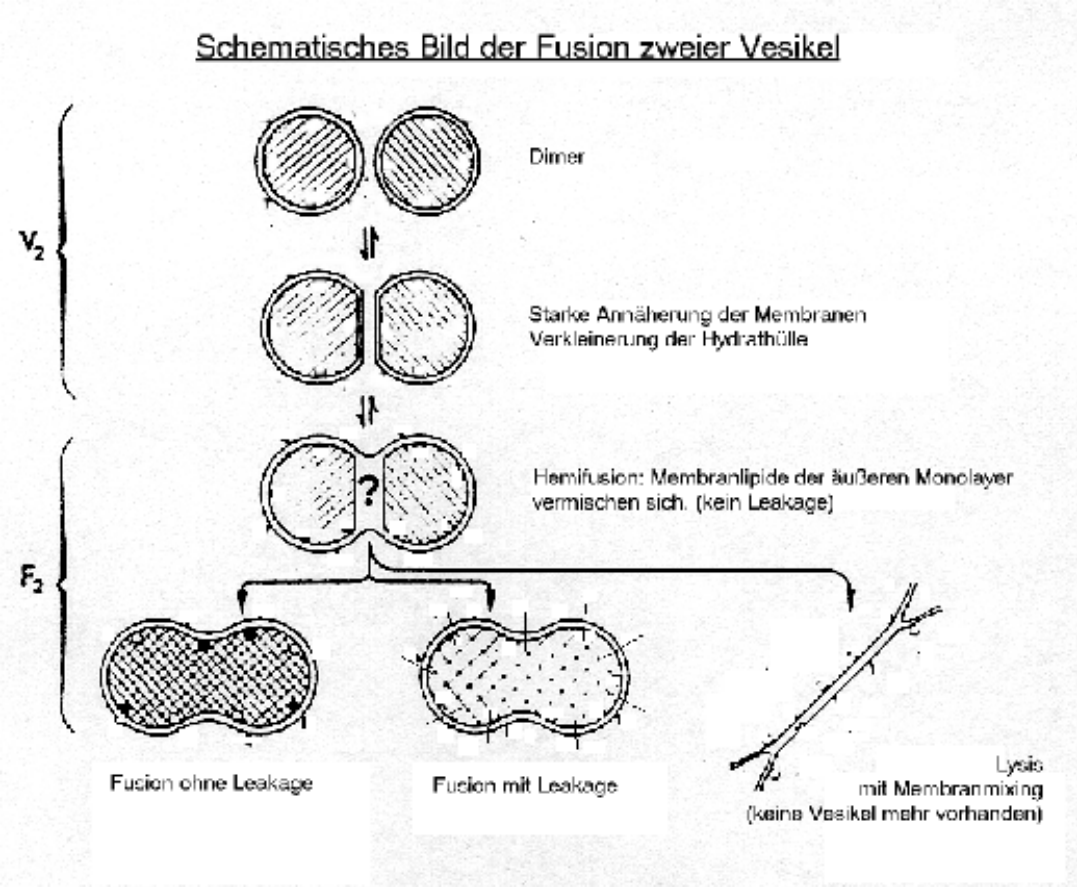


Abbildung 28: Mechanismus der Vesikelfusion [WILSCHUT et al., 1988]

Damit Vesikel aggregieren, müssen sowohl die elektrostatische Abstoßungskraft als auch die Hydratationsenergie der Kopfgruppen im Liposomenbilayer überwunden werden. Ist dies geschehen, wirken VAN DER WAALS Kräfte vor allem zwischen den hydrophoben Molekülbereichen beider Bilayer, die das System in molekularen Kontakt bringen und es zugleich stabilisieren. Das allein führt jedoch noch nicht zur Fusion beider Membranen. Es muß

außerdem eine laterale Destabilisierung der Membran auftreten, um den Fusionsprozeß in Gang zu setzen. Vorzugsweise werden die Membranregionen am Rand der Kontaktstelle zwischen den beiden Bilayern destabilisiert. Durch die starke Krümmung der Membran an diesen Stellen entstehen Strukturstörungen, die zu einem Fusionieren der äußeren Monolayer beider Membranen führt. Dieser Vorgang wird als Hemifusion bezeichnet. Der Fusionsprozeß kann in weiteren Schritten entweder zur Entstehung größerer gemischter Vesikeln führen, wobei ein Leakage auftreten kann oder die Membranen werden vollständig lysiert und die Vesikel zerstört.

Um die Fettsäure-induzierte Liposomenfusion nachzuweisen und von der Liposomenaggregation zu unterscheiden, nutzten wir einen Membranmixing-Assay mit Hilfe eines Resonanzenergietransfers [STRUCK et al., 1981] (Abbildung 29).

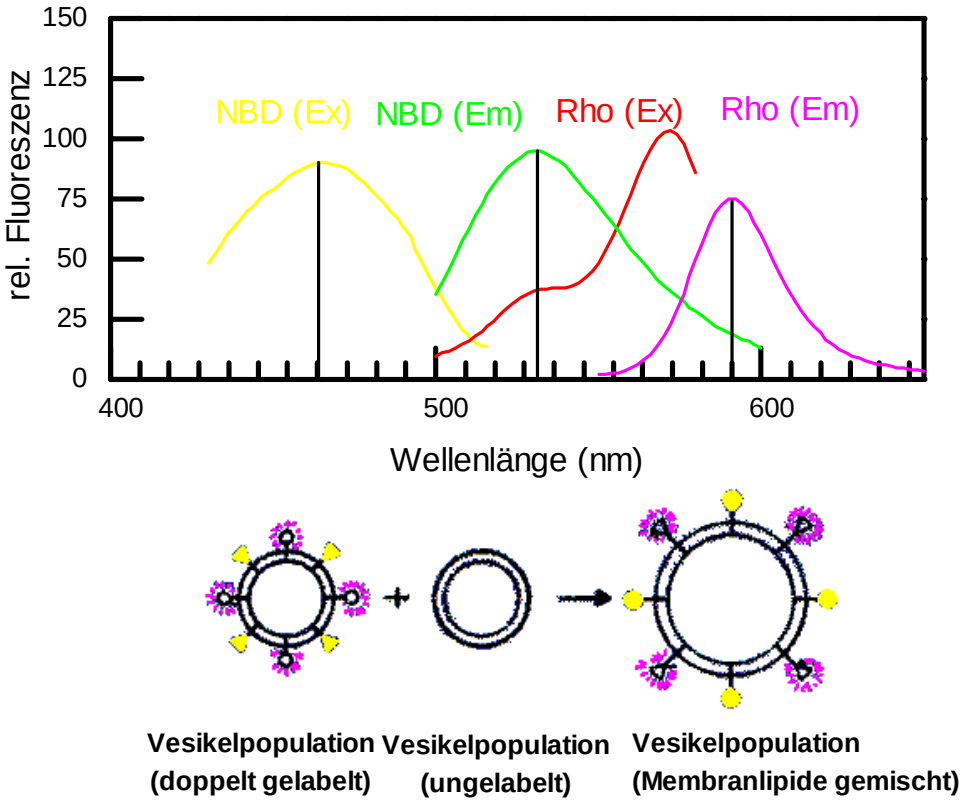


Abbildung 29: Schema des Lipidmixingassays zur Bestimmung einer Liposomenfusion. Der Resonanzenergietransfer zwischen NBD-PE und Rhodamin-PE wird durch die Verdünnung der Membranlipide geändert. (NBD-PE: λ_{Ex} = 450 nm, λ_{Em} = 525 nm, Rhodamin-PE: λ_{Ex} = 520 nm, λ_{Em} = 592 nm)

Die zwei Vesikelpopulationen, die zur Fusion gebracht werden, unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lipidzusammensetzung nicht. Eine Liposomenpopulation wurde zuvor mit NBD-PE und Rhodamin-PE doppelt fluoreszenzmarkiert. Die andere Vesikelpopulation enthält keinen Fluoreszenzfarbstoff.

Sind die Fluoreszenzfarbstoffmoleküle NBD und Rhodamin in einer Membran eng benachbart, kann zu einem strahlungslosen FÖRSTER-Energietransfer zwischen beiden Molekülen kommen. Bei einer Anregung des NBDs kann dessen Energie auf das Rhodamin übertragen und Rhodamin somit zur Fluoreszenz angeregt werden (**R**esonanz**e**nergie**t**ransfer, RET). Die Konzentration beider Farbstoffe wurde so gewählt, daß ein optimaler Transfer stattfinden konnte. Werden die Fluoreszenzfarbstoffmoleküle, beispielsweise durch die Vergrößerung der Membranfläche infolge einer Vesikelfusion voneinander entfernt, verringert sich der Energietransfer. Die Fusion fluoreszenzmarkierter und nicht-markierter Vesikel kann als abnehmende Fluoreszenzintensität des Rhodamins nachgewiesen und quantifiziert werden. Gleichzeitig nimmt das Fluoreszenzsignal des Donors (NBD) zu. Beide Fluoreszenzänderungen lassen sich über die Zeit verfolgen. Die Meßmethode ist so aufgebaut, daß eine Vesikelaggregation kein Meßsignal ergibt.

Um den Verdünnungseffekt zu maximieren, und damit die Änderung der Fluoreszenz beider Fluorophore zu steigern, werden die unmarkierten Vesikel im 4-fachen Überschuß eingesetzt.

Material und Methoden

PBS pH = 7,2 (ohne Ca^{2+} oder Mg^{2+})

cis-Linolsäure SIGMA Chemical, St.Louis

Myristinsäure SIGMA Chemical, St.Louis

Stearinsäure,. SIGMA Chemical, St.Louis

NBD-PE, AVANTI Polar Lipids, Alabama, USA

Rhodamin-PE, AVANTI Polar Lipids, Alabama, USA

Liposomenpräparation

Doppelt markierte LUV wurden durch Extrusion von multilamellaren Vesikeln hergestellt. Ein Lipidfilm (30µmol) hydratisiertes Sojabohnen Phosphatidylcholin/Phosphatidylglyzerol (10:1) und jeweils 0,5 mol% NBD-PE und Rhodamin-PE wurde durch Verdampfen des Lösungsmittels an der Wandung eines 25 ml Rundkolbens erzeugt. 1 ml PBS pH = 7,2 wurde hinzugefügt. Durch Erwärmen dieser Mischung über die Phasenumwandlungstemperatur des

Lipids (über 65°C) entstanden unter Schütteln spontan multilamellare Vesikel verschiedener Größe.
Diese Vesikel wurden durch eine Polycarbonatmembran mit 200 nm Porengröße fünfmal extrudiert (Polycarbonatmembran, Costar, Deutschland; Extruder, Lipex Biomembrane, Kanada). Die Größenbestimmung mittels dynamischer Lichtstreuung ergab eine mittlere Größe von 190 nm mit einem Polydispersitätsindex unter 0,150. Die Herstellung der unmarkierten Liposomenpopulation erfolgte analog ohne Zumischung von NBD-PE und Rhodamin-PE.

Vesikelfusionstest mit dem Resonanzenergietransfer Dilution Assay

10 µl 30 mM Liposomensuspension markiert mit 0,5 mol% NBD-PE und 0,5 mol% Rhodamin-PE wurden mit 40 µl unmarkierten Liposomen der gleichen Konzentration in 2 ml PBS suspendiert. Zu dieser Suspension wurden 100 nmol Fettsäure (20 mol% bezogen auf gesamtes liposomales Lipid), dispergiert mit Ultraschall in 1ml PBS, hinzugegeben. Die Änderungen der Fluoreszenz an den Emissionsmaxima beider Fluorophore wird parallel verfolgt. Zur Verbesserung des Signal-Rauschabstandes wird der Quotient aus beiden Kurven gegen die Zeit aufgetragen. Den 100%-Gesamtwert der Fusion erhält man, indem der Versuchsansatz 7 Gefrier-Tau-Schritten unterzogen wird, wobei die Fluoreszenz beider Fluorophore vor und nach diesen Schritten gemessen wurde. Als Leerwert (Blank) wurde die Membranverdünnung, die ausschließlich durch die Fettsäuren verursacht wird, bestimmt. Die Zugabe von 20 mol% Fettsäure zu den fluoreszenzmarkierten Vesikeln führt zu keiner meßbaren Fluorophorverdünnung (siehe Abbildung 30).

Ergebnisse und Diskussion

Die Abbildung 30 zeigt den Verlauf der Fettsäure-induzierten Vesikelfusion. Alle untersuchten Fettsäuren führen die Fusion der fluoreszenzmarkierten und nicht-markierten Liposomen herbei. Die Fusion erfolgt in zwei Phasen. Einer schnellen Änderung der Fluoreszenzintensitäten unmittelbar nach Zugabe der Fettsäuren folgt über einen längeren Zeitabschnitt eine geringe Änderung des Meßsignals. Nach ca. einer Stunde ist der Membranmix, der durch die Zugabe von Linolsäure, Ölsäure und Stearinsäure ausgelöst wurde, abgeschlossen.

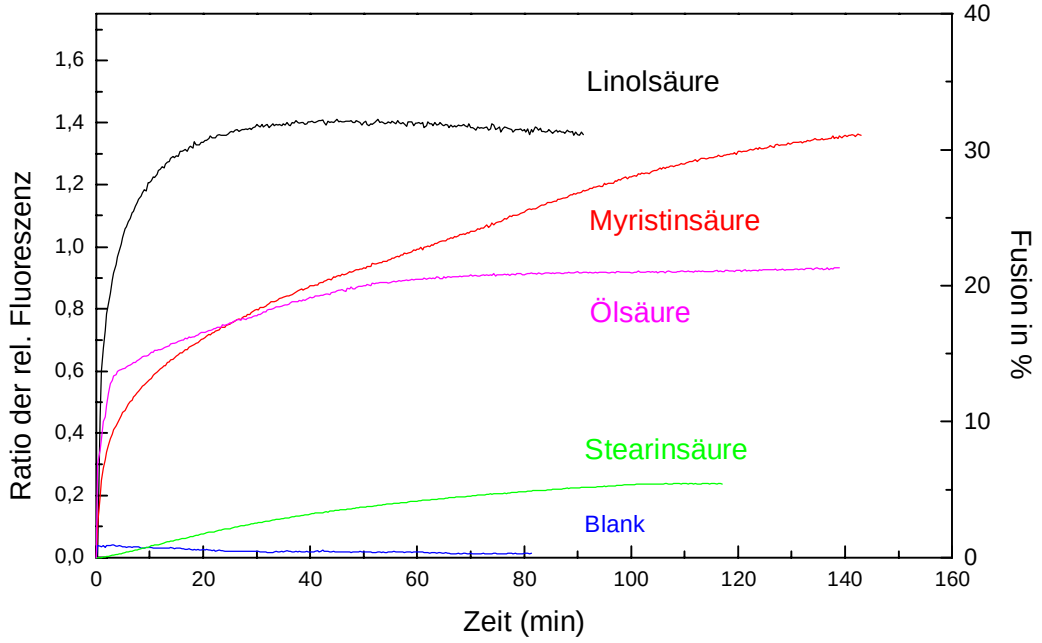


Abbildung 30: Nachweis der Fettsäure-induzierten Fusion von HSPC/PG Vesikeln durch Resonanzenergietransfer zwischen NBD-PE und Rhodamin-PE. (NBD-PE: λ_{Ex} = 450 nm, λ_{Em} = 525 nm, Rhodamin-PE: λ_{Em} = 592 nm; pH = 7,2 in PBS; zugegebene Fettsäure je 20 mol% bezogen auf liposomales Lipid)

Ähnlich wie die Permeabilisierung von Liposomen verläuft auch die Vesikelfusion, die durch Myristinsäure induziert wird, anders als die der übrigen untersuchten Fettsäuren. Nach Zugabe von 20 mol% Myristinsäure steigt das gemessene Fusionsignal permanent an und erreicht keinen Endwert. Das bedeutet, daß sich die Membran nicht mehr stabilisieren kann und komplett lysiert wird, was sich in der vollständigen Verdünnung der Fluorophore in den Vesikelmembranen äußert.

Um die Fusion von Vesikeln zu initiieren, muß die Fettsäure die Aggregation zwischen den Vesikeln fördern. Wie bereits aus den kapillarelektrophoretischen Untersuchungen zur Erfassung der aufgenommenen Fettsäuremenge hervorgeht, führt die Inkorporation von Fettsäuren in die Vesielmembran zu einer Verminderung der Nettoladung an der Membranoberfläche. Die Folge ist eine Hydrophobisierung [OHKI und ARNOLD, 1990] der Membran. Diese Hydrophobisierung ermöglicht die Annäherung der Membranen unterschiedlicher Liposomen aneinander. Somit wird die Aggregation und schließlich die Fusion der Liposomen gefördert [OHKI und ARNOLD, 1990].

Der entscheidende Schritt zur Membranfusion wird durch eine Destabilisierung der Membran an Stellen mit starker Krümmung initiiert. An diesen Stellen sind hauptsächlich die eingebauten einkettigen Fettsäuren konzentriert. Dabei wird in dieser Region eine Phasengrenze erzeugt, die strukturell instabil ist. Diese temporäre und örtlich begrenzte Änderung der Membraneigenschaften durch den Einbau der Fettsäuren, interpetieren wir auch hier als „Membranschädigung“.

5.1.3 Größenmessungen der Vesikel mit dynamischer Laserlichtstreuung

Um den Mechanismus und die möglichen Ursachen für die Änderung der Membranpermeabilität und die Steigerung der Fusogenität zu finden, wurde die Größe der Liposomen zeitabhängig nach der Fettsäurezugabe bestimmt [CHONG und COLBOW, 1976]. Durch die Größenmessungen können Aussagen über die Aggregation [WONG und THOMPSON, 1982], die Fusion [SUN et al., 1978; GAST et al., 1982] bzw. die Lysis von Vesikeln getroffen werden [SCHURTENBERGER et al., 1984].
Die untersuchten Liposomen verändern unter den Standardbedingungen (25°C, pH = 7,2 in PBS) ihre Größe nicht. Die Stabilität wurde über Wochen durch dynamische Lichtstreumessungen überprüft [LESIEUR et al., 1991]. Auch Mischvesikel (Fettsäure + HSPC/PG) mit einem Anteil von 20 mol% Fettsäure sind unter diesen Bedingungen stabil.

