

# **Wechselwirkung des Lipoheptapeptides Surfactin mit Lipiddoppelschichten aus DMPC und DPPC**

vorgelegt von  
Lebensmittelchemikerin  
Henny Kell  
Makassar-Indonesien

Von der Fakultät II – Mathematik und Naturwissenschaften  
der Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr.rer.nat.

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Suessmuth

Berichter: Prof. Dr. P. Hildebrandt

Berichter: Priv. Doz. Dr. J. Vater

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 31.10.2006

Berlin 2006

D83

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft und zum Teil in Kooperation mit der Technischen Universität Berlin, Fachbereich Chemie der Fakultät II angefertigt.

An erste Stelle danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. Joachim Vater für sein kontinuierliches Interesse am Fortgang dieser Arbeit. Durch seine geduldige und ständige Diskussionsbereitschaft war er mir eine ganz entscheidende Hilfe, was zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Seine humane Art hat mich sehr beeindruckt.

Ein großes Dankeschön möchte ich Herrn Prof. Dr. Gerhard Ertl für seine Bereitschaft zur Finanzierung dieser Arbeit aussprechen. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Josef F. Holzwarth für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Betreuung beim experimentellen Teil dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. P. Hildebrandt möchte ich mich für die Bereitschaft, sich als Berichter dieser Arbeit zur Verfügung zu stellen, bedanken. Herrn Dr. Christoph Boettcher bin ich zum Dank für die Kryoelektronenmikroskopie-Aufnahmen verpflichtet. Herzlichen Dank an Dr. Joachim Frank und Dr. Sabine Azouani für die gute Zusammenarbeit, die zahlreichen Diskussionen und die stetige Hilfsbereitschaft. Für Hilfe bei der Anwendung des Bildverarbeitungsprogramms geht viel Dank an Waruno Mahdi. Mein besonderer Dank geht an meinen Mann Dipl. Phys. Burkhard Kell für seine umfassende Unterstützung bei dieser Arbeit.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbständig angefertigt habe und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, 20.06.2006

## Abstract

The biosurfactant surfactin is produced by *Bacillus subtilis* which has high biotechnological and therapeutical significance. To understand its biological action we investigated the influence of surfactin on the phase transition of 1,2-dimyristoyl-3-phosphatidylcholine (DMPC)- and 1,2-dipalmitoyl-3-phosphatidylcholine (DPPC)-vesicles from the crystalline to the fluid state using various techniques such as differential scanning calorimetry, static light scattering, cryo-electron microscopy and small angle neutron scattering. With these techniques for both phospholipids three different forms of aggregations were obtained. DSC-thermograms revealed two phase transition peaks. Light scattering profiles showed two branches with characteristic hysteresis phenomena. Cryo-electron microscopy visualize the results of these methods which show two forms of DMPC-surfactin aggregates. Until 4 mol% surfactin the vesicular form predominated which converted into the lamellar aggregates at higher concentration of surfactin. At surfactin concentration higher than 15 mol% irreversible transition of the lamellar aggregates to smaller ellipsoidal DMPC-surfactin-micelles started, as was investigated by small angle neutron scattering. In addition, by using Poor-Man's Temperature-Jump-relaxation-spectroscopy measurements slow transients in the phase transition of vesicular DMPC-surfactin aggregates with relaxation times of 18 – 30 s were detected. This slow relaxation processes could be attributed to the dissolution of the intermediate lipid to the fluid state. Surfactin accelerates this process.