Material und Methoden

PBS pH = 7,2 (ohne Ca^{2+} oder Mg^{2+})
HSPC, SIGMA Chemical, St.Louis
DPPG, SIGMA Chemical, St.Louis
cis-Linolsäure, SIGMA Chemical, St.Louis
Myristinsäure, SIGMA Chemical, St.Louis.
Stearinsäure, SIGMA Chemical, St.Louis
Ölsäure, SIGMA Chemical, St.Louis.
Malvern Autosizer IIc, Malvern Instruments, UK

Lichtstreumessungen

Jeweils 20 µl Liposomensuspension werden in 2 ml PBS verdünnt.

Nach Zugabe von je 20 mol% Fettsäuredispersion wird die Änderung der Vesikelgröße über der Zeit gemessen.

Ergebnisse und Diskussion

Wie die Abbildung 31 zeigt, haben die Vesikel vor der Zugabe freier Fettsäuren eine einheitliche Größe von 190 nm. Bereits zwei Minuten nach der Zugabe von je 20 mol% Fettsäure ändert sich die Größenverteilung in der Liposomensuspension deutlich. Es entstehen größere Vesikel oder Vesikelaggregate. Diese größeren Vesikel oder Vesikelaggregate sind jedoch nicht stabil sondern verschwinden in einem langsameren Prozeß wieder. Nach ca. einer Stunde hat sich eine stabile Endpopulation von Liposomen gebildet, die im Mittel etwas größer als die ursprüngliche Liposomenpopulation ist. Dieser Effekt unterscheidet sich bei den untersuchten Fettsäuren. Die Bildung gößerer Vesikel ist nach Zugabe von Linolsäure mit 2 Doppelbindungen ausgeprägter als bei Ölsäure mit einer Doppelbindung. Die gesättigte Stearinsäure zeigt den geringsten Effekt. Die kürzerkettige Myristinsäure zeigt in diesem Konzentrationsbereich die dramatischsten Änderungen der Vesikelgröße und führt zu keiner stabilen Endpopulation.

Das Ausmaß der Größenänderungen der Vesikel korelliert, wie bereits bei den 6-CF Leakagemessungen gezeigt wurde, mit der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad der Fettsäure. Je ungesättigter und je kürzerkettiger die zugesetzte Fettsäure ist, umso mehr größere Vesikel im Bereich zwischen 500 nm und 1000 nm entstehen. Die gemessenen Änderungen der Vesikelgröße verlaufen analog dem Zeitschema, dem auch das 6-CF Leakage bzw. die Vesikelfusion folgen.

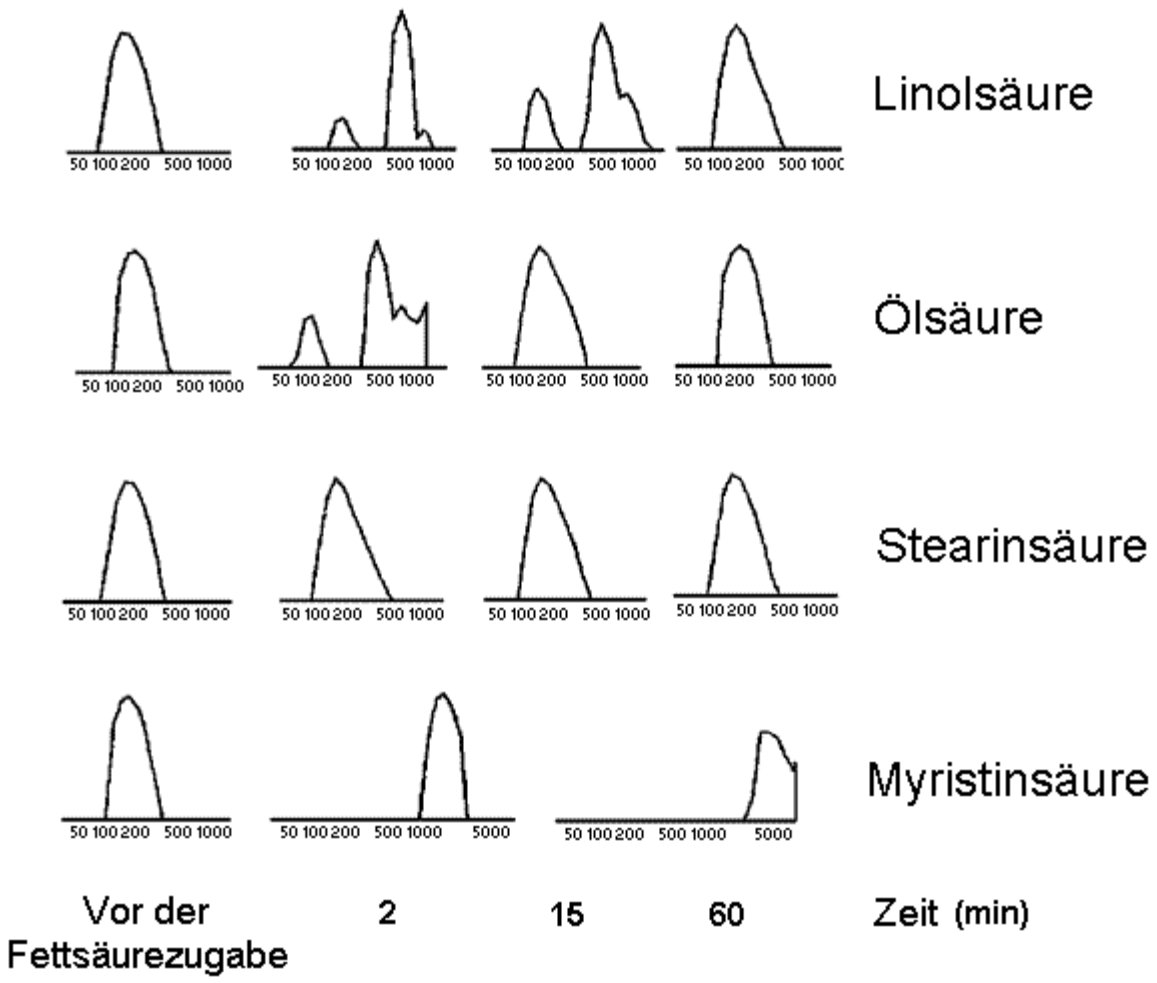


Abbildung 31: Fettsäure-induzierte Größenänderungen von HSPC/PG Vesikeln.
(zugegebene Menge Fettsäure: 20 mol%, pH = 7,2 in PBS, Skaleneinheiten in nm)

Werden 20 mol% Myristinsäure zugemischt, so bildet sich keine stabile Endpopulation mehr, vielmehr verschwinden die Objekte aus dem Meßbereich und sind vermutlich zu gemischten, nicht detektierbaren Mizellen solubilisiert. Bei kleineren Zumischungskonzentrationen (5 mol% siehe Abbildung 32), zeigt die Myristinsäure allerdings das gleiche Verhalten, wie es die anderen Fettsäuren aufweisen.

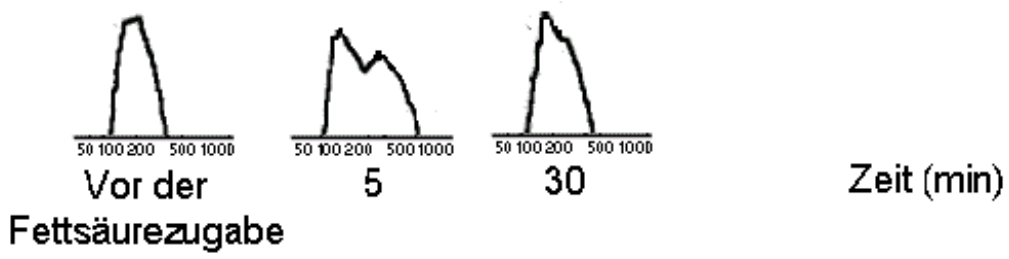


Abbildung 32: Myristinsäure-induzierte Größenänderungen von HSPC/PG Vesikeln.
(zugegebene Menge Fettsäure: 5 mol%, pH = 7,2 in PBS, Skaleneinheiten in nm)

5.1.4 Zusammenfassung: Fettsäure-induzierte Schädigung von Modellmembranen

Anhand der in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse, läßt sich ein Modell zum dynamischen Einfluß von Fettsäuren auf Membranen postulieren. Einzelne Schritte des Mechanismus wurden bereits von anderen Autoren beschrieben [LASCH et al., 1990; LASCH, 1995]. Dabei wurde die Wirkung der Fettsäuren im Sinne einer Detergenswirkung auf Modellmembranen mit synthetischen Amphiphilen diskutiert, das Modell aber noch nicht mit den natürlichen, biologisch relevanten Fettsäuren überprüft.

Der erste Schritt des Wirkens freier Fettsäuren auf Membranen ist der Fettsäureeinbau in die Modellmembran. Wie gezeigt wurde, findet der Einfluß der Fettsäuren auf die Permeabilität, die Fusogenität sowie die Größe der untersuchten Modellvesikel in einem Zeitrahmen von Minuten statt. Der Einbau der Fettsäuren in die Modellmembran erfolgt, wie in Abbildung 8 gezeigt wurde, dagegen innerhalb weniger Sekunden, so daß die beschriebenen strukturellen Membranschädigungen nicht unmittelbar Folgen des Fettsäureeinbaus sein können.

Auch der zweite Schritt der Fettsäurewirkung auf Modellmembranen, die Gleichverteilung der Fettsäure in beide Hälften des Bilayers, erfolgt zu schnell, als daß die nachgewiesenen Membranschäden darauf zurückgeführt werden könnten. Wie aus Abbildung 16 hervorgeht, dauert der Flip-Flop von Fettsäuren etwa 10-15 Sekunden. Für die Membranstörungen muß folglich ein zeitlich nachgelagerter, Fettsäure-induzierter Prozeß verantwortlich sein. Das gilt umso mehr, als bei der Trägheit und geringen Auflösung der Potentialmessung an der BLM der Vorgang des Flip-Flops wahrscheinlich noch schneller stattfindet.

Die eigentliche „Membranschädigung“, definiert durch die Permeabilisierung, die erhöhte Fusionsneigung und den Verlust der Größenstabilität der Modellvesikel, findet über einen Zeitraum von wenigen Minuten statt und scheint danach durch Selbststabilisierung in einem stationären System aus stabilen, gemischten Modellmembranen zu enden. Der

charakteristische, biphasige Kurvenverlauf läßt sich bei allen untersuchten Parametern nachweisen (Abbildungen 19-26, 30-32).
Die Permeabilitätssteigerung scheint nicht unmittelbar mit der Fusion der Vesikel zusammenzuhängen [CROWE et al.,1989], da der Kurvenverlauf einer fusionsbegleitenden Ausflußkinetik eine sigmoidale Form annehmen müßte, die der Fusion nachfolgt [WILSCHUT et al., 1983].
In unserem Fall findet die Fusion im gleichen Zeitraum mit äquivalenter Intensität statt, wie auch MCKERSIE et al., 1989 im stationären System zeigten. Dazu im Gegensatz stehen Wirkungen von Ceramiden und Diacylglyzerolen auf Bilayer, die nur zum Leakage und nicht zur Fusion führen [RUIZ-ARGÜELLO et al., 1996]. Eine Fettsäure-induzierte Fusion konnten wir auch anhand von Größenänderungen der Vesikel beweisen.
Es wird angenommen, daß die Liposomenfusion einem bestimmten Mechanismus folgt. Man geht davon aus, daß vor der Fusion eine Vesikelaggregation erfolgt. Fettsäuren sollten zumindest diesen Prozeß ermöglichen. Dafür müssen die Membranoberflächen lokal dehydratisiert werden. OHKI und ARNOLD, 1990 setzten Dehydratisierung mit einer „Hydrophobisierung“ des Membranbereichs gleich. Eine mögliche Clusterung undissoziierter Fettsäuren sollte aufgrund verminderter Ladungsdichte einen Dehydratisierungsprozeß initiieren. Um einen größeren Bereich als mögliche Kontaktstelle zwischen beiden Vesikelmembranen zu bilden, müssen die Fettsäuren konzentriert in Clustern auf der Oberfläche organisiert sein, worauf auch eine beobachtete laterale Phasenseparation in Monoschichten hinweist [KLAUSNER et al.,1980].
Bei unseren Experimenten bilden die Liposomen nach der Fusion große instabile Vesikel, die in einem weiteren Schritt, der auch von SACKMANN, 1994 beschrieben wurde, wieder kleiner werden. Dieser Prozeß wird „Budding“ genannt und setzt Stellen mit erhöhter Kurvatur in der Membran voraus. Die Fettsäuren sind als einkettige Amphiphile zu einer Erhöhung der Kurvatur vor allem in Bereichen hoher Konzentration (z.B. nach lateraler Phasenseparation) prädestiniert. Da multilamellare Vesikel nicht zum „Budding“ fähig sind, muß die von uns beobachtete, intermediär gebildete, instabile Vesikelpopulation unilamellar sein. Bei multilamellaren Liposomen würde nur eine Formveränderung der Vesikel erfolgen.
Eine andere Möglichkeit zur Erklärung der Verkleinerung der intermediär gebildeten Liposomen besteht in der Annahme einer temporären Hemifusion. Dieser reversible Vorgang erklärt das Größer-und Kleinerwerden der Liposomen, ebenso wie die Fluorophorverdünnung im RET. Im Falle einer Hemifusion würde das Lipidmixing nur im äußeren Monolayer der

Liposomen erfolgen.Es käme aber nicht zu dem beobachteten, parallel stattfindenden Leakageprozeß.
Trotz der qualitativen Übereinstimmungen im Mechanismus der Fettsäure-induzierten Membranschädigung, zeigen sich doch Unterschiede in der Intensität der Wirkung aller von uns untersuchten Fettsäuren. Vermutlich führen unterschiedliche Molekülstrukturen, hervorgerufen durch Variation in der Kettenlänge und des Sättigungsgrades, zu unterschiedlich ausgeprägten Störungen in den Vesikelmembranen. Wie mit den Experimenten gezeigt wurde, beeinflußt die Linolsäure die von uns gemessenen Parameter am stärksten. Die Existenz von Doppelbindungen im Mittelteil des Fettsäuremoleküls scheinen für Ausprägung des „Schädigungseffekts“ bedeutsam zu sein. Diese verursachen graduell abgestuft, quantitative Unterschiede, der von uns untersuchten Summenparameter.

5.2 Fettsäure-induzierte Schädigung von Zellmembranen

Um die am Modellsystem erhaltenen Aussagen über den Schädigungsmechanismus freier Fettsäuren an natürlichen Membranen zu überprüfen, wurde die Fettsäure-induzierte Schädigung von Zellmembranen untersucht.
Da sich die Fusion von Zellmembranen und eine fusionsbasierte Änderung der Zellgröße nur schwer messen lassen, wurde lediglich die Fettsäure-induzierte Änderung der Permeabilität der Zellmembran nachgewiesen. Zur Messung der Zellmembranpermeabilität liegt eine Reihe von Nachweismethoden vor. Die meisten veröffentlichten Arbeiten konzentrieren sich auf die Permeabilität der Zellmembran gegenüber verschiedenen Ionen wie H^+ [FUKS und HOMBLE, 1996], Na^+ [ASHAVAID et al., 1985] oder Ca^{2+} [FLEMING und MELLOW, 1995].
Um die Ergebnisse der Permeabilitätsmessungen von künstlichen Modellmembranen und natürlichen Zellmembranen direkt miteinander vergleichen zu können, wurde die Permeabilität der Zellmembranen gegenüber 6-CF gemessen. Es liegen keine Daten über mögliche Transport- oder Kanalproteine für diesen Fluoreszenzfarbstoff an Zellmembranen vor. Eine nachgewiesene Permeabilitätsänderung an den untersuchten Zellmembranen sollte demzufolge ausschließlich auf das Wirken der zugegebenen freien Fettsäuren zurückzuführen sein.
Der in Kapitel 5.1.1 beschriebene 6-CF Leakage Assay mußte für die Anwendung an Zellmembranen jedoch modifiziert werden, da eine Anreicherung des 6-CF in selbstquenchender Konzentration im Zellinneren nicht möglich ist. Deshalb wurde ein Test entwickelt, der den Einstrom kleiner Mengen 6-CF aus dem Außenmedium ins Zellinnere

empfindlich nachweist. Dieser Test beruht auf einem Resonanzenergietransfer (RET) zwischen 6-CF und Rhodamin. Dazu wird das Zellinnere mit dem membrangängigen SH-reaktiven Fluorophor, „Cell Tracker Orange“ permanent angefärbt. „Cell Tracker Orange“ ist ein hydrophober Farbstoff auf Rhodaminbasis. Das Außenmedium enthält 6-CF in nicht quenchender Konzentration. Das 6-CF wird bei 488 nm angeregt, während die Messung der Fluoreszenzintensität des Rhodamins bei $\lambda_{Em} > 540$ nm erfolgt. Weil ein Energietransfer nur bei nahe benachbarten Fluorophoren stattfinden kann, läßt sich so der Influx von 6-CF in die Zelle, nach Zugabe einer membranpermeabilisierenden Substanz, verfolgen. Als Kontrollexperiment und 100%-Wert wurde die Membran durch Zugabe von 0,05% Digitonin vollständig permeabilisiert.

Material und Methoden

HBS pH = 7,2

cis-Linolsäure, SIGMA Chemical, St.Louis

6-Carboxyfluoreszein (6-CF), SIGMA Chemical, St.Louis.

Myristinsäure, SIGMA Chemical, St.Louis.

Stearinsäure, SIGMA Chemical, St.Louis

Digitonin, SIGMA Chemical, St.Louis.