## Kurzfassung

Das Biotensid Surfactin stammt aus dem *Bacillus subtilis*. Es besitzt hohe biotechnologische und therapeutische Bedeutung. Um seine biologische Wirksamkeit zu verstehen, wurde der Einfluss von Surfactin auf L- $\alpha$ -Dimyristoyl-3-phosphatidylcholin (DMPC)- und L- $\alpha$ -Dipalmitoyl-3-phosphatidylcholin (DPPC)-Vesikel im Bereich der Phasenumwandlung von der kristallinen Phase in die fluide Phase mit Hilfe der Differential-Scanning-Kalorimetrie (DSC), der statischen Lichtstreuung, der Kryoelektronenmikroskopie und der Neutronenkleinwinkelstreuung untersucht. Mit Hilfe dieser Methoden wurden für beide Phospholipide insgesamt drei verschiedene Aggregationsformen ermittelt. Die DSC-Thermogramme weisen für beide Phospholipide zwei Peaks auf. Die Lichtstreuungsexperimente zeigen dem entsprechend zwei Hysterese-Effekte. Kryoelektronenmikroskopie-Aufnahmen veranschaulichen die Resultate dieser beiden Experimente. Sie zeigen zwei unterschiedliche DMPC-Surfactin-Aggregationsformen. Bis zu 4 Mol% Surfactin beobachtet man hauptsächlich vesikuläre Aggregate, die sich bei höheren Surfactin-Konzentrationen in lamellare Aggregate umwandeln. Bei einer Surfactin-Konzentration oberhalb von 15 Mol% kommt es zu einer irreversiblen Umwandlung der lamellaren Aggregate unter Bildung von kleinen ellipsoiden DMPC/Surfactin-Mischmicellen, die durch Neutronenkleinwinkelstreuung ermittelt wurden. Mit Hilfe der Relaxationsspektroskopie-Methode (Poo-Man's-Temperatursprung) wurden die langsamen Konformationsänderungen bei der Hauptphasenumwandlung für vesikuläre DMPC-Surfactin-Aggregate im Zeitbereich von 18 – 30 s ermittelt. Diese langsamen Relaxationsprozesse beziehen sich sehr wahrscheinlich auf die Umwandlung der intermediären Lipide in den fluiden Zustand. Surfactin beschleunigt diese Prozesse.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	1
<b>1 Einleitung</b>	
1.1 Biologische Membranen	2
1.2 Phospholipide	4
1.3 Surfactin.	12
<b>2 Materialien und Präparationen</b>	
2.1 Materialien	16
2.2 Isolierung von Surfactin	17
2.3 Präparation der Vesikeln	18
<b>3 Methoden und Experimentelles</b>	
3.1 Differential-Scanning-Kalorimetrie (DSC)	19
3.1.1 Durchführung der DSC-Experimente	21
3.1.2 Auswertung	22
3.2 Statische Lichtstreuung nach Rayleigh	23
3.2.1 Durchführung der Licht-Streuungs-Experimente	25
3.2.2 Auswertung	25
3.3 Kryoelektronenmikroskopie	26
3.4 Neutronenkleinwinkelstreuung (SANS)	27
3.4.1 Durchführung der SANS-Experimente	27
3.4.2 Auswertung	27
3.5 Relaxationsspektroskopie	
Poor Man`s Temperature-Jump (PT-Jump)	28
3.5.1 Durchführung der Temperatur-Sprung-Experimente	30
3.5.2 Auswertung	31

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	
4.1	Wechselwirkung des Lipopeptides Surfactin mit DMPC-Vesikeln	
4.1.1	Differential-Scanning-Kalorimetrie (DSC)	32
4.1.2	Statische Lichtstreuung nach Rayleigh	38
4.1.3	Kryoelektronenmikroskopie	46
4.1.4	Neutronenkleinwinkelstreuung (SANS)	52
4.1.5	Poor Man`s Temperature-Jump (PT-Jump)	53
4.2	Wechselwirkung des Lipopeptides Surfactin mit DPPC-Vesikeln	
4.2.1	Differential-Scanning-Kalorimetrie (DSC)	58
4.2.2	Statische Lichtstreuung	64
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>71</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Anhang :</b>	
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>92</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>95</b>
<b>11</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>96</b>

## **Zielsetzung der Arbeit**

Die Anwendungen von Lipopeptiden haben in der letzten Zeit an Bedeutung zugenommen. Einige Bakterien aus der Gattung "Bacillus" produzieren biologisch aktive Peptide. Diese werden in der Industrie, in der Biotechnologie und für therapeutische Zwecke eingesetzt. Für diese Arbeit wurde das Lipopeptid Surfactin verwendet, das aus sporenbildendem *Bacillus subtilis* isoliert wurde. Durch umfangreiche Forschungsarbeiten wurde die antivirale, antimikrobielle und antitumorale Wirksamkeit von Surfactin nachgewiesen. Surfactin inhibiert vor allem grampositive Bakterien.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Surfactin und Lipid-Membranen (DMPC bzw. DPPC-Vesikel) mit Hilfe thermodynamischer und kinetischer Verfahren. Lipide sind neben den Proteinen Hauptbestandteile der Membranen, die Zellen und subzellulären Elementen kompartimentieren.