POC-Kammern, Bachhofer, Reutlingen

Laser Scanning Microscop LSM 410 von Zeiss, Oberkochen

Objektiv Plan/Neofluar 40x/1.30 von Zeiss, Oberkochen

Zellpräparation

Rinderaugenlinsenzellen wurden nach IWIG et al., 1995 subkultiviert, auf Glasträger ausgesät und über 24h in complete MEM Medium kultiviert.

Versuchsdurchführung

Die Augenlinsenzellen wurden 15 min mit 1 mM „Cell Tracker Orange“ in HBS inkubiert. Anschließend wurde der überflüssige Farbstoff durch 3 maliges Waschen mit HBS entfernt. Die gefärbten Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch vermessen. In 2-Minuten-Abständen wurden Zellaufnahmen gespeichert.

Zur Bestimmung des 100%-Wertes der Permeabilisierung wurde 0,05% Digitonin in Ethanol gelöst, so daß die Endkonzentration von Ethanol in der POC Kammer 1% betrug. *Cis*-

Linolsäure wurde ebenfalls in Ethanol gelöst. Die Endkonzentration in der POC Kammer betrug 60 mM Linolsäure und 1% Ethanol. Die Zugabe von Digitonin bzw *cis*-Linolsäure in die Kammer erfolgte nach der zweiten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme der Zellen. Während der Messung wurden die Zellen bei 37°C inkubiert.

Ergebnisse und Diskussion

Ermittlung des100% Wert mit Digitonin

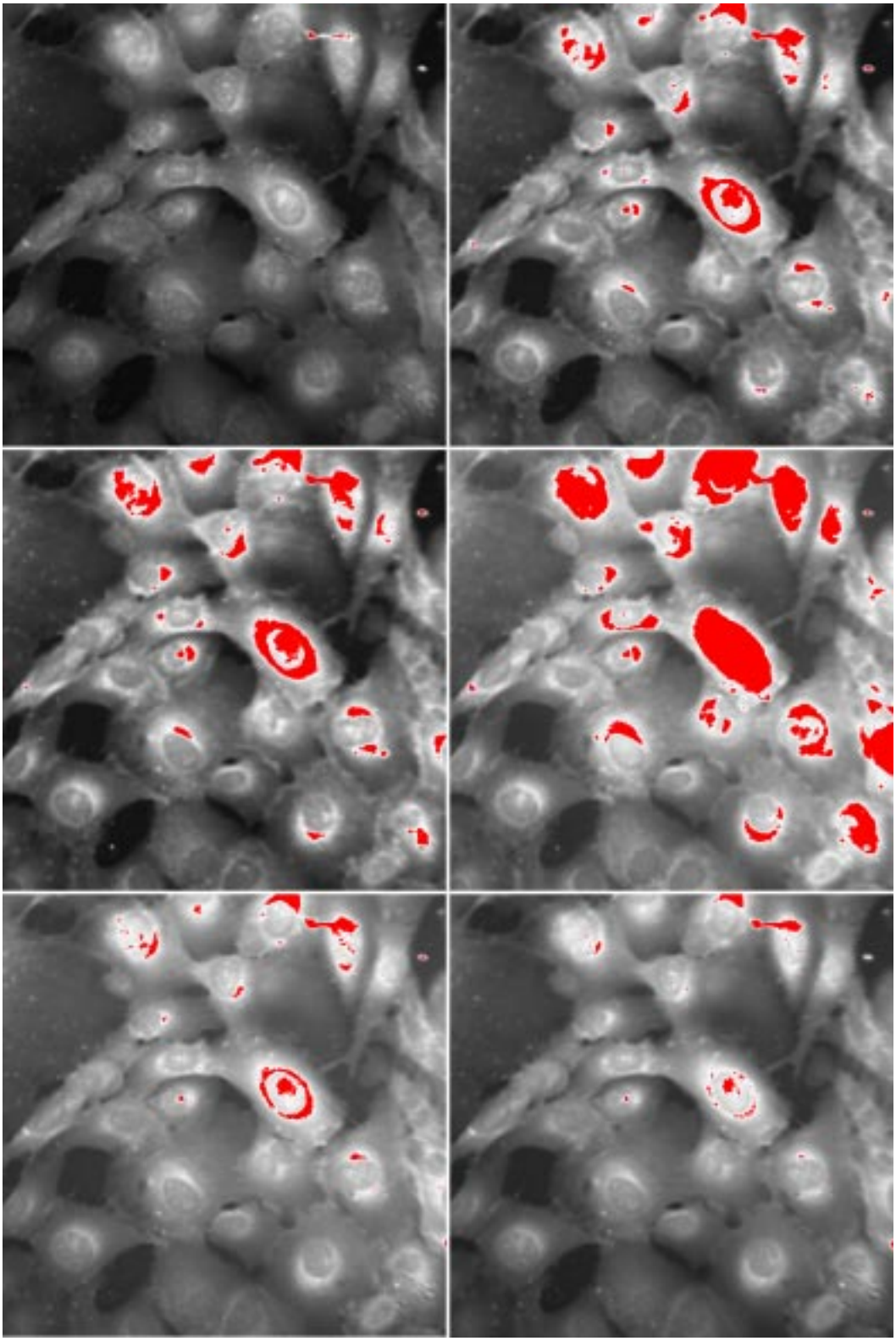


Abbildung 33: Serie fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von fluoreszenzmarkierten Rinderaugenlinsenzellen nach Zugabe von Digitonin. Als kovalent gebundener intrazellulärer Fluorophor wurde „Cell Tracker Orange“ verwendet. Die Linolsäure-induzierte Membranpermeabilisierung führt zu einem Einstrom von extrazellulärem 6-CF, was eine Änderung des Resonanzenergietransfers verursacht. (λ_{Ex} = 495 nm, λ_{Em} > 540 nm, pH = 7,4 in HBS)

Die in Abbildung 33 dargestellte Serie fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen zeigt die Änderung der Fluoreszenzintensität im Inneren der Rinderaugenlinsenzellen infolge der Digitonin-induzierten Membranpermeabilisierung. Die erste Aufnahme (oberste Reihe links) zeigt die Zellen vor der Zugabe von Digitonin. Im Zellinneren läßt sich keine Fluoreszenz nachweisen. Nach der Digitoninzugabe steigt das Fluoreszenzsignal in den Zellen deutlich an (obere Reihe rechts, mittlere Reihe). Mit fortschreitender Dauer des Experiments kommt es zu einer Abnahme der intrazellulären Fluoreszenzintensität (untere Reihe). Dieser Effekt kann zum einen auf ein Photobleaching hinweisen oder durch den Austritt von Cytoplasma mit dem Rhodamin-Farbstoff „Cell Tracker Orange“ ins Zellmedium hervorgerufen werden.
Die quantitative Auswertung der fluoreszenzmikroskopisch erhaltenen Daten ermöglichte die Klärung dieses Phänomens.

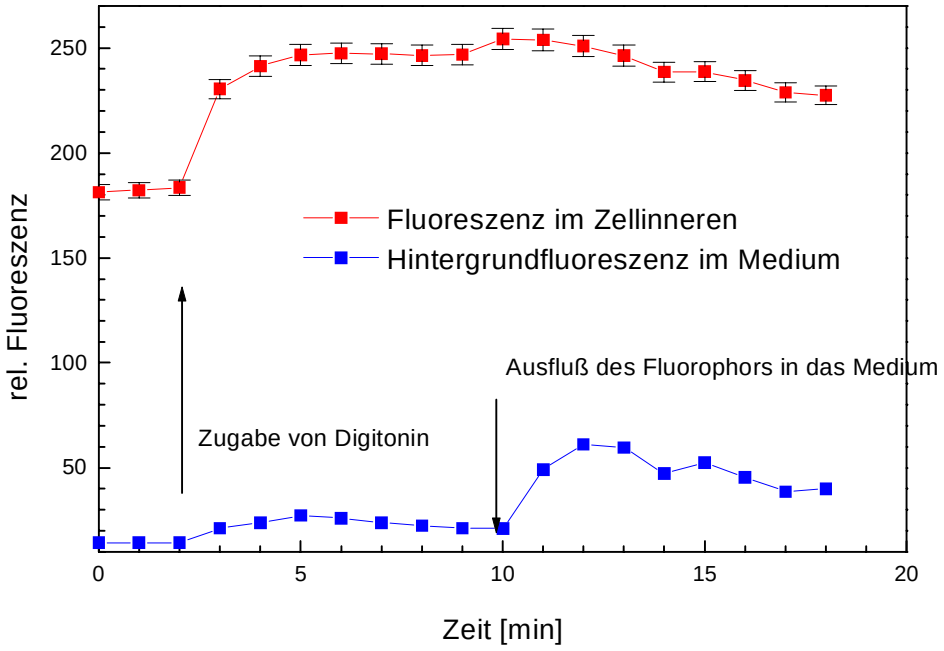


Abbildung 34: Die rel. Fluoreszenzangaben stellen die Intensitätsverteilung bestimmter Bildareale aus Abbildung 33 dar.

Wie in der Abbildung 34 deutlich wird, folgt dem intrazellulären Anstieg der Fluoreszenzintensität zeitlich versetzt ein Anstieg des Fluoreszenzsignals im umgebenden Medium. Dieser Effekt spricht für eine so starke Permeabilisierung der Zellmembran, daß fluoreszenzmarkierte Proteine aus dem Cytosol ins Medium austreten.

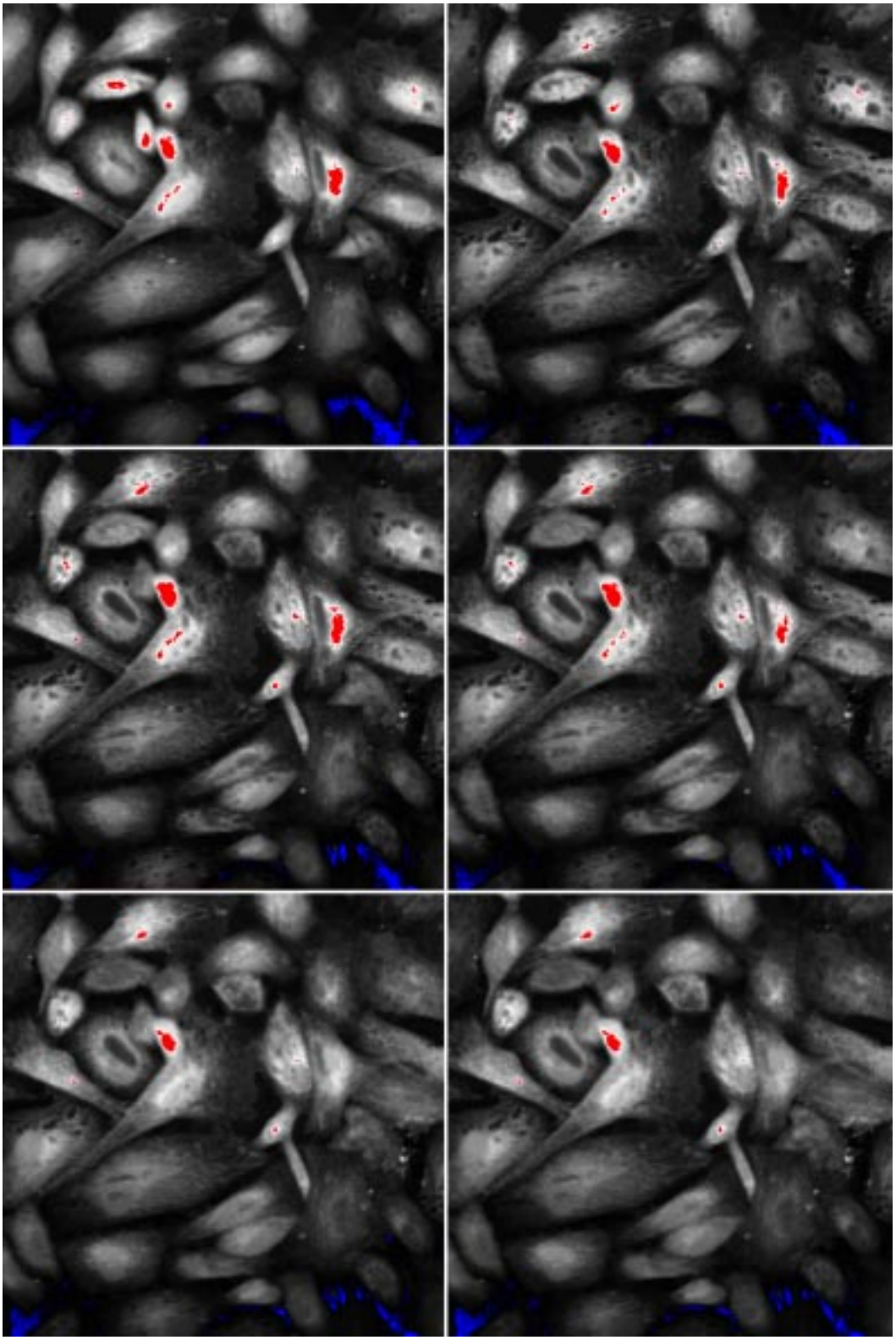


Abbildung 35: Serie fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von fluoreszenzmarkierten Rinderaugenlinsenzellen nach Zugabe von *cis*-Linolsäure. Als kovalent gebundener intrazellulärer Fluorophor wurde „Cell Tracker Orange“ verwendet. Die Linolsäure-induzierte Membranpermeabilisierung führt zu einem Einstrom von extrazellulärem 6-CF, was eine Änderung des Resonanzenergietransfers verursacht. (λ_{Ex} = 495 nm, λ_{Em} > 540 nm, pH = 7,4 in HBS)

Die Abbildung 35 zeigt die durch *cis*-Linolsäure induzierte Permeabilisierung von Zellmembranen. Die Serie fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen zeigt von links oben nach rechts unten die zeitliche Änderung der intrazellulären Fluoreszenzintensität. Der Zunahme des Fluoreszenzsignals im Inneren der Rinderaugenlinsenzellen nach der Zugabe von *cis*-Linolsäure ins Kulturmedium folgt erneut eine Abnahme der Fluoreszenzintensität, was mit einem Cytoplasmaausfluß als Folge der Membranschädigung zu erklären ist.

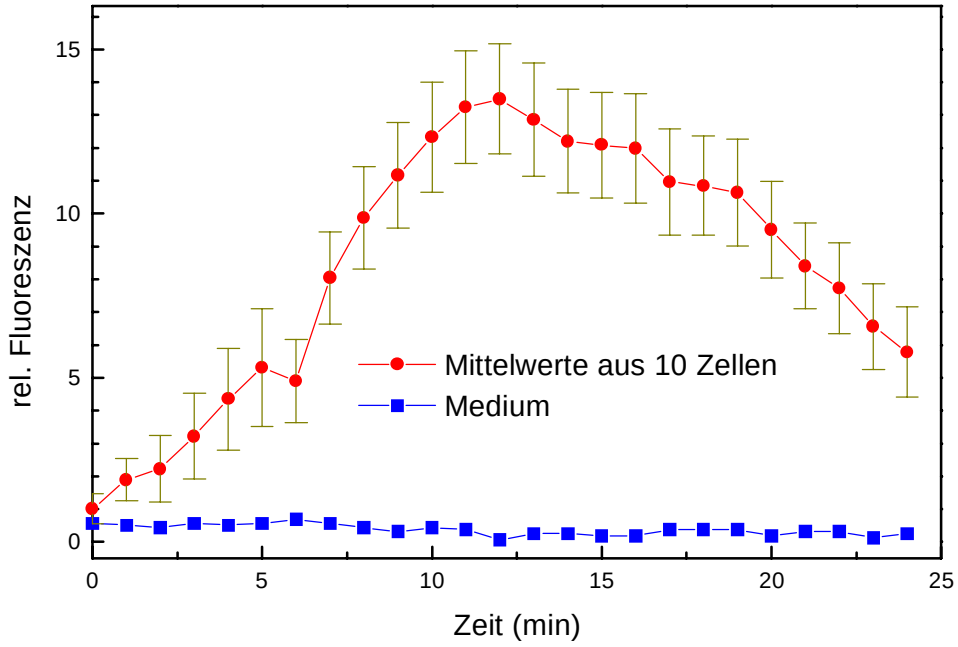


Abbildung 36: Die rel. Fluoreszenzangaben stellen die Intensitätsverteilung bestimmter Bildareale aus Abbildung 35 dar.

Wie die quantitative Auswertung dieses Versuches, in Abbildung 36 dargestellt, ergab, läßt sich der abnehmenden Fluoreszenz im Zellinneren keine ansteigende Fluoreszenzintensität im Medium zuordnen. Dies beruht auf der erheblich geringeren permeabilisierenden Wirkung der *cis*-Linolsäure im Vergleich zum Digitonin.

Wie der dargestellten Versuch deutlich machen, vermögen freie Fettsäuren nicht nur Modellmembranen sondern auch natürliche Zellmembranen zu permeabilisieren. Die Schädigung von Zellmembranen durch freie Fettsäuren ist mit einer Membranschädigung an liposomalen Modellsystemen vergleichbar. Auch der zeitliche Verlauf der Membranpermeabilisierung ist in beiden Fällen ähnlich. Unmittelbar nach Zugabe der Fettsäure

kommt es zu einem starker Anstieg der Membranpermeabilität, der sich nach wenigen Minuten verlangsamt, jedoch im gesamten Versuchsintervall nicht völlig zum Stillstand kommt.
Beide Prozesse unterscheiden sich jedoch in den Fettsäurekonzentrationen, die für die gleichen Membraneffekte benötigt werden. Für die Versuche an Zellmembranen waren die eingesetzten Fettsäuremengen um Größenordnungen höher als bei Modellmembranen. Dies war zu erwarten, da die Zellen ein sehr großes hydrophobes Volumen und einen aktiven Fettsäure-Metabolismus besitzen.
Durch unser neuartiges Verfahren ist es möglich, die Permeabilität einer Zellmembran für größere, hydrophile Moleküle zu erfassen, ohne befürchten zu müssen, daß eine Überlagerung der Meßdaten durch veränderte Transportparameter von Carrierproteinen oder Kanälen auftritt.
Unsere Befunde werden von den Ergebnissen von WANG et al., 1994 bestätigt. In deren Untersuchung wurde H^3-Mannitol als hydrophiler Marker verwendet und hydrophobes C^{14}-Progesteron eingesetzt, um den Fettsäure-induzierten Permeabilitätsanstieg in der Alveolarmembran zu verfolgen. In einer weiteren Studie konnte von RAMASAMY et al., 1991 eine Permeabilisierung von vascularem Endothelgewebe durch Linolsäure nachgewiesen werden. RAMASAMY und Mitarbeiter nutzten den Albuminausstrom als Meßgröße. Außerdem werden ungesättigte Fettsäuren als Penetrationspromotoren für Arzneistoffe durch die menschliche Haut verwendet. Dies läßt sich im Sinne einer Schädigung von Zellmembranen und/oder der Lipidschichten zwischen den Corneozyten interpretieren [SCHNEIDER und WOHLRAB, 1997].

6 Bestimmung der Lateralphasenseparation und der Phasenzustände von Phospholipid/Fettsäuremischungen.

Das Phasenverhalten der von uns untersuchten Phospholipid/Fettsäure-Mischungen wurde an Monolayern an der Wasser/Luft-Grenzfläche mittels Filmwaagentechnik charakterisiert. Dabei muß berücksichtigt werden, daß Lipid-Monolayer nur bedingt mit Bilayersystemen [MARSH, 1996; JÄHNIG, 1996] oder sogar mit biologischen Membranen [GRUEN und WOLFE, 1982] vergleichbar sind. Vor allem der Einfluß des Lateraldruckes auf die supramolekulare Organisation im Monolayer und die Vergleichbarkeit mit den Verhältnissen im Bilayer ist dabei umstritten.

Die Kopplung der Filmwaagetechnik mit einem Fluoreszenzmikroskop [MÖHWALD, 1990] ermöglicht die laterale Verteilung der Einzelkomponenten von Stoffgemischen in monomolekularen Filmen zu beobachten und gleichzeitig Aussagen über die Stabilität sowie etwaige Fehlordnungen in der Molekülpackung treffen zu können. Solche Fehlstellen können strukturelle Instabilitäten innerhalb einer Membran verursachen, die an diesen Stellen die Permeablität der Membran für hydrophile Stoffe erhöht. Domänen (kristalline Bereiche) einzelner Membranbestandteile können außerdem physikalische Eigenschaften der gesamten Membran verändern [KARNOVSKY et al., 1982]. So führen lokale Ladungsänderungen oder Änderungen der Hydrathülle zu einem veränderten Membranverhalten an bestimmten Stellen.

Material und Methoden

Filmwaage (R&K, Germany) mit Wilhelmy System zur Druckaufnahme

Fluoreszenzmikroskop (Olympus) mit Restlichtverstärker und Videoaufnahme und -bearbeitung

Di**m**yristoyl**p**hospho**e**thanolamin (DMPE), SIGMA Chemical, St.Louis

Myristinsäure, SIGMA Chemical, St.Louis

Stearinsäure, SIGMA Chemical, St.Louis

Linolsäure, SIGMA Chemical, St.Louis

NBD-PE, AVANTI Polar Lipids, Alabama, USA

Subphase: Wasser Ultrarein durch eine Anlage von Millipore, USA

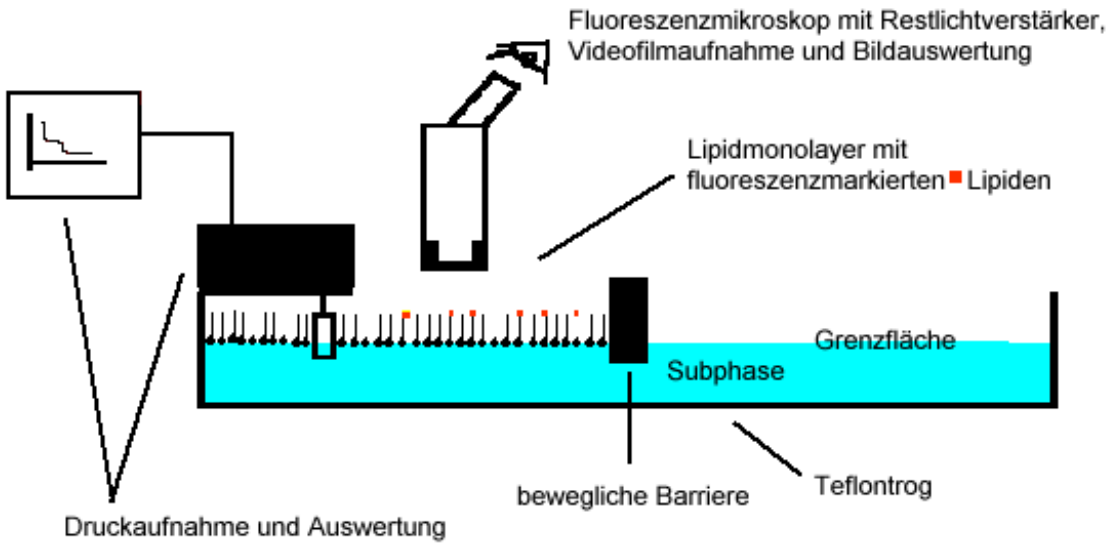


Abbildung 37: Schematische Darstellung einer Fluoreszenzfilmwaage nach dem Wilhelmyprinzip

Versuchsdurchführung

DMPE und Mischungen aus DMPE mit Myristin-, Linol- und Stearinsäure wurden in Chloroform gelöst. Der Fettsäureanteil der 1 mM Lipidlösungen betrug jeweils 10 oder 20 mol%. Je 20 µl dieser Spreitlösungen wurden in kleinen Tropfen auf eine ultrareine Wasseroberfläche aufgebracht. Innerhalb von ca. 5 Minuten verdampft das Lösungsmittel und die Lipide bilden einen Monolayer auf der Wasseroberfläche. Mit einer Geschwindigkeit von 2 mm/sec komprimiert die bewegliche Barriere den Monolayer (Abbildung 37). Dabei wird die Oberflächenspannung der Subphase kontinuierlich erfaßt und in den Lateraldruck des Monolayers umgerechnet. Aus den Meßwerten wird ein Druck/Flächendiagramm (Abbildung 38) erstellt. Bei konstanter Temperatur lassen sich aus dem Kurvenverlauf Phasenzustandsänderungen des Monolayers ablesen.

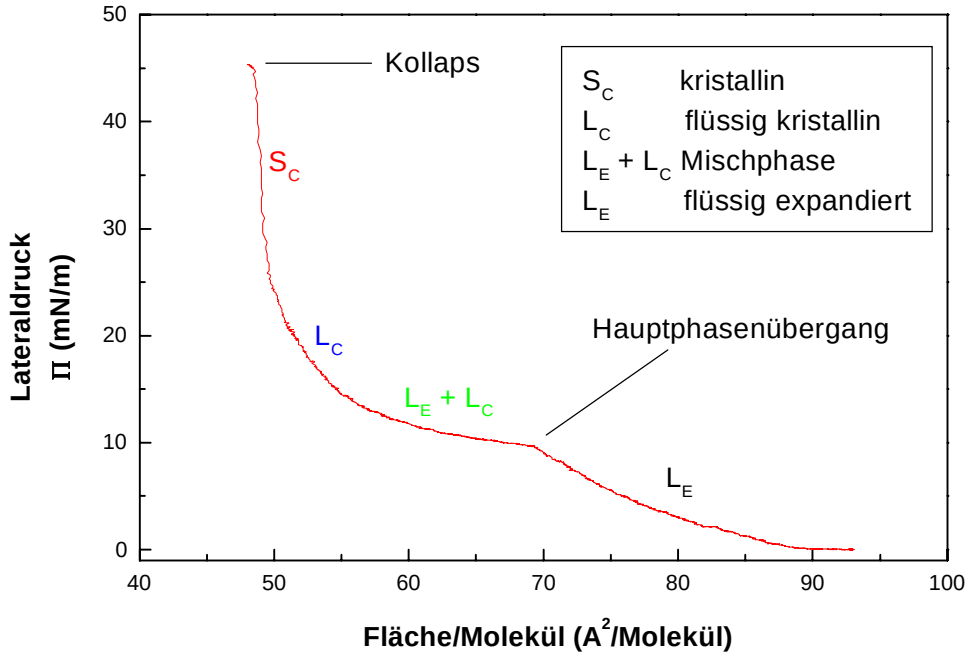


Abbildung 38: Druck/Flächendiagramm eines Lipidmonolayers bei konstanter Temperatur. (DMPE, T = 25°C, Subphase: Wasser, Barrieregeschwindigkeit: 2 mm/sec)

In einem weiteren Experiment wurde den Lipidlösungen 0,5 mol% NBD-PE zugesetzt. NBD-PE mischt sich ausschließlich in den fluiden Bereichen des Monolayers, die dadurch im Mikroskopbild als fluoreszierende, helle Bereiche sichtbar werden. Kristalline Bereiche (Domänen) bleiben dagegen ungefärbt, sie erscheinen schwarz (Abbildung 39). Auf diese Weise können die Dynamik, die Gestalt und die Größe kristalliner Bereiche im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Diese Fluoreszenzaufnahmen können einzelnen Abschnitten im Druck/Flächendiagramm zugeordnet werden.

Ergebnisse und Diskussion

DMPE wurde für die Filmwaageuntersuchungen als Matrixlipid eingesetzt, obwohl bei den Versuchen mit Liposomenmodellsystemen ein anderes Lipidgemisch (HSPC/PG) mit einem höheren Hauptphasenübergang benutzt wurde.

Dafür gab es folgende Gründe:

- DMPE besitzt einen langen Mischphasenbereich und definierte Phasenübergänge. So sind Veränderungen im Phasendiagramm leicht erkenn- und interpretierbar.

- die Domänenstruktur von reinem DMPE ist gut untersucht und Abweichungen von dieser Struktur können leicht erkannt werden.

Abbildung 39 zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines reinen DMPE Monolayers. Domänen sind als schwarze Bereiche sichtbar.

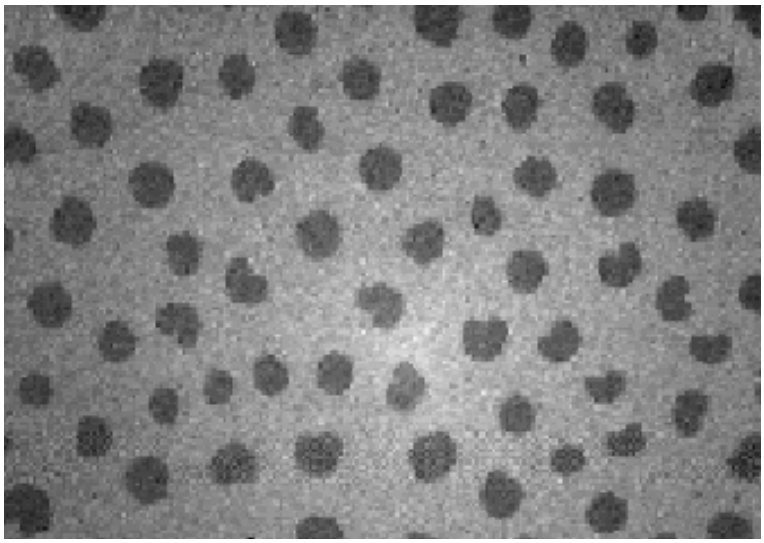


Abbildung 39: Domänenstruktur in einem DMPE Monolayer im L_C/L_E -Mischbereich.
(Subphase: Wasser pH = 7,0, T = 25°C, Bilddiagonale: 110 µm)

Die Zumischung von Myristinsäure verursacht einen kondensierenden Effekt auf den DMPE Monolayer. Der Hauptphasenübergang im Druck/Flächen-Diagramm erfolgt bei größeren Flächen pro Molekül (Abbildung 40).

Dieser Effekt wurde im Lateraldruck/Molenbruch-Diagramm bestätigt (Abbildung 41).

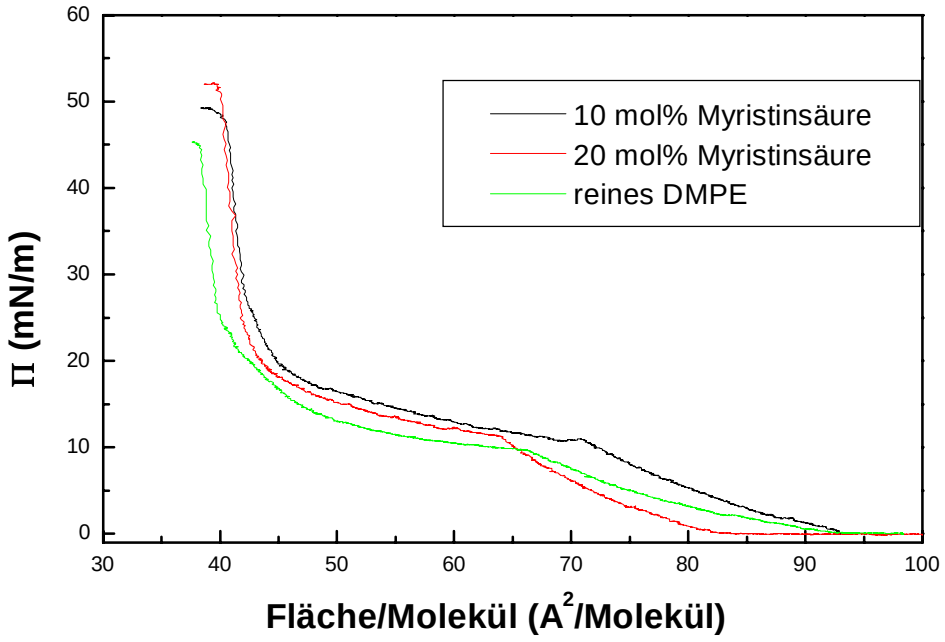


Abbildung 40: Druck/Flächendiagramm eines DMPE Monolayers mit verschiedenen Myristinsäurezumischungen bei konstanter Temperatur. (DMPE, T = 25°C, Subphase: Wasser, Barrieregeschwindigkeit: 2 mm/sec)

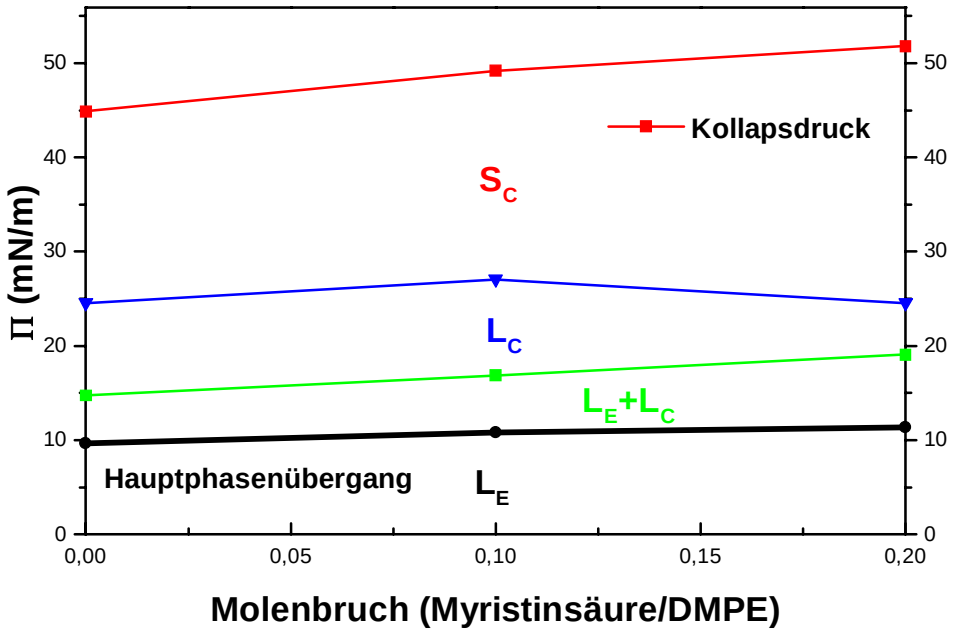


Abbildung 41: Ausschnitt aus einem Phasendiagramm von Myristinsäure/DMPE Monolayern bei 25°C.

Das Fluoreszenzbild des Myristinsäure/DMPE Monolayers (Abbildungen 42 und 43) unterscheidet sich von dem des reinen Matrixlipids (Abbildung 39). Durch die

Myristinsäurezumischung erfolgt eine Verkleinerung der kristallinen Domänen. Außerdem nimmt ihre Anzahl deutlich zu. Mit steigendem Myristinsäureanteil erfolgt eine Trennung der kristallinen Domänen in zwei Populationen unterschiedlicher Größe. Die Vergrößerung der Grenzflächen zwischen kristallinen und fluiden Monolayerbereichen führt zu einer Zunahme von Fehlstellen in der Molekülpackung, was zu verminderter Stabilität des Monolayers führt. In einem Liposomensystem kann die erhöhte Zahl von Fehlstellen für die beschriebene Permeabilitätserhöhung und verstärkte Fusionsneigung der Membranen verantwortlich sein.