Durch thermodynamische Messungen soll der Einfluss von Surfactin auf die thermotropischen Eigenschaften der Lipide in Modell-Membranen untersucht werden. Der Einfluss von Surfactin auf die strukturellen Eigenschaften der DMPC- und DPPC-Vesikel im Bereich der Phasenumwandlung soll mit Hilfe von Lichtstreuungsmessungen ermittelt werden, wobei die Umwandlung der Lipiddoppelschichten von der kristallinen Phase in die fluide Phase beobachtet wird. Mit Hilfe der Kryoelektronenmikroskopie und der Neutronenkleinwinkelstreuung sollen Informationen über Größe und Gestalt der Vesikel vor und nach der Wechselwirkung mit Surfactin gewonnen werden. Die Temperatursprung-Methode wird angewendet, um langsame Konformationsänderungen bei der Hauptphasenumwandlung von DMPC-Vesikeln und die Wechselwirkung mit Surfactin zu untersuchen.



## 1 Einleitung

### 1.1 Biologische Membranen

Biologische Membranen bestehen hauptsächlich aus Lipiden und Proteinen. Daneben enthalten sie auch einen kleinen Anteil an Kohlenhydraten und zwar in Form von Glycolipiden und Glycoproteinen. Glycolipide und Glycoproteine enthalten Polyzucker, die an Lipide oder Proteine gebunden sind. Die relativen Anteile von Proteinen und Lipiden sind unterschiedlich und hängen von der biologischen Aufgabe der Membranen ab. Im Durchschnitt liegt der Lipidgehalt bei ca. 40 Gew.% und der Proteingehalt bei ca. 60 Gew.% [87]. Biologische Doppelmembranen bilden Schichten von 5 – 8 nm Dicke. Sie trennen den Zellinhalt von dem äußeren Milieu ab und regeln den Austausch von Molekülen durch diese Grenzschicht. Membranen spielen bei der biologischen Energiespeicherung und der Kommunikation zwischen den Zellen eine zentrale Rolle. Membranen sind widerstandsfähig und flexibel, selbstdichtend und undurchlässig für die meisten polaren oder geladenen, gelösten Stoffe, aber durchlässig für unpolare Verbindungen. Die Struktur der biologischen Membranen, das "Fluid-Mosaik-Modell", wurde durch Kombination der Ergebnisse von Elektronenmikroskopie, von Untersuchungen der Membranpermeabilität sowie der Bewegung einzelner Protein- und Lipidmoleküle innerhalb von Membranen erhalten (s. Abb. 1) [54].

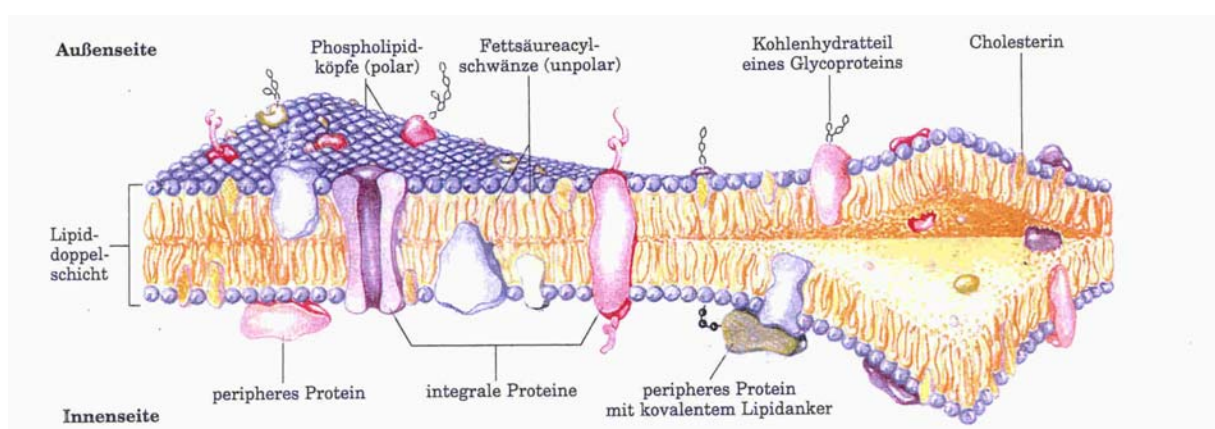


Abb.1: Das Fluid-Mosaik-Modell einer biologischen Membran von S.J. Singer und G.C. Nicholson (nach Lehninger 1994) [54].