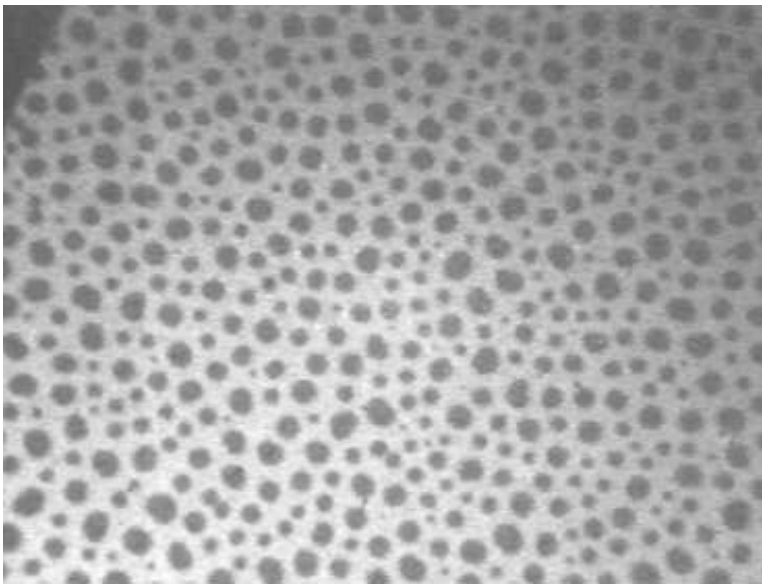


Abbildung 42: Domänenstruktur in einem DMPE Monolayer mit 10 mol% Myristinsäurezumischung im L_C/L_E -Mischbereich. (Subphase: Wasser pH = 7,0, T = 25°C, Bilddiagonale: 110 µm)

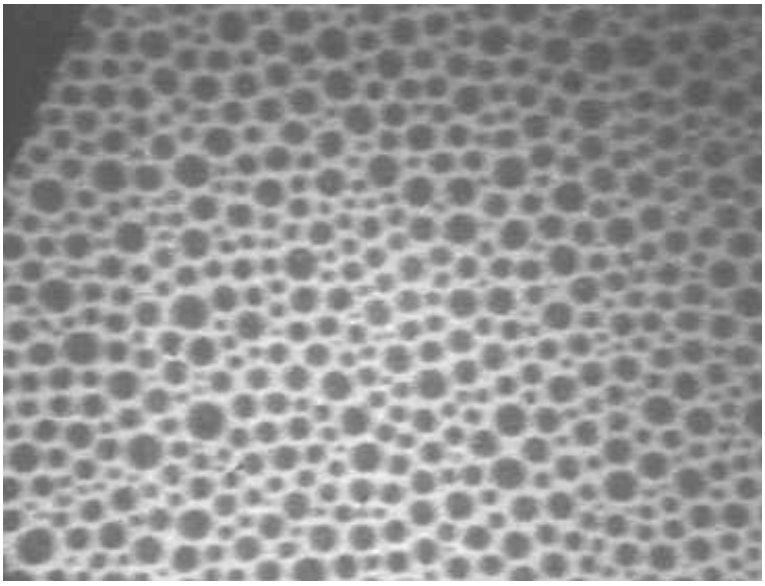


Abbildung 43: Domänenstruktur in einem DMPE Monolayer mit 20 mol% Myristinsäurezumischung im L_C/L_E -Mischbereich. (Subphase: Wasser pH = 7,0, T = 25°C, Bilddiagonale: 110 µm)

Die Zumischung der längerkettigen Stearinsäure zum Matrixlipid DMPE hat ebenfalls einen kondensierenden Effekt zur Folge (Abbildung 44). Im Lateraldruck/Molenbruch-Diagramm erkennt man die Vergrößerung des kondensierten Bereiches (Abbildung 45).

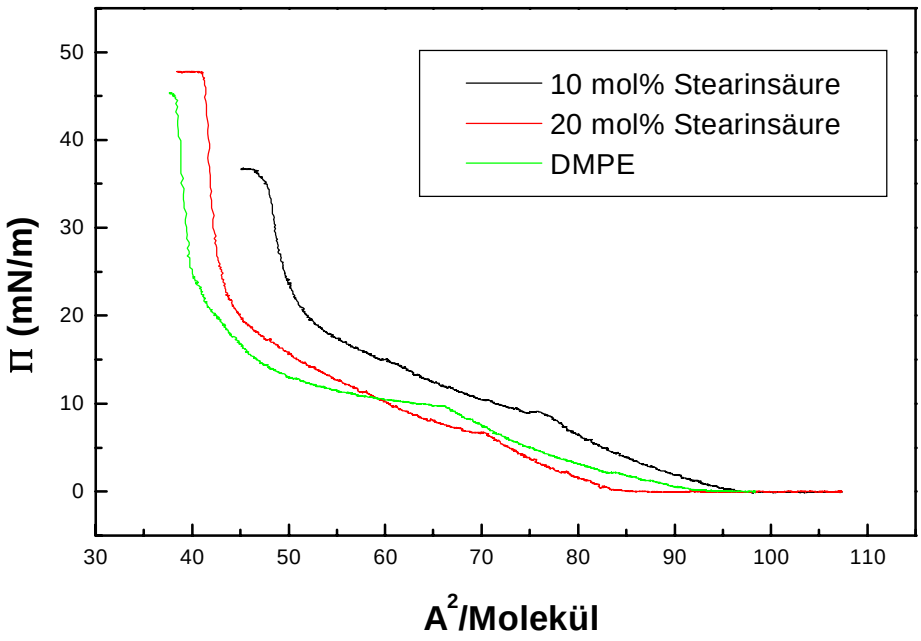


Abbildung 44: Druck/Flächendiagramm eines DMPE Monolayers mit verschiedenen Stearinsäurezumischungen bei konstanter Temperatur. (DMPE, T = 25°C, Subphase: Wasser, Barrieregeschwindigkeit: 2 mm/sec)

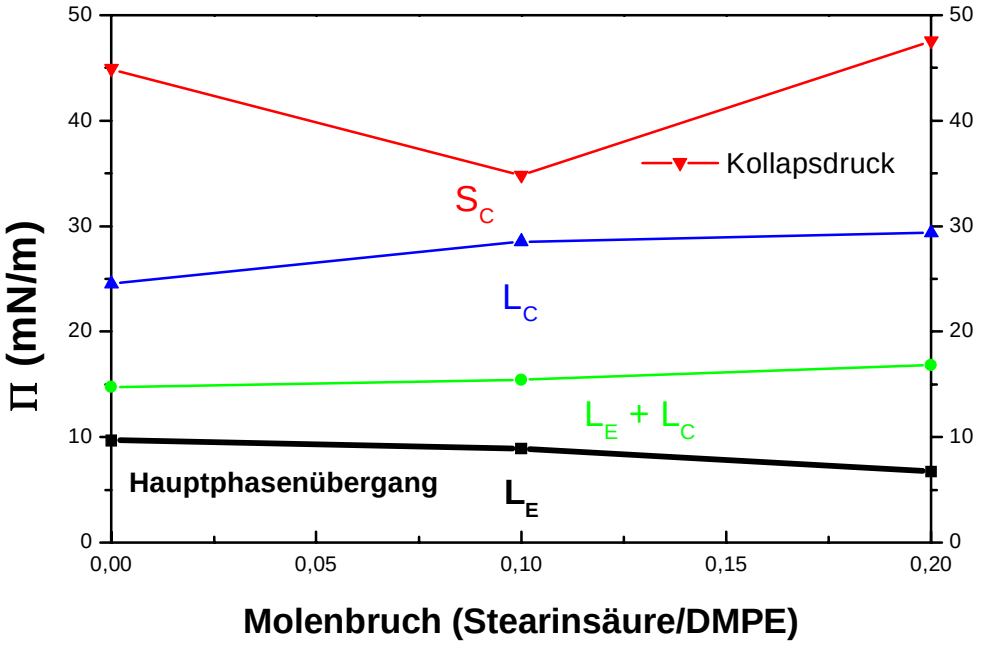


Abbildung 45: Ausschnitt aus einem Phasendiagramm von Stearinsäure/DMPE Monolayern bei 25°C.

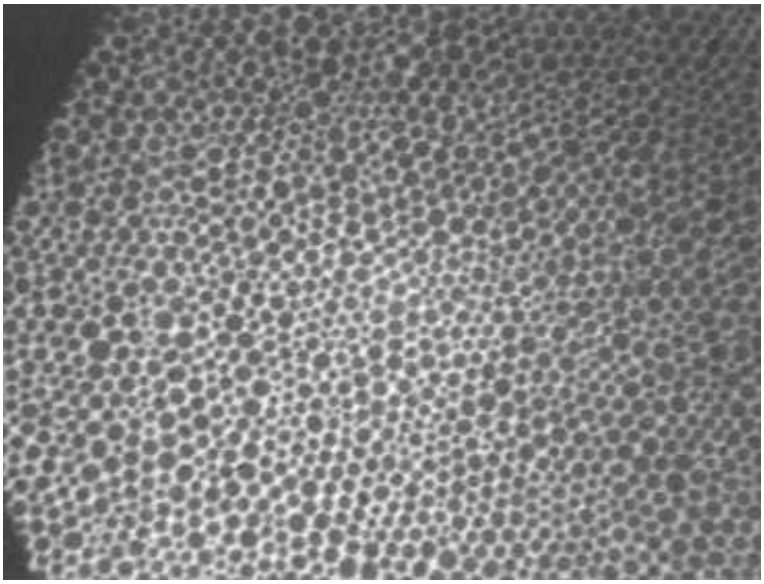


Abbildung 46: Domänenstruktur in einem DMPE Monolayer mit 10 mol% Stearinsäurezumischung im L_C/L_E -Mischbereich. (Subphase: Wasser pH = 7,0, T = 25°C, Bilddiagonale: 110 µm)

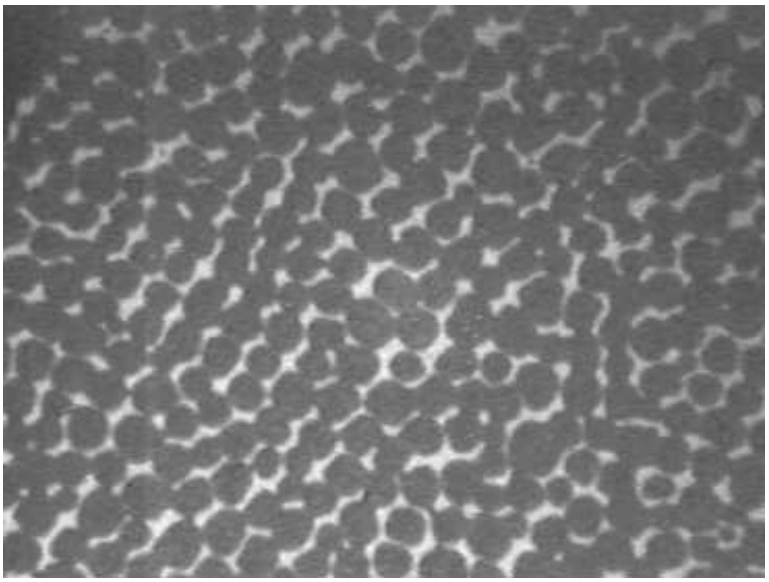


Abbildung 47: Domänenstruktur in einem DMPE Monolayer mit 20 mol% Stearinsäurezumischung im L_C/L_E -Mischbereich. (Subphase: Wasser pH = 7,0, T = 25°C, Bilddiagonale: 110 µm)

Die Fluoreszenzaufnahmen (Abbildungen 46 und 47) zeigen auch bei der Zumischung von Stearinsäure eine vermehrte Zahl kleinerer Domänen. Die darausfolgende Vergrößerung der Grenzflächen zwischen kristallinen und fluiden Bereichen geht einher mit einer strukturellen Destabilisierung. Der destabilisierende Effekt der Stearinsäure ist deutlich geringer als der der Myristinsäure.

Die ungesättigte *cis*-Linolsäure zeigt, im Gegensatz zu Myristin- und Stearinsäure, einen fluidisierenden Einfluß auf das Matrixlipid. Im Druck/Flächen-Diagramm ist eine deutliche Verlängerung des fluiden Bereiches zu beobachten (Abbildung 48). Auch im Diagramm Druck/Molenbruch-Diagramm ist eine Vergrößerung des fluiden Bereiches sichtbar (Abbildung 49).

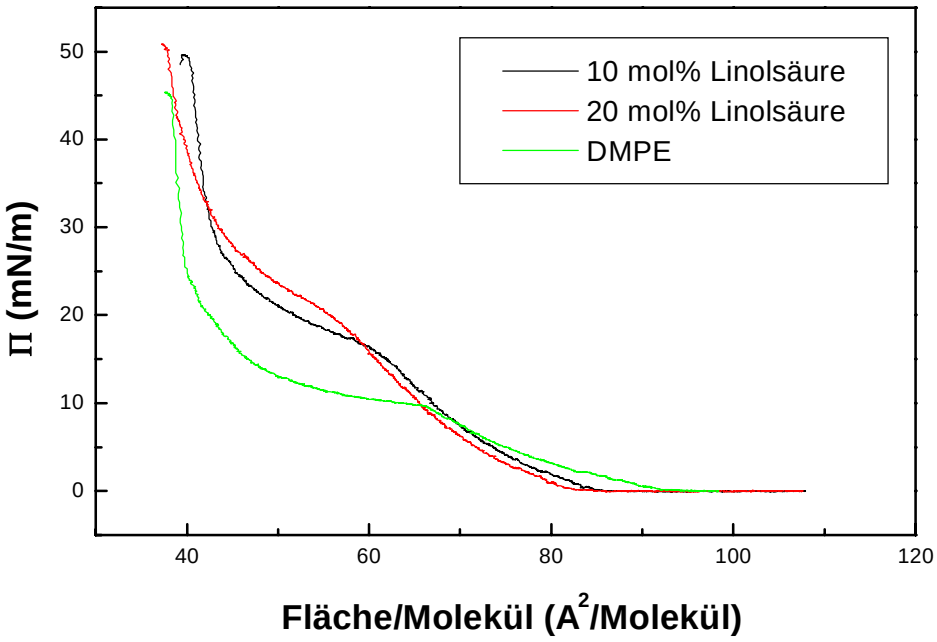


Abbildung 48: Druck/Flächendiagramm eines DMPE Monolayers mit verschiedenen Linolsäurezumischungen bei konstanter Temperatur. (DMPE, T = 25°C, Subphase: Wasser, Barrieregeschwindigkeit: 2 mm/sec)

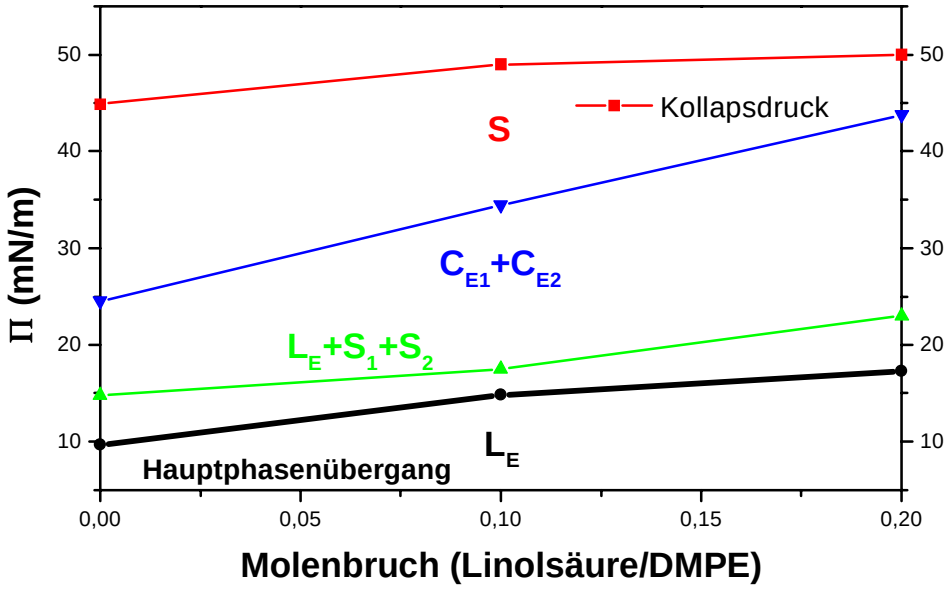


Abbildung 49: Ausschnitt aus einem Phasendiagramm von Linolsäure/DMPE Monolayern bei 25°C.

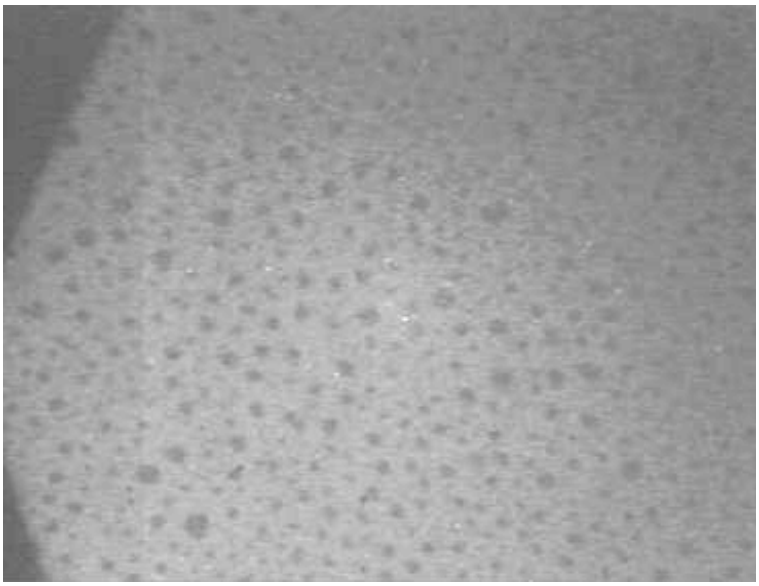


Abbildung 50: Domänenstruktur in einem DMPE Monolayer mit 10 mol% Linolsäurezumischung im L_C/L_E -Mischbereich. (Subphase: Wasser pH = 7,0, T = 25°C, Bilddiagonale: 110 µm)

Abbildung 50 zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines DMPE Monolayers mit 10 mol% *cis*-Linolsäure. Eine große Zahl sehr kleiner Domänen ist zu erkennen. Durch die große Zahl und die geringe Größe der Domänen ist die entstehende strukturelle Störung der Membran auf Grund der starken Vergößerung der Phasengrenzen höher als z.B. durch den Einfluß der Stearinsäure bzw. Myristinsäure. Eine Zumischung von 20 mol% *cis*-Linolsäure zum Matrixlipid resultiert in einer ähnlichen Domänenzahl und -größe wie bei 10 mol% Zumischung.