Phospholipide und Steroide bilden eine Lipiddoppelschicht, wobei sich die unpolaren Fettsäureketten im Inneren der Doppelschicht gegenüberliegen und die polaren Kopfgruppen nach außen gerichtet sind. Membranproteine sind in diese Lipiddoppelschicht eingebettet, während sich Zuckerreste an der Membranoberfläche befinden (s. Abb. 1).

Die einfachsten Modellsysteme biologischer Membranen bestehen aus nur einer Lipidkomponente. Lipid-Wasser-Suspensionen können bei Wasserüberschuß mit geeigneten Präparationsmethoden zur Herstellung von geschlossenen, kugelförmigen Vesikeln benutzt werden (s. Kapitel 2.3).

## 1.2 Phospholipide

Lipiddoppelschichten sind für den Aufbau von biologischen Membranen als Gerüstsubstanz sehr wichtig. Sie gehören zu den Hauptbestandteilen von Zellen und verhindern den Durchtritt von polaren Molekülen und Ionen. Sie bestehen vorwiegend aus Phospholipiden (z.B. Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin), Glycolipiden und Cholesterin. Cholesterin ist in den meisten Membranen eukaryotischer Zellen zu finden, es verringert die Wechselwirkung zwischen den Fettsäure-Resten der Phospholipide und begünstigt damit den fluiden Charakter der Membran. Die amphiphatischen Lipide bestehen aus hydrophilen Kopfgruppen und hydrophoben Fettsäureketten. Oberhalb einer bestimmten Konzentration, der sogenannten kritischen Aggregationskonzentration, bilden die Monomere molekulare Aggregate. Je kleiner die kritische Aggregationskonzentration ist, desto größer ist die Tendenz zur Aggregation. Die geometrischen Packungsfaktoren der Lipide sowie die Ladung der Kopfgruppe bestimmen die Gestalt des Aggregats. Der kritische Packungsparameter CPP kann mit Hilfe der folgenden Gleichung beschrieben werden [87]:

$$(1-1) \quad \text{CPP} = \frac{V}{A \times L}$$

V = Volumen der hydrophoben Ketten

L = Kettenlänge

A = Fläche der Kopfgruppe, die vom pH-Wert, der Ionenstärke und der Temperatur abhängt.

Es können sich drei Typen von Lipidaggregaten bilden (s. Abb. 2). Der erste Typ entspricht Kugel-Micellen bzw. inversen Micellen mit kugelförmigen Strukturen. Die hydrophoben Ketten der Kugel-Micellen lagern sich im Inneren zusammen, wobei ihre Kopfgruppen außen liegen und Kontakt mit dem Wasser haben. Dagegen lagern sich die Kopfgruppen der inversen Micellen im Inneren zusammen, während ihre hydrophoben Ketten außen liegen. Bei dem zweiten Typ von Lipidaggregaten in wässriger Lösung handelt es sich um Doppelschichten (Bilayer), bei denen sich zwei Monolayer zu einer Schicht von 4 bis 5 nm Dicke zusammenlagern [12].

Die hydrophoben Anteile lagern sich unter Ausschluss von Wasser aneinander. Die hydrophilen Kopfgruppen an den beiden Oberflächen der Doppelschicht haben Kontakt zu dem wässrigen Medium. Der dritte Typ bildet eine Hohlkugel, die als Liposom oder Vesikel bezeichnet wird. Diese Vesikel ähneln einfachen Zellen. Ihr Durchmesser beträgt etwa 30 – 100 nm bei einer Wanddicke von ungefähr 5 – 6 nm [32].