Ähnliche Phasenseparationseffekte wie die in unseren Systemen wurden bisher hauptsächlich in Massephasen mit Hilfe der DSC [ORTIZ und GOMEZ-FERNANDEZ, 1987; KOYNOVA et al., 1988], FTIR [SALGADO et al., 1995; BOUCHARD et al., 1996] aber auch durch Elektrophorese-Experimente [HAUSER und GUYER, 1979; HAUSER et al., 1979] untersucht. Diese Befunde zur Phasenseparation wurden jedoch nicht mit Untersuchungen zum Fettsäure-induzierten Einfluß auf Membranpermeabilität und Fusogenität korrelliert. Da die Veränderung der Domänenstruktur unabhängig vom Phasenverhalten der zugesetzten Fettsäure sind, sollte es möglich sein, die Erkenntnisse aus den Monolayeruntersuchungen auch auf das Verhalten der Fettsäuren im Liposomensystem (also auch auf Matrixlipide unterhalb des Hauptphasenübergangs), zu übertragen.

7 Entwicklung fettsäurehaltiger, nicht fusogener Donorvesikel

Um die membranpermeabilisierende Wirkung der Fettsäuren applikativ einsetzen zu können, entwickelten wir ein System inerter, stabiler fettsäurehaltiger Donorvesikel.
Zur sterischen Stabilisierung von Liposomen werden schon seit einiger Zeit **P**oly**e**thylen**g**lykol (PEG) gekoppeltes Lipide eingesetzt [WOODLE and LASIC, 1992]. Diese Lipide verhindern die Aggregation [NEEDHAM et al., 1992] und somit die Fusion der Liposomen bzw. der Donorvesikel mit Zielmembranen. Da in diesem Falle der Austausch von Fettsäuren mit anderen Liposomen nicht durch Vesikelfusion erfolgt, liefert unser Modellsystem zugleich noch den Beweis für einen molekularen Transfer der Fettsäuren über die wäßrige Phase.
Fettsäuredotierte STEALTH-Liposomen können zusätzlich zu den wasserlöslichen Substanzen, die im Innenvolumen der Vesikel verpackt sind [SLEPUSHKIN et al., 1997], einen hydrophoben Stoff an den Wirkort transportieren. Durch den schnellen Fettsäureaustausch zwischen Donorvesikel und Zielmembran über die Wasserphase könnte eine zusätzliche Permeabilisierung der Zielmembran erreicht werden. Der Übertritt des hydrophilen Wirkstoffes könnte auf diese Weise ermöglicht werden.

Material und Methoden

PEG 5000-PE, AVANTI Polar Lipids, Alabama, USA
PEG 2000-PE, AVANTI Polar Lipids, Alabama, USA

Die Liposomen wurden wie beschrieben durch Extrusion als LUV hergestellt. Zu den Lipidlösungen wurde PEG 5000-PE oder PEG 2000-PE zugemischt. Die Größe der resultierenden Vesikel wurden nach der Extrusion durch einen 200 nm Filter bestimmt. Der mittlere Vesikeldurchmesser betrug 300 nm.

Ergebnisse und Diskussion

Wie Abbildung 51 zeigt, ist eine Zumischung von 5 mol% PEG-2000-PE zu HSPC/PG Vesikeln nicht ausreichend, um die Linolsäure-induzierte Fusion der Vesikel zu unterdrücken. Erst eine Zumischung von 7,5 mol% PEG-5000-PE zeigte den erwünschten, stabilisierenden Effekt. Die Zugabe von 20 mol% Linolsäure zu dieser Vesikelsuspension induzierte keine Fusion zwischen doppelt gelabelten (NBD-PE und Rhodamin-PE) und ungelabelten

„pegylierten“ Vesikeln. Als Donovesikel in allen weiteren Experimenten wurden deshalb HSPC/PG Liposomen mit einem Anteil von 7,5 mol% PEG-5000-PE verwendet.

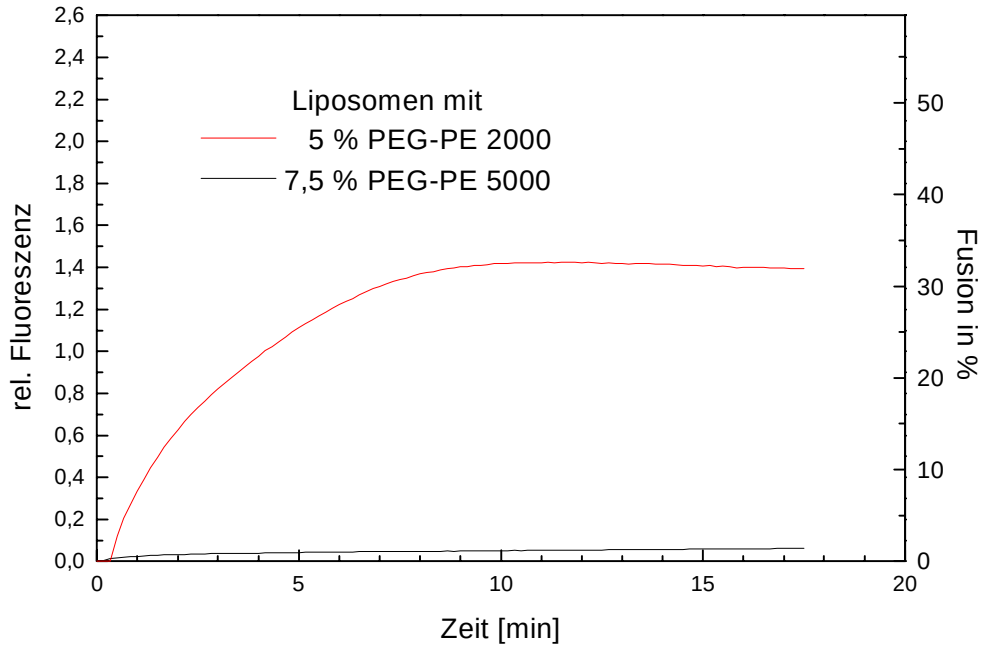


Abbildung 51: Effekt von 20 mol% *cis*-Linolsäure auf die Fusion von durch PEG-PE geschützten HSPC/PG Vesikel. (pH = 7,2 in PBS, T = 25°C, NBD-PE: λ_{Ex} = 450 nm, λ_{Em} = 525 nm, Rhodamin-PE: λ_{Em} = 592 nm)

In einem weiteren Experiment wurde die herabgesetzte Permeabilität der Donorvesikelmembranen gegenüber 6-CF gezeigt. Wie aus Abbildung 52 hervorgeht, induziert die Zugabe von 20 mol% Linolsäure zu den mit 7,5 mol% PEG 5000-PE dotierten Liposomen keinen erhöhten 6-CF Efflux aus den Vesikeln.

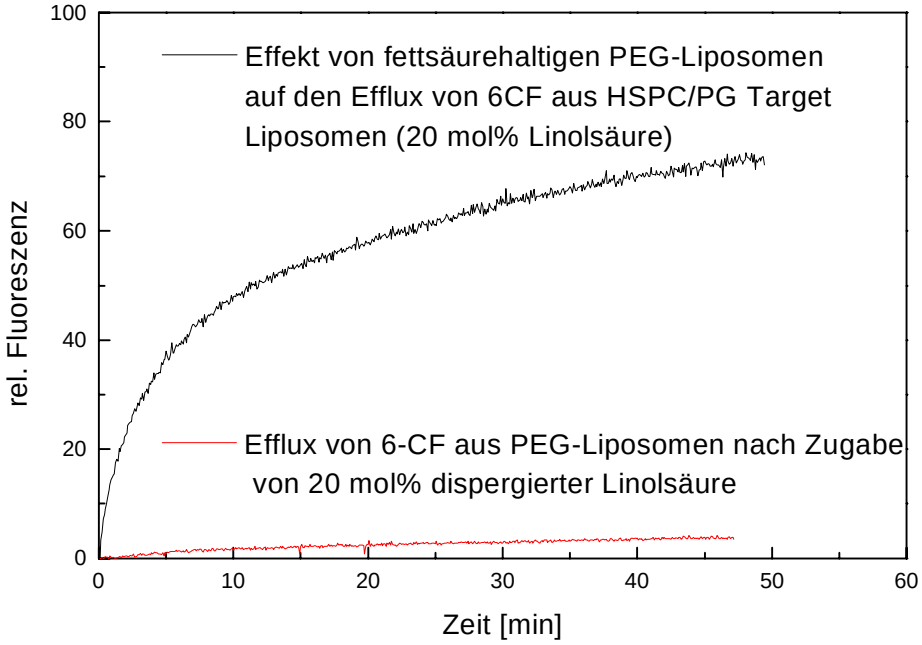


Abbildung 52: Linolsäure-induzierter 6-CF-Efflux aus durch PEG-PE geschützte HSPC/PG Vesikel ungeschützten HSPC/PG Vesikel. (λ_{Ex} = 492 nm, λ_{Em} = 520 nm, pH = 7,2 in PBS)

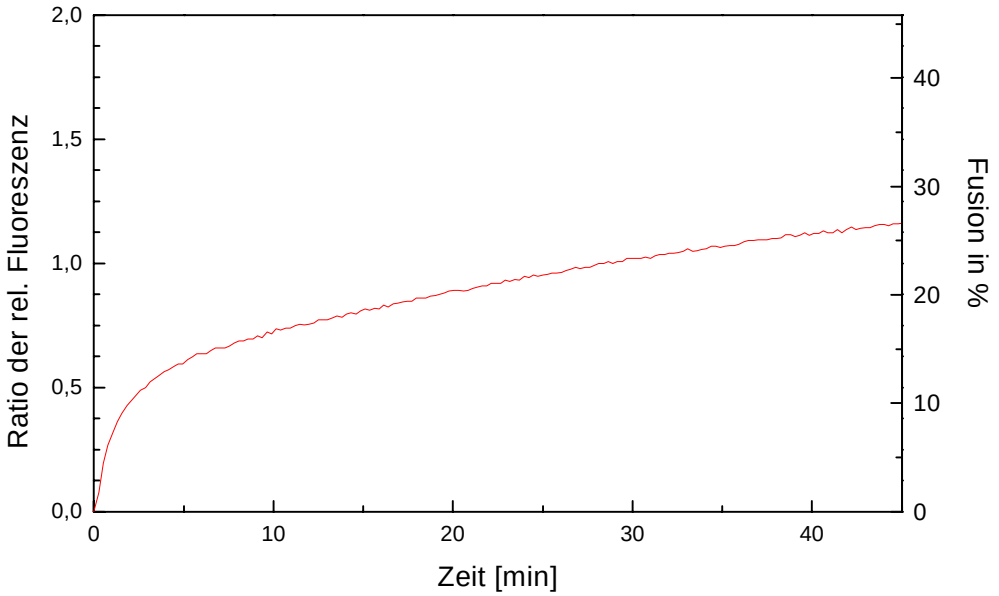


Abbildung 53: Fusion von HSPC/PG Vesikel durch Linolsäure aus fettsäurehaltigen durch PEG-PE geschützten HSPC/PG Donorliposomen. (pH = 7,2 in PBS, 7,5% PEG 5000 PE, 20 mol% *cis*-Linolsäure in den Donorvesikeln,NBD-PE: λ_{Ex} = 450 nm, λ_{Em} = 525 nm, Rhodamin-PE: λ_{Em} = 592 nm)

Den stabilisierten PEG-Vesikeln wurden 20 mol% Linolsäure zugesetzt und deren Wirkung auf nicht stablisierte Targetvesikel untersucht. Die Ergebnisse der Permeabilitätsmessungen mit 6-CF (Abbildung 52) sowie des Lipidmixing-Assays (Abbildung 53) gleichen den mit freien dispergierten Fettsäuren erhaltenen Daten. Wie ein Vergleich der Abbildungen 24 und 52 zeigt, induziert die Linolsäure aus den Donorvesikeln den 6-CF-Efflux scheinbar weniger effektiv als Linolsäure in freier Form. Diese geringere Wirkung erklärt sich aus dem größeren hydrophoben Verteilungsvolumen für Linolsäure. Bei einem Verhältnis von fettsäurehaltigen Donorvesikeln zu Targetvesikeln von 1:1, verteilt sich die eingebaute Fettsäure gleichmäßig auf alle Vesikel. So kann nur die Hälfte der eingesetzten Linolsäure, also 10 mol%, wirksam werden. Die von Donorvesikeln mit 20 mol% Linolsäure induzierte Permeabilitätserhöhung der Targetvesikelmembranen entspricht dem Ergebnis, das durch die Zugabe von 10 mol% freier Linolsäure erhalten wurde (Abbildung 23).

Zu einem analogen Resultat führte die Bestimmung der Vesikelfusion. Die durch linolsäurehaltige Donorvesikel induzierte Fusion von Donovesikeln und Targetliposomen erscheint weniger effizient als die durch freie Linolsäure hervorgerufene Fusion (Abbildung 30 und 53). Die Ursache ist auch in diesem Fall die Gleichgewichtsverteilung der Fettsäure zwischen beiden Liposomenpopulationen.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß es erstens möglich ist Vesikel als Fettsäureträger zur Permeabilisierung von Zielmembranen einzusetzen. Zweitens bewiesen sie, daß der Fettsäuretransfer und der Einbau in die Zielmembran, molekular über die wäßrige Phase erfolgen muß.

8 Zusammenfassung

In der hier vorgelegten Arbeit wurde versucht herauszufinden, ob und wie der Einbau freier Fettsäuren in Bio- und Modellmembranen deren Eigenschaften verändert und ob sich aus diesen Untersuchungen ein Schädigungsmechanismus ableiten läßt, der eine Erlärung für die zytotoxischen Eigenschaften vor allem der ungesättigten Fettsäuren liefert.
Das Vorkommen größerer Mengen freier, ungebundener Fettsäuren ist im Organismus ein sehr seltener Umstand, da die geringe Löslichkeit der Fettsäuren im wäßrigen Milieu und das Vorhandensein großer Mengen fettsäurebindender Proteine und Membranen dazu führt, daß die meisten Fettsäuremoleküle in einem hydrophoben Reservoir gebunden sind.
Unsere eigenen Messungen und die wenigen verfügbaren Literaturangaben ergaben für die Löslichkeit der Fettsäuren in Wasser sehr niedrige Werte. Der Sättigungsgrad beeinflußt die die Löslichkeit bei unveränderter Kettenlänge nur wenig. Dagegen hat die Kettenlänge einen deutlichen Einfluß auf die Löslichkeit (eine 10er Potenz je CH_2-Gruppe). Dieser große Unterschied spielte jedoch bei den von uns untersuchten Fettsäuren mit Kettenlängen zwischen C14 und C18 insofern keine Rolle, als wir in allen Fällen mit Fettsäurekonzentrationen weit oberhalb dieser Löslichkeitsgrenze gearbeitet haben.
Das Arbeiten oberhalb der Löslichkeit zwang uns, das Verhalten der ungelösten Fettsäuren im Wasser genauer zu kennen. Aus den Arbeiten von CISTOLA et al., die 1988 das Phasenverhalten freier Fettsäure in Wasser untersuchten, war klar, daß unter unseren Bedingungen nach Überschreitung des Löslichkeitsprodukts eine Aggregat-, aber keine Mizellbildung auftreten sollte. Als Konsequenz daraus ergab es sich, den Mechanismus des molekularen Fettsäuretransfers zwischen einem hydrophoben Reservoir (den Fettsäureaggregaten) und der Zielmembran eingehender zu untersuchen. Dazu führten wir Messungen mit inerten, fettsäurehaltigen Donorvesikeln durch. Wir fanden eine sehr hohe Geschwindigkeit des Fettsäuretransfers über die wäßrige Phase, so daß daraus der Zeitverlauf der gemessenen Schädigungen in der Akzeptormembran nicht erklärt werden konnte. Wenn der Transfer über die wäßrige Phase so schnell erfolgt, dann spielt die Stärke der zwischenmolekularen Kräfte im Fettsäurereservoir, die für die Nachlösungsgeschwindigkeit verantwortlich ist (und damit auch der Phasenzustand der verwendeten Fettsäuren) keine Rolle im Schädigungsverlauf. Unsere Messungen werden also durch den unterschiedlichen Aggregatzustand der verwendeten Fettsäuren nicht beeinflußt. Ein weiterer Beweis für diese

Annahme ist die Tatsache, daß bei Einbaumessungen mit Parinarsäure kein Unterschied zwischen der *trans*-Form, die bei 25°C unterhalb des Hauptphasenübergangs und der *cis*-Form, die darüber liegt, gefunden wurde. Der Einbau in die Zielmembran ist in der Regel 10 sec nach der Zugabe der Fettsäuren fast vollständig abgeschlossen, was sowohl den Transfer über die wäßrige Phase als auch den unmittelbaren Fettsäureeinbau einschließt. Auch die totale inkorporierte Fettsäuremenge von mindestens 85% der eingesetzten Fettsäure (durch kappillarelektrophoretische Messungen bestimmt), zeigt die weitgehende Unabhängigkeit der Fettsäure-induzierten Veränderungen in der Zielmembran von der Art Fettsäurezugabe und der Einbaugeschwindigkeit. Eine energetische Bilanzierung des Fettsäureeinbaus mit Hilfe der ITC erbrachte keinen Unterschied zwischen Fettsäuren gleicher Kettenlänge im Temperaturbereich um 10°C.

Während die Einbaumessungen keinen Hinweis auf unterschiedliche Wechselwirkungen der verschiedener Fettsäuren mit der Akzeptormembran in diesem Zeitbereich erbrachten, zeigten die Schädigungsmessungen dagegen dramatische Unterschiede. Die Untersuchung fettsäuredotierter Vesikel, bei denen die Fettsäuren im gleichen Konzentrationsbereich wie bei den Einbauexperimenten bereits bei der Liposomenpräparation zugemischt wurden, zeigte keine Effekte. Die beobachteten Schädigungseffekte müssen deshalb mit einer ungleichmäßigen Verteilung der Fettsäure kurz nach dem Einbau in die Membran zusammenhängen. Eine mögliche Erklärung bestünde in einer ungleichen, vertikalen Verteilung durch einen langsamen Flip-Flop der Fettsäuren vom äußeren zum inneren Monolayer der Zielmembran. Diese Ungleichverteilung würde in der äußeren Membranhälfte durch Membranaufwölbungen mit Fettsäureansammlungen in Bereichen hoher Krümmung ausgeglichen werden. Hierbei könnte es zu generalisierten Störungen der Membranintegrität kommen. Doch die von uns mit Hilfe von Potentialmessungen an BLM´s durchgeführte Erfassung des Fettsäure Flip-Flops durch Membranen und die Ergebnisse von KAMP et al, 1995 zeigten, daß Fettsäuren so schnell auf der inneren Bilayerseite ankommen, daß die zeitlich wesentlich später auftretenden Membranschädigungseffekte andere Ursachen haben müssen.

Die laterale Konzentrierung von Fettsäuremolekülen in der Membran wäre eine weitere Möglichkeit zur Erklärung von Membranstörungen. Dieser Clusterung von Fettsäuren kamen wir mit Fluoreszenzfilmwaageuntersuchungen auf die Spur. Es zeigte sich, daß Fettsäuren in einer Phospholipid-Matrix Domänen bilden. Als Domänen bezeichnen wir Areale kristalliner Fettsäure, die sich vom Matrixlipid abgrenzen. Die dabei entstehenden Phasengrenzen stellen Störstellen in der Membran dar, die unterschiedliche Effekte verursachen können. Die Zahl und

die Größe dieser Areale hängt von der Struktur der zugemischten Fettsäure ab. Auf dieser Basis kann die unterschiedliche Ausprägung der Fettsäure-induzierten Membranschädigung erklärt werden. Bei gleichbleibender Gesamtfettsäuremenge bewirkt eine Zunahme der Domänenzahl trotz gleichzeitiger Flächenverkleinerung eine Vergrößerung der Phasengrenzen und somit eine Erhöhung der Fehlstellen im Bilayer. Darauf wird die Verstärkung der beobachteten Schädigungseffekte an künstlichen und natürlichen Biomembranen zurückgeführt.

Wir wählten drei Parameter, um die Fettsäurewirkung auf Membranen zu veranschaulichen, und zu einer Klärung des Schädigungsmechanismus zu kommen.

Die Permeabilität von Liposomen nach Fettsäurezugabe hängt von der Erhöhung der Fehlstellenanzahl in der Molekülpackung des Matrixlipids ab. Sie wird nach dem Einbau von Fettsäuren aus dem Medium stark erhöht. Speziell die stark zytotoxische Linolsäure permeabilisiert die Membran z.B. für den hydrophilen Marker 6-CF erheblich. Insgesamt konnte eine Abhängigkeit der Permeabilität von der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad gezeigt werden. Dies läßt den Zusammenhang zwischen der Molekülstruktur, der Art der Packung im Monolayer und der Ausprägung der Schädigung erkennen.

Die zweite von uns untersuchte Eigenschaft, die Fusogenität von Membranen, läßt ebenfalls Rückschlüsse auf die Verteilung der Fettsäuren in der Zielmembran zu, wobei man heute annimmt, daß die Ausbildung spezieller Domänen in der Membran grundsätzlich notwendig ist, um eine Fusion zu induzieren. Als erster Schritt der Liposomenfusion müssen die Vesikel aggregieren und die zwei Bilayer eng zusammenkommen. Dies funktioniert nur, wenn die Abstoßungskräfte durch die störende Hydrathülle zwischen den Membranen überwunden werden bzw. die Dicke dieser Hydrathülle vermindert wird. Nur so kann im zweiten Schritt eine hydrophobe Wechselwirkung der Membranmoleküle erreicht werden, wie sie zur Fusion notwendig ist. Durch die kleine Kopfgruppe der Fettsäuren, sowie ihre unvollständige Dissoziation unter physiologischen Bedingungen, stellen Fettsäuredomänen Membranareale dar, die eine geringere Hydrathülle aufweisen und so eine größere Annäherung der beiden Vesikelmembranen zulassen. Gleichzeitig begünstigen die Phasengrenzen entlang der Domänen, mit ihren Fehlstellen den dritten Schritt der Fusion, eine Destabilisierung an den Rändern der Kontaktfläche zwischen den Liposomen, von denen die Fusion ausgeht.

Eine weiterer Effekt ist die Fettsäure-induzierte Größenänderung der Vesikel, die wir mittels dynamischer Lichtstreuung nachweisen konnten. Unsere detaillierten Untersuchungen zeigten, daß nach der fusionsbedingten Größenzunahme ein weiterer bislang nicht erkannter Vorgang

abläuft. Die durch Fusion entstandenen gemischten Vesikel sind instabil und verkleinern sich in einem nachfolgenden Prozeß zu energetisch stabilen Endvesikeln. Die Stabilität dieser Vesikel konnten wir sowohl mit unseren Kapillarelektrophorese-Untersuchungen belegen, als auch durch eine direkte Herstellung dieser Endvesikel und vergleichende Permeabilitätsmessungen mit 6-CF nachweisen. Fettsäuren destabilisieren die Membran also nur, wenn sie aus dem Medium in die Membran eingebaut werden.

In allen Schädigungsuntersuchungen wurde für die Myristinsäure ein abweichendes Verhalten beobachtet. Sie verursacht ab einer Zumischung von mehr als 7,5 mol% eine vollständige Lysis der Vesikel. Unterhalb dieser Konzentration verhält sich Myristinsäure jedoch analog den anderen untersuchten Fettsäuren. Eine Erklärung könnte in der Annäherung an die physikalischen Eigenschaften der noch kürzerkettigen Fettsäuren, deren Salze die klassischen Seifen darstellen, liegen.

Als Quintessenz aller Meßergebnisse wurde von uns ein Schädigungsmechanismus für Liposomen durch dem Einbau von Fettsäuren aus dem Medium postuliert. Die Fettsäure wird sehr schnell sowohl in die äußere als auch in die innere Hälfte des Phospholipidbilayers eingebaut. Im äußeren Monolayer entsteht eine laterale Clusterung der Fettsäuremoleküle, die zu einer Erhöhung der Permeabilität und zur Fusion der einzelnen Vesikel führt. Das gestörte Liposomensystem stabilisiert sich danach durch den Zerfall der instabilen nach der Fusion entstandenen Liposomen zu einer stabilen Population gemischter Liposomen, die denen entsprechen, die wir aus einer Phospholipid/Fettsäuremischung herstellen konnten. Entscheidend für die Membranschädigung am Liposom ist also die Zeit kurz nach dem Einbau der Fettsäure.

Die Fettsäureeinwirkung auf Zellmembranen sollte ähnliche Effekte zeigen, wenn unsere Hypothese einer physikalischen Membranschädigung als Basis für die Zytotoxizität der Fettsäuren korrekt ist.

An einer Keratinozytenlinie untersuchten wir analog zu unseren Messungen an der Modellmembran mit Hilfe der Parinarsäure die Einbaugeschwindigkeit von Fettsäuren in Zellmembranen. Auch hier erfolgte der Einbau sehr schnell, und es zeigte sich kein Unterschied zwischen der *cis*- und der *trans*-Form dieser fluoreszierenden Modellfettsäure. Zusätzlich gelang es, den Einbau der Parinarsäure auch in die inneren Membranen der Zelle zu verfolgen, der wie erwartet verzögert erfolgte. Ob der Fettsäuretransport im Cytosol dabei über Transportproteine erfolgt, konnte nicht geklärt werden. Wegen der Transfergeschwindigkeit spricht auch in diesem Fall einiges für eine schnelle Diffusion über die Wasserphase.

Bereits im Verlauf unserer Einbauuntersuchungen ließen sich an den mikroskopischen Aufnahmen der Zellen morphologische massive Schäden erkennen. Um die Membranschädigung direkt nachzuweisen und um einen direkten Vergleich mit den Untersuchungen an den Modellmembranen zu ermöglichen, wählten wir ein anderes Meßverfahren. Da weder eine direkte Fusionsmessung noch die Erfassung der evtl. damit verbundenen Größenänderung an Zellen möglich ist, sollte mit unserer Versuchsanordnung die Permeabilitätserhöhung der Membran von Rinderaugenlinsenzellen nach Zugabe von Fettsäure registriert werden. Mit einem zu diesem Zweck neu entwickelten RET (Resonanzenergietransfer)-Experiment zeigte sich eine dramatische Zunahme der Membranpermeabilität unter dem Einfluß von Linolsäure. Dies erklärt zumindest teilweise die bei GLAESSER et al., 1996 gezeigten Schäden an den Augenlinsenzellen nach Linolsäurezugabe.
Die hier vorgelegten Untersuchungen bestärken uns in dem Konzept, daß die exogene Änderung physikalischer Parameter in Modell- und Zellmembranen zu vergleichbaren Strukturantworten führt und daß die an Liposomenmembranen erhaltenen Ergebnisse auch Erklärungen für Phänomäne an der Zellmembran liefern können.
Die Arbeit zeigt weiterhin, wie freie Fettsäuren mit Biomembranen wechselwirken und weshalb diese Wechselwirkungen die Membranintegrität stören können.
In zukünftigen Arbeiten sollte versucht werden, auf der Basis dieser Erkenntnisse anwendungsorientierte Forschung zu betreiben, z.B. Zellmembranen durch kurzzeitiges Fettsäureanfluten temporär zu permeabilisieren, um verschiedene Substanzen leichter ins Zellinnere zu bringen. Erste Versuche mit fettsäuredotierten, inerten STEALTH-Liposomen zeigten an Modellmembranen, daß sich diese Idee prinzipiell realisieren läßt.
An intakten Zellen könnte damit die erhöhte Aufnahme hydrophiler Medikamente oder z.B. der Plasmideinbau bei der nonviralen Gentransfektion getriggert werden. Die Zytotoxizität ließe sich dabei durch zeitlich versetzte Zugabe von Albumin, aufgrund seiner hohen Fettsäurebindungskapazität und der hohen Transfergeschwindigkeit von Fettsäuren über die wäßrige Phase, minimieren.
Ein weiteres Feld eröffnet sich mit der vertieften physikalischen Charakterisierung von Fettsäuren in hydrophiler und hydrophober Umgebung, (z.B. die Messung des pKa-Wertes von Fettsäuren in Membranen). Erfolgversprechend sollte es auch sein, weitere Fettsäuren (kurzkettige, verzweigte) in die durch diese Arbeit etablierten Untersuchungen zur Membranschädigung einzubeziehen.

9 Literatur

Akeo, K., Hiramitsu, T., Kanda, T., Yorifuji, H., Okisaka, S.: Comparative effects of linoleic acid and linoleic acid hydroperoxide on growth and morphology of bovine retinal pigment epithelial cells in vitro. Curr Eye Res 15(5), (1996) 467-476

Aoyama, Y., Seishima, M., Mori, S., Kitajima, Y., Okano, Y., Nozawa Y.: Involvement of protein kinase C in bradykinin_induced intracellular calcium increase in primary cultured human keratinocytes. J Dermatol Sci, 9(2), (1995) 111-116

Ashavaid, T. F., Colvin, R. A., Messineo, F. C., MacAlister, T., Katz, A. M.: Effects of fatty acids on Na/Ca exchange in cardiac sarcolemmal membranes. J Mol Cell Cardiol 17(9), (1985) 851-861

Ashbrook, J. D., Spector, A. A., Santos, E.C., Fletcher, J. E.: Long chain fatty acid binding to human plasma albumin. J Biol. Chem. 250(6), (1975) 2333-2338

Barthel, D., Zschoernig, O., Lange, K., Lenk, R., Arnold, K.: Interaction of electrically charged drug molecules with phospholipid membranes. Biochim. et Biophys. Acta 945, 2, (1988) 361-366

Blumenthal,R., Weinstein, J. N., Sharrow, S. O., Henkart, P.: Liposome - lymphocyte interaction: Saturable sites for Transfer and intracellular release of liposome contents. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, (1977) p. 5603.

Bouchard, M., Boudreau, N., Auger, M.: Membrane fluidity response to odorants as seen by 2H-NMR and infrared spectroscopy. Biochim Biophys Acta 1282(2), (1996) 233-239

Boukamp, P., Petrussevska, Breitkreuz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. J. Cell Biol., 106, (1988) 761-771

Brezesinsky, G, Mögel, H. J.:Grenzflächen und Kolloide. Spektrum Verlag Heidelberg 1993

Casals, C., Herrera, L., Garcia-Barreno, P., Municio, A. M.: Association of changes in lysophosphatidylcholine metabolism and in microsomal membrane lipid composition to the pulmonary injury induced by oleic acid. Biochim Biophys Acta 1023(2), (1990) 290-297

Chong, C. S., Colbow, K.: Light scattering and turbidity measurements on lipid vesicles. Biochim Biophys Acta 436(2), (1976) 260-282

Cistola, D. P., Atkinson, D., Hamilton, J. A., Small, D. M.: Phase behavior and bilayer properties of fatty acids: hydrated 1:1 acid-soaps. Biochemistry , 25, (1986) 2804-2812

Cistola, P. D., Hamilton, J. A., Jackson, D., Small, D. M.: Ionization and Phase Behavior of Fatty Acids in Water: Application of the Gibbs Phase Rule. Biochemistry 27, (1988) 1881-1888

Cooper, R., Noy, N., Zakim, D.: A physical-chemical model for cellular uptake of fatty acids: Prediction of intracellular pool sizes. Biochemistry 26, (1987) 5890-5896

CRC handbook of chemistry and physics ed.-in-chief: David R. Lide. 72. ed. (1991/1992) Boca Raton

Crowe, J. H., McKersie, B. D., Crowe, L. M.:Effects of free fatty acids and transition temperatur on the stability of dry liposomes. Biochim. Biophys. Acta 979, (1989) 7-10

Cullis, P.R., Hope, M. J.: Effects of fusogenic agent on membrane structure of erythrocyte ghosts and the mechanism of membrane fusion. Nature 271, (1979) 672-674

De la Maza, A., Parra, J. L.: Changes in phosphatidylcholine liposomes caused by a mixture of triton X-100 and sodium dodecyl sulfate. Biochim Biophys Acta 1300, (1996) 125-134

Demant, E. J. F., Sehested, M.: Recognition of anthracycline binding domains in bovine serum albumin and design of a free fatty acid sensor protein. Biochim Biophys Acta 1156, (1993) 151-160

Dinis, T. C., Almeida, L. M., Madeira, V. M.: Lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum membranes: effect on functional and biophysical properties.. Arch. Biochem. Biophys. 301, (2), (1993) 256-264

Dörfler, H.-D.:Grenzflächen und Kolloidchemie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1994) 424-430

Fitscher, B. A., Elsing, C., Riedel, H. D., Gorski, J., Stremmel, W.: Protein-mediated facilitated uptake processes for fatty acids, bilirubin, and other amphipathic compounds. Proc Soc Exp Biol Med 212(1), (1996) 15-23

Fleming, N., Mellow, L.: Arachidonic acid stimulates intracellular calcium mobilization and regulates protein synthesis, ATP levels, and mucin secretion in submandibular gland cells. J Dent Res 1995 Jun;74(6):1295-1302

Fuks, B., Homble, F.: Mechanism of proton permeation through chloroplast lipid membranes. Plant Physiol 112(2), (1996) 759-766

Gast, K., Zirwer, D., Ladhoff, A. M., Schreiber, J., Koelsch, R., Kretschmer, K., Lasch, J.: Auto-oxidation-induced fusion of lipid vesicles. Biochim Biophys Acta 686(1), (1982) 99-109

Glaesser, D., Fass, U., Gruner, M., Thust, O., Iwig, M., Spindler, M.: Low concentrations of *cis*-limoleic acid induce cell damage in epithelial cells from bovine lenses. Eur. J. Cell Biol. 71, (1996) 286-292

Glatz, J. F., Borchers, T., Spener, F., van der Vusse, G. J.: Fatty acids in cell signalling: modulation by lipid binding proteins. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 52(2-3), (1995) 121-127

Graber, R., Sumida, C., Nunez, E. A.: Fatty acids and cell signal transduction. J. Lip. Med. Cell Sig. 9, (1994) 91-116

Gruen, D. W., Wolfe, J.: Lateral tensions and pressures in membranes and lipid monolayers. Biochim Biophys Acta 688(2), (1982) 572-580

Gutknecht, J.: Aspirin, acetaminophen and proton transport through phospholipid bilayers and mitochondrial membranes. Mol Cell Biochem 114(1-2), (1992) 3-8

Hamilton, J. A.: Fatty acid transport: difficult or easy ? J Lipid Res 39, (3), (1998) 467-481

Hauser, H., Guyer, W.: Clustering of fatty acids in phospholipid bilayers. Biochim Biophys Acta 553(2), (1979) 359-363

Hauser, H., Guyer, W., Howell, K.: Lateral distribution of negatively charged lipids in lecithin membranes. Clustering of fatty acids. Biochemistry 18(15), (1979) 3285-3291

Heerklotz, H., Lantzsch, G., Binder, H., Klose, G.: Thermodynamic characterization of dilute aqueous lipid/detergent mixtures of POPC and C12EO8 by means of isothermal titration calorimetry. J. Phys. Chem. 100, (1996) 6764-6774

Heyliger, C. E., Kheshgi, T. J., Murphy, E. J., Myers-Payne, S., Schroeder, F.: Fatty acid double bond orientation alters interaction with L-cell fibroblasts.
Mol Cell Biochem 155, (2), (1996) 113-119

Iwig, M., Czeslick, E., Muller, A., Gruner, M., Spindler, M., Glaesser, D.: Growth regulation by cell shape alteration and organization of the cytoskeleton. Eur J Cell Biol 67(2), (1995) 145-157