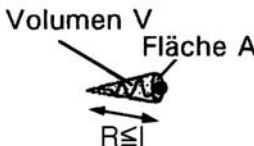


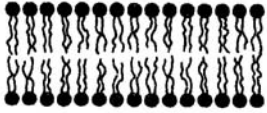

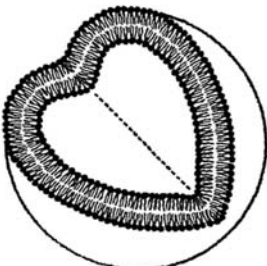
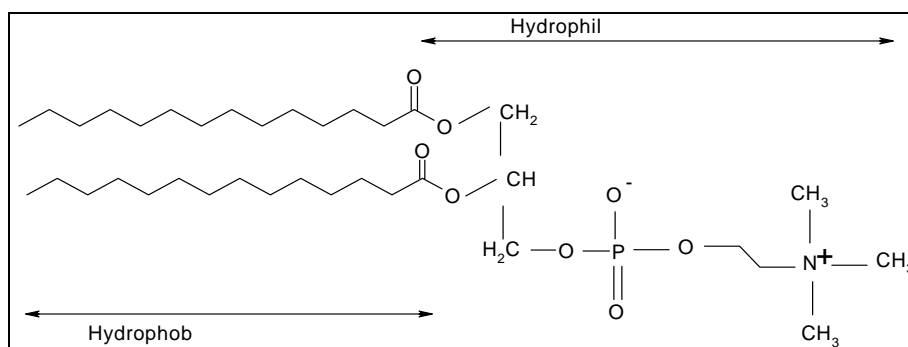
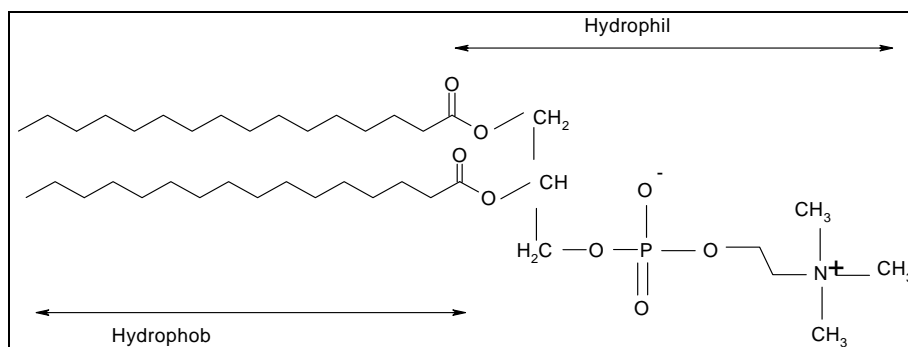
Struktur	Größe	Platzbedarf	CPP	Beispiel
<p>Kugelmicelle (hydrophile Umgebung)</p> 	~ 3 nm	<p>Kegel</p> <p>Volumen V Fläche A</p>  <p><math>R \leq l</math></p>	$< \frac{1}{3}$	SDS
<p>Inverse Micelle (hydrophobe Umgebung)</p> 	~ 3 nm	<p>Kegelstumpf</p>  <p><math>R \approx l</math></p>	$> 1$	Ungesättigte Phosphatidylethanolamine
<p>Doppelschicht (hydrophile Umgebung)</p> 		<p>Zylinder</p>  <p><math>R \approx l</math></p>	$\frac{1}{2}$ bis 1	Phosphatidylcholine
<p>Unilamellare Vesikel</p> 	> 30 nm			

Abb. 2: Struktur von Lipidaggregaten und ihr kritischer Packungsparameter CPP (V, Volumenbedarf der hydrophoben Ketten; l: Kettenlänge; A: Flächenbedarf der Kopfgruppe; R: Radius) nach R. Winter und F. Noll [87].

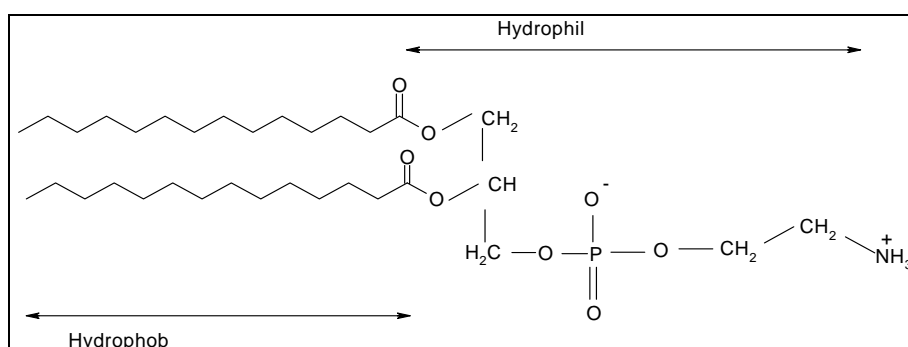
Phospholipide sind chemisch betrachtet Phosphodiester, bei denen die Phosphorsäure mit Cholin, Ethanolamin, Serin, Inosit oder Glycerin verestert sein kann (s. Abb. 3). Die Kopfgruppen Cholin, Ethanolamin und Serin enthalten basischen Stickstoff, der im physiologischen pH-Bereich eine positive Ladung trägt. Die Phosphat-Gruppe ist negativ geladen, daher sind die Phosphatide Zwitterionen. Die Fettsäurebausteine bestehen aus einer Estergruppe und einer langen unpolaren Kohlenwasserstoffkette (s. Abb. 3).



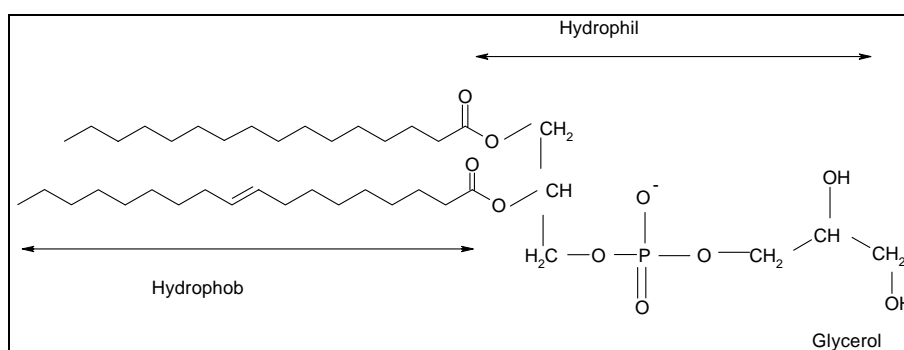
a) 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin (DMPC)



b) 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin (DPPC)



c) 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylethanolamin



d) 1-Palmitoyl-2-Elaidoyl-sn-Glycero-3-Phosphatidylglycerol

Abb.3: Strukturformeln von Phospholipiden.

Die Fluidität der Lipidmembranen hängt von der chemischen Zusammensetzung der Lipide, von Temperatur und Druck ab. Unterhalb der kritischen Temperatur sind die Membranen durch eine kristalline Anordnung ( $L_{\beta}$ -Phase) ihrer Kohlenwasserstoffketten charakterisiert, bei der die Bewegung der Lipidketten stark eingeschränkt ist. In der  $L_{\beta}$ -Phase liegen die Kohlenwasserstoffketten hauptsächlich gestreckt in all-trans-Konformation vor und sind in einem hexagonalen Gitter angeordnet. Oberhalb der kritischen Temperatur liegen die Kohlenwasserstoffketten dann im fluiden Zustand ( $L_{\alpha}$ -Phase) vor. Die Struktur der Kopfgruppen wird ungeordnet und die Lipide besitzen eine hohe laterale Beweglichkeit, die auf die Bildung von gauche-Isomeren der Ketten zurückzuführen ist. Dieser Zustand ist für die Erhaltung der optimalen physiologischen Funktion sehr wichtig. Die Lipide können leichter um ihre Längsachse rotieren. Ferner können laterale Positionswechsel erfolgen. Der laterale Diffusionskoeffizient der Lipidmoleküle beträgt in wässriger Lösung  $10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  [20, 48]. Ein Lipidmolekül kann von der einen zur anderen Seite der Membran umklappen (Flip-Flop-Prozess). Diese transversale Diffusion hat im allgemeinen eine um den Faktor  $10^9$  längere Halbwertszeit gegenüber der lateralen Diffusion [87]. Durch Bildung von mehreren Rotationsisomeren in den Kohlenwasserstoffketten, ist die Dicke der Lipiddoppelschicht in der  $L_{\alpha}$ -Phase (fluid) geringer als in der  $L_{\beta}$ -Phase (kristallin) [4]. Die meisten natürlichen Membranen enthalten ein Lipidgemisch, weshalb keine scharfe Phasenumwandlung innerhalb eines kleinen Temperaturintervalls wie bei der Membranen mit nur einer Lipidsorte beobachtet werden kann. Die Phasenübergangstemperatur  $T_m$  von Lipidmembranen ist von

verschiedenen Faktoren abhängig:

1. von der Länge der Fettsäurenketten. je länger die Fettsäurenketten sind, desto höher ist  $T_m$ .
2. vom Sättigungsgrad der Fettsäurenketten. Je höher der Anteil an gesättigten Fettsäuren ist, desto höher ist  $T_m$ .
3. von der Position der Doppelbindung in Fettsäurenketten.  $T_m$  ist am niedrigsten, wenn die Position der Doppelbindung in der Mitte der Fettsäurenketten liegt.
4. von der Kopfgruppe der Phospholipide.