Jähnig, F.: What is the surface tension of a lipid bilayer membrane? Biophys J 71(3), (1996) 1348-1349

Janero, D. R., Burghardt, C., Feldman, D.: Amphiphile-induced heart muscle-cell (myocyte) injury: effects of intracellular fatty acid overload. J Cell Physiol 137(1), (1988) 1-13

Jiskoot, W., Teerlink, T., Beuvery E. C., Crommelin, D.J.: Preparation of liposomes via detergent removal from mixed micelles by dilution. The effect of bilayer composition and process parameters on liposome characteristics. Pharm Weekbl [Sci] 8(5), (1986) 259-265

Kamp, F., Zakim, D, Zhang F., Noy, N., Hamilton, J. A.: Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast. Biochemistry. 34(37), (1995) 11928-11937

Karnovsky, M. J., Kleinfeld, A. M., Hoover, R. L., Dawidowicz, E. A., McIntyre, D. E., Salzman, E. A., Klausner, R. D.: Lipid domains in membranes. Ann N Y Acad Sci 401, (1982) 61-75

Keller, M., Kerth, A., Blume, A.: Thermodynamics of interaction of octyl glucoside with phosphatidylcholine vesicles: partitioning and solubilization as studied by high sensitivity titration calorimetry. Biochim Biophys Acta 1326(2), (1997) 178-192

Kenyon, M. A., Hamilton, J. A.: 13C NMR studies of the binding of medium-chain fatty acids to human serum albumin. J. Lip. Res. 35, (1994) 458-467

Kessler, R., Manz, H. J.: Charcterization of artificial liposomes with free-flow electrophoresis. Electrophoresis 11, 11, (1990) 979-980

Kibat, P. G., Stricker, H.: Lagerungsstabilität von Liposomendispersionen aus Sojalecithinen. Pharm. Ind. 48, Nr. 10, (1986) 1184-1189

Klausner, R. D., Kleinfeld, A. M., Hoover, R. L., Karnovsky, M. J.: Lipid Domains in Membranes. J. Biol. Chem. 255, No. 4, (1980) 1286-1295

Kleinfeld, A. M., Chu, P., Romero, C.: Transport of long-chain native fatty acids across lipid bilayer membranesindicates that transbilayer flip-flop is rate limiting. Biochemistry 36(46), (1997) 14146-14158

Kleinfeld, A. M., Chu, P., Storch, J.: Flip-flop is slow and rate limiting for the movement of long chain anthroyloxy fatty acids across lipid vesicles. Biochemistry. 36(19), (1997) 5702-5711

Koynova R. D., Tenchov, B. G., Quinn P. J., Laggner, P.: Structure and phase behavior of hydrated mixtures of L-dipalmitoylphosphatidylcholine and palmitic acid. Correlations between structural rearrangements, specific volume changes and endothermic events. Chem Phys Lipids 48(3-4), (1988) 205-214

Lasch, J., Hoffmann, J., Omelyanenko, W. G., Klibanov, A. A., Torchilin, V. P., Binder, H., Gawrisch, K.: Interaction of Triton X-100 and octyl glycoside with liposomal membranes at sublytic and lytic concentrations. Spectroscopic studies. Biochim Biophys Acta 1022, (1990) 171-180

Lasch, J.: Interaction of detergents with lipid vesicles. Biochim. Biophys. Acta 1241, (1995) 269-292

Lavoie, C., Jolicoeur, M., Paiement, J.: Accumulation of polyunsaturated free fatty acids coincident with the fusion of rough endoplasmatic reticulum membranes. Biochim Biophys Acta 1070, (1991) 274-278

Lesieur S, Grabielle-Madelmont C, Paternostre MT, Ollivon M Size analysis and stability study of lipid vesicles by high-performance gel exclusion chromatography, turbidity, and dynamic light scattering. Anal Biochem 192(2), (1991) 334-343

Marsh, D.: Lateral pressure in membranes. Biochim Biophys Acta 1286(3), (1996) 183-223

McDonald, R. C., McDonald, R. I.: Membrane surface pressure can account for differential activities of membrane penetrating molecules. J. Biol. Chem. 263, 21, (1988) 10052-10055

McKersie, B. D., Crowe, J. H., Crowe, L. M.: Free fatty acid effects on leakage, phase properties and fusion of fully hydrated model membranes. Biochim. Biophys. Acta 982, (1989) 156-160

Möhwald, H.: Phospholipid and phospholipid-protein monolayers at the air/water interface. Annu Rev Phys Chem 41, (1990) 441-476

Mueller, P., Rudin, D. O., Tien, H. T., Wescott, W. C.: J. Phys. Chem 67, (1963) 534-535

Mukerjee, P., Mysels, K. J.: Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems. U.S. Department of Commerce (1971)

Needham, D., McIntosh, T. J., Lasic, D. D.: Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. Biochim. Biophys Acta 1108(1), (1992) 40-48

Niki, E., Minamisawa, S., Oikawa, M., Komuro, E.: Membrane damage from lipid oxidation induced by free radicals and cigarette smoke. Ann N Y Acad Sci 686, (1993) 29-37

Oberle, V., Kuhnt, B., Glanz, D., Rothe, U.: Comparison of Parinaric Acid in Cellular and Model-Membrane Systems. Eur. J. Cell Biol., 43 (72), (1997) 78

Ockner, R. K., Manning, J. A.: Fatty acid binding protein. Role in esterification of absorbed long chain fatty acid in rat intestine. J. Clin. Invest. 58(3), 1976) 632-641

Ohki, S., Arnold, K.: Surface Dielectric Constant, Surface Hydrophobicity and Membrane Fusion. J Membrane Biol 114, (1990) 195-203

Ollivon, M., Walter, A., Blumenthal, R.: Sizing and separation of liposomes, biological vesicles, and viruses by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem 152(2), (1986) 262-274

Olson, F., Hunt, C. A., Szoka, F. C., Vail, W. J., Papahadjopoulos, D.: Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. Biochim Biophys Acta 557, (1979) 9-23

Ortiz, A., Gomez-Fernandez, J. C.: A differential scanning calorimetry study of the interaction of free fatty acids with phospholipid membranes. Chem Phys Lipids 45(1), (1987) 75-91

Pjura, W. J., Kleinfeld, A, M., Karnovsky, M. J.:Partition of Fatty Acids and Fluorescent Fatty Acids into Membranes. Biochemistry 23, (1984) 2039-2043

Pohl P, Rosenfeld E, Millner R Effects of ultrasound on the steady-state transmembrane pH gradient and the permeability of acetic acid through bilayer lipid membranes. Biochim Biophys Acta 1145(2), (1993) 279-283

Pohl, P., Antonenko, Y. N., Rosenfeld, E.: Effect of ultrasound on the pH profiles in the unstirred layers near planar bilayer lipid membranes measured by microelectrodes. Biochim Biophys Acta. 1152(1), (1993) 155-160

Qian, M., Eaton, J. W.: Free fatty acids enhance hypochlorous acid production by activated neutrophils. J Lab Clin Med 124(1), (1994) 86-95

Ramasamy, S., Boissonneault, G. A., Decker, E. A., Hennig, B. J.: Linoleic acid-induced endothelial cell injury: role of membrane-bound enzyme activities and lipid oxidation. Biochem Toxicol 1991;6(1):29-35

Richieri, G. V., Kleinfeld, A. M.: Free fatty acids are produced in and secreted from target cells very early in cytotoxic T lymphocyte-mediated killing. J Immunol 147(8), (1991) 2809-2815

Richieri, G. V., Kleinfeld, A. M.: Unbound free fatty acid levels in human serum. J. Lip. Res. 36, (1995) 229-240

Ruiz-Argüello, M. B., Basanez G., Goni M. F., Alonso, A.: Different Effects of Enzyme-generated Ceramides and Diacylgglycerols in Phospholipid Membrane Fusion and Leakage. J. Biol. Chem. 271, No. 43, (1996) 26616-26621

Sackmann, E.: Membrane bending energy concept of vesicle- and cell-shapes and shape-transitions. FEBS Letters 346, (1994) 3-16

Salgado, J., Villalain, J., Gomez-Fernandez, J. C.: Metastability of dimiristoylphosphatidylethanolamine as studied by FT-IR and the effect of alpha-tocopherol. Biochim Biophys Acta 1239(2), (1995) 213-225

Sankaram, M. B., Brophy, P. J., Jordi, W., Marsh, D.: Fatty Acid pH titration and the selectivity of interaction with extrinsic proteins in dimyristoylphophatidylglycerol dispersions. Spin label ESR studies. Biochim. Biophys Acta, 1021, (1990) 63-69

Schmider, W., Fahr, A., Voges, R., Gerok, W., Kurz, G.: Irreversible inhibition of hepatic fatty acid salt uptake by photoaffinity labeling with 11, 11-azistearate. J Lipid Res 1996 Apr;37(4):739-753

Schmitz-Moormann, P., Boger, A.: Tissue damage by fatty acids released by lipolysis. Contribution to the pathogenesis of acute pancreatitis. Pathol Res Pract 171(3-4), (1981) 303-313

Schneider IM, Wohlrab W, Neubert R Fatty acids and the epidermis. Hautarzt 48(5), (1997) 303-310 [Artikel in Deutsch]

Schroeder, F., Soler-Argilaga, C.: Calcium modulates fatty acid dynamics in rat liver plasma membranes. Eur. J. Biochem., 132(3), (1983) 517-524

Schubert, R., Beyer, K., Wolburg, H., Schmidt, K.-H.: Structural Changes in Membranes of Large Unilamellar Vesicles after Binding of Sodium Cholate. Biochemistry, 25, (1986) 5263-5269

Schubert, R., Schmidt, K.-H.: Structural Changes in Vesicle Membranes and Mixed Micells of Various Lipid Compositions after Binding of Different Bile Salts. Biochemistry, 27, (1988) 8787-8794

Schürer, N. Y., Stremmel, W., Grundmann, J.,Schliep, V., Kleinert, H., Bass, N. M., Williams, M. L.: Evidence for a novel keratinocyte fatty acid uptake mechanism with preference for linoleic acid: Comparison of oleic and linoleic acid uptake by cultured human keratinocytes, fibroblasts and human hepatoma cell line. Biochim. Biophys. Acta 1211, (1994) 51-60

Schurtenberger, P., Mazer, N. A., Kanzig, W.: Dynamic laser light scattering studies of the micelle to vesicle transition in model and native bile. Hepatology 4(5 Suppl), (1984) 143-147

Siafaka-Kapadai, A., Hanahan, D. J., Javors, M. A.: Oleic acid-induced Ca2+ mobilization in human platelets: is oleic acid an intracellular messenger?. J. Lip. Med. Cell Sig. 15, (1997) 215-232

Sklar, L. A., Hudson, B. S., Simoni, R. D.: Conjugated polyene fatty acids as fluorescent probes: synthetic phospholipid membrane studies. Biochemistry, 16(5), (1977) 819-828

Slepushkin, V. A., Simoes, S., Dazin, P., Newman, M. S., Guo, L. S., Pedroso de Lima, M. C., Düzgünes, N.: Sterically stabilized pH-sensitive liposomes. Intracellular delivery of aqueous contents and prolonged circulation in vivo. J Biol Chem 272, (4), (1997) 2382-2388

Sober, H. A., Harte, R. A.: CRC Handbook of Biochemistry 2nd Ed. CRC Press New York 1968

Steinhilber, D.:Leukotriene als Mediatoren bei Entzündungsprozessen: Physiologie un Pharmakologie des 5-Lipoxygenasestoffwechsels. BIOforum 17, (1994) 296-303

Storch, J., Kleinfeld, A. M.: Transfer of Long-Chain Fluorescent Free Fatty Acid between Unilamellar Vesicles. Biochemistry, 25, (1986) 1717-1726

Struck, D. K., Hoekstra, D., Pagano, R. E.: Use of Resonance Energy Transfer to Monitor Membrane Fusion. Biochemistry 20, (1981) 4093-4099

Sun, S. T., Day, E. P., Ho, J. T.: Temperature dependence of calcium-induced fusion of sonicated phosphatidylserine vesicles. Proc Natl Acad Sci U S A 75(9), (1978) 4325-4328

Van Nieuwenhoven, F. A., Van der Vusse, G. J., Glatz, J. F. C.: Membrane-Associated and Cytoplasmic Fatty Acid-Binding Proteins. Lipids Vol. 31 Suppl. (1996) S-223-S-227

Venkatachalam, M. A., Patel, Y. J., Kreisberg, J. I., Weinberg, J. M.: Energy thresholds that determine membrane integrity and injury in a renal epithelial cell line (LLC-PK1). Relationships to phospholipid degradation and unesterified fatty acid accumulation. J Clin Invest 81(3), (1988) 745-758

Wang, L. Y., Ma, J. K., Pan, W. F., Toledo-Velasquez, D., Malanga, C. J., Rojanasakul, Y.: Alveolar permeability enhancement by oleic acid and related fatty acids: evidence for a calcium-dependent mechanism. Pharm Res 11(4), (1994) 513-517

Watanabe, S., Sato, T.: Effects of free fatty acids on the binding of bovine and human serum albumin with steroid hormones. Biochim. Biophys. Acta 1289, (1996) 385-396

Weinstein, J. N., Yoshikami, S., Henkart, P., Blumenthal, R., Hagins, W. A.: Liposome - Cell Interaction: Transfer and Intracellular Release of a Trapped Fluorescent Marker. Science 195, (1977) 489.

Wilschut, J., Düzgünez, N., Hoekstra, D.,Papahadjopoulos, D.: Biochim. Biophys. Acta, 734, (1983) 309

Wilschut, J., Scholma, J., Stegmann, T.: Molecular mechanisms of membrane fusion and applications of membrane fusion techniques. Adv Exp med Biol 238, (1988) 105-126

Wong, M., Thompson, T. E.: Aggregation of dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles. Biochemistry 21(17), (1982) 4133-4139

Woodle, M. C., Lasic, D. D.: Sterically stabilized liposomes. Biochim Biophys Acta 1113(2), (1992) 171-199

Yang, M. H., Schaich, K. M.: Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes. Free Radic Biol Med 20(2), (1996) 225-236

Zakim, D.: Fatty acids enter cells by simple diffusion. Proc Soc Exp Biol Med 212(1), (1996) 5-14

Zakrzewski, K., Goch, H.: Human serum albumin. Tyrosyl residues and strongly binding sites. Biochemistry 7(5), (1968) 1835-1842

Zellmer, S., Cevc, G., Risse, P.: Temperature- and pH-controlled fusion between complex lipid membranes. Examples with the diacylphosphatidylcholine/fatty acid mixed liposomes. Biochim Biophys Acta 1196, (1994) 101-113

Zhang, D., Yasuda, T., Okada, S.: A Carboxyfluorescein-Enveloping liposome as a Physicochemical Damage Model of the Biomembrane for the Study of Lipid Peroxidation. J. Clin. Biochem. Nutr. 14, (1993) 83-90

Zhang, Y., Zhang, R., Hjerten, S., Lundhal, P.: Liposome capillary electrophoresis for analysis of interactions between lipid bilayers and solutes. Electrophoresis 16, 8, (1995) 1519-1523

Zhou, S. L., Stump, D., Sorrentino, D., Potter B. J., Berk, P. D.: Adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells involves augmented expression of a 43-kDa plasma membrane fatty acid-binding protein. J Biol Chem 267(20), (1992) 14456-14461

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bedanken, bei

Herrn Doz. Dr. habil. U. Rothe für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, die Freiheit bei der Bearbeitung des Themas, sowie seine ständige Bereitschaft zu Diskussion und Kritik.

Frau U. Goder für die praktische Hilfe bei der Vorbereitung meiner Experimente.

Herrn Dr. G. Bendas und seiner Arbeitsgruppe für die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten und für viele hilfreiche Tips beim Experimentieren mit Liposomen.

Herrn H. Aurich, Herrn Dr. U. Bakowsky, Herrn J. Vogel und Herrn M. Liebau für die tolle Zeit zusammen im Labor.

Herrn Dr. S. Zellmer für die Meßzeit am Fluoreszenzspektrometer und viele Diskussionen und Tips zur Bearbeitung meines Themas.

Herrn Prof. Dr. W. Wohlrab für die Ermöglichung der Versuche an den HaCaT-Zellen.

der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. D. Glanz für die Überlassung von Labormaterial, insbesonders bei Frau Wolter für ihre Mühe bei den Zellversuchen.

Herrn Prof. Dr. A. Blume für die Nutzung des Titrationskalorimeters.

Herrn Prof. Dr. R. Neubert für die Nutzung der Kapillarelektrophorese.

Herrn Dr. P. Pohl für die BLM Messungen.

Prof. D. Hoekstra for his patience during the writing of this thesis.

Und meinen Eltern für alles

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Wörtliche oder inhaltliche Zitate sind in der Arbeit als solche kenntlich gemacht.

Halle, den 8.9.1998

Volker Oberle

Sibrandaheerd 16
NL-9737 NS Groningen

Tel.: 0031-50-5491520
e-mail: v.oberle@med.rug.nl

Geburtstag:		1. Februar 1965
Geburtsort:		Freiburg i. Br. (Baden-Württemberg)
Familienstand:		ledig
Ausbildung:	**1971-1975**	Emil-Gött Schule Freiburg i. Br.
		Baden Württemberg
	1975	Lucian-Reich Schule Hüfingen
		Baden Württemberg
	1975-1984	Fürstenberg Gymnasium Donaueschingen
		Baden Württemberg
	1984	Allgemeine Hochschulreife
		Baden Württemberg
	1984-1985	Grundwehrdienst
	1985-1992	Albert-Ludwigs Universität
		Freiburg i. Br.
		Studium der Chemie
	1992-1995	Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
		Studium der Biochemie
	1995-1998	Promotionsstudium an der
		Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
	1998-	Postdoktorale Ausbildung an der
		Universität Groningen/Niederlande

Halle, den 06. November 1998