Im Vergleich zu anderen Phospholipidkopfgruppen zeigen Membranen aus Phosphatidylethanolamin die höchste bzw. aus Phosphatidylglycerol die niedrigste Umwandlungstemperatur (TPE > TPS > TPC > TPG) (s. Tab.1) [48,71].

Fettsäurenketten	Kopfgruppen in 3. Position	$T_m$ (°C)
C13:0	PC	13,5
C14:0	PG	23
C14:0	PC	24
C14:0	PE	50
C15:0	PC	34
C16:0	PG	41
C16:0	PC	41
C16:0	PE	64
C18:0	PC	55
C18:1 (2 cis)	PC	41
C18:1 (4 cis)	PC	23
C18:1 (9 trans)	PC	5

Tabelle 1: Phasenübergangstemperatur  $T_m$  der verschiedenen Lipidmembranen.

Die Phasenumwandlung kristallin – fluid kann als Schmelzvorgang der Kohlenwasserstoffketten verstanden werden. Während der Phasenumwandlung wird Wärme aufgenommen. Bei der Hauptumwandlung wird die hexagonale Anordnung der Kopfgruppen gebrochen und die Fettsäureketten verlieren ihre all-trans-Konformation und wandeln sich zu cis-trans Rotationsisomeren um (s. Abb. 4) [36], wobei die lamellare Struktur der Aggregate erhalten bleibt. Im Gegensatz dazu sind Micellen unterhalb der Schmelztemperatur der Kohlenwasserstoffketten nicht stabil.

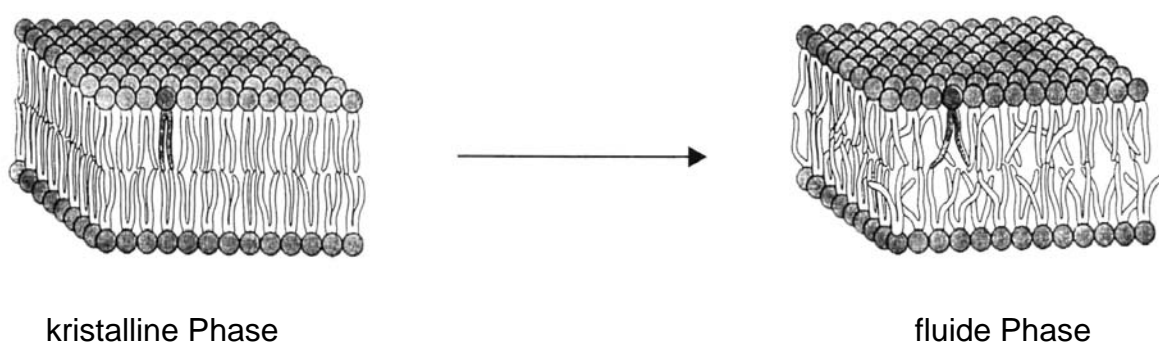


Abb. 4: Endotherme Phasenumwandlung einer Lipidmembran.

Die Arbeiten von Holzwarth et al. mit dem Iod-Laser-Temperatursprung-Verfahren verdeutlichen diese Hauptumwandlung. Sie zeigen 6 zeitlich aufeinanderfolgende Prozesse bei der Strukturänderung der Doppelschicht der Membran (s. Abb. 5). Zwei sehr schnelle Relaxationsprozesse ( $1 \rightarrow 2$  und  $2 \rightarrow 3$ ) in einem Zeitbereich von Nanosekunden wurden die Veränderung der Einzel-Moleküle zugeordnet. In dem Relaxationsprozess ( $1 \rightarrow 2$ ) beginnt die Bildung von Rotationsisomeren der Fettsäurenketten aus ihrer all-trans-Konformation. Die hexagonale Anordnung der Kopfgruppen der Lipide wird dabei geschwächt ( $2 \rightarrow 3$ ). Die Lipidmoleküle in den Membranen gewinnen eine laterale Beweglichkeit, die unter Bildung von noch komplexeren Rotationsisomeren führt ( $3 \rightarrow 4$ ). Die zwei letzten langsamere Relaxationsprozesse zeigen die Existenz von Domänen mit verschiedener Ordnung in der Phasenumwandlungsregion. Es kommt zur Bildung von Lipid-Clustern. Es liegen all-trans-Isomere, intermediäre Lipide sowie fluide Lipide ( $4 \rightarrow 5$ ) nebeneinander vor. Danach nehmen die fluiden Lipide zu, gleichzeitig nimmt die Anzahl der Lipid-Cluster ab ( $5 \rightarrow 6$ ). Der letzte Schritt (6) umfasst deren völlige Auflösung. Die Membran befinden sich nun in den fluiden Zustand (7) [27,29,30,33].



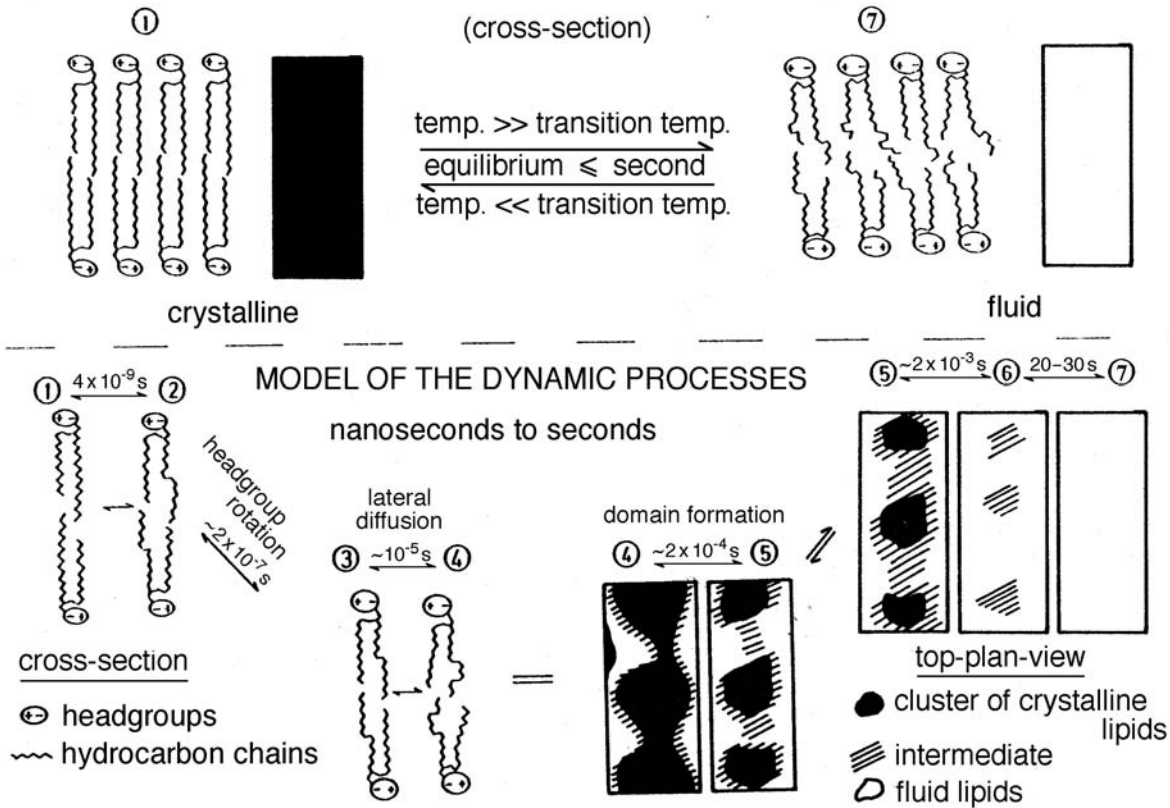


Abb. 5: Modell der Hauptphasenumwandlung der unilamellaren Vesikel nach Groll et al. [33].

Bei DPPC und DMPC wurden mehrere Übergänge beobachtet, ein Sub-, ein Vor- und ein Hauptübergang (s. Abb. 6) [60,75,76]. Bis zu einem Wassergehalt von etwa 30 Gew.% bildet DPPC lamellare Phasen. Oberhalb von 30 Gew.% bildet DPPC mehrschalige Vesikel (Liposomen). Unilamellare Vesikel sind nur in sehr verdünnten Lösungen stabil, wie in Abbildung 6 gezeigt wird [36]. In dieser Arbeit wird nur auf die Hauptphasenumwandlung der unilamellaren Vesikel eingegangen, da an kleinen einschaligen Vesikeln nur dieser deutlich auftritt.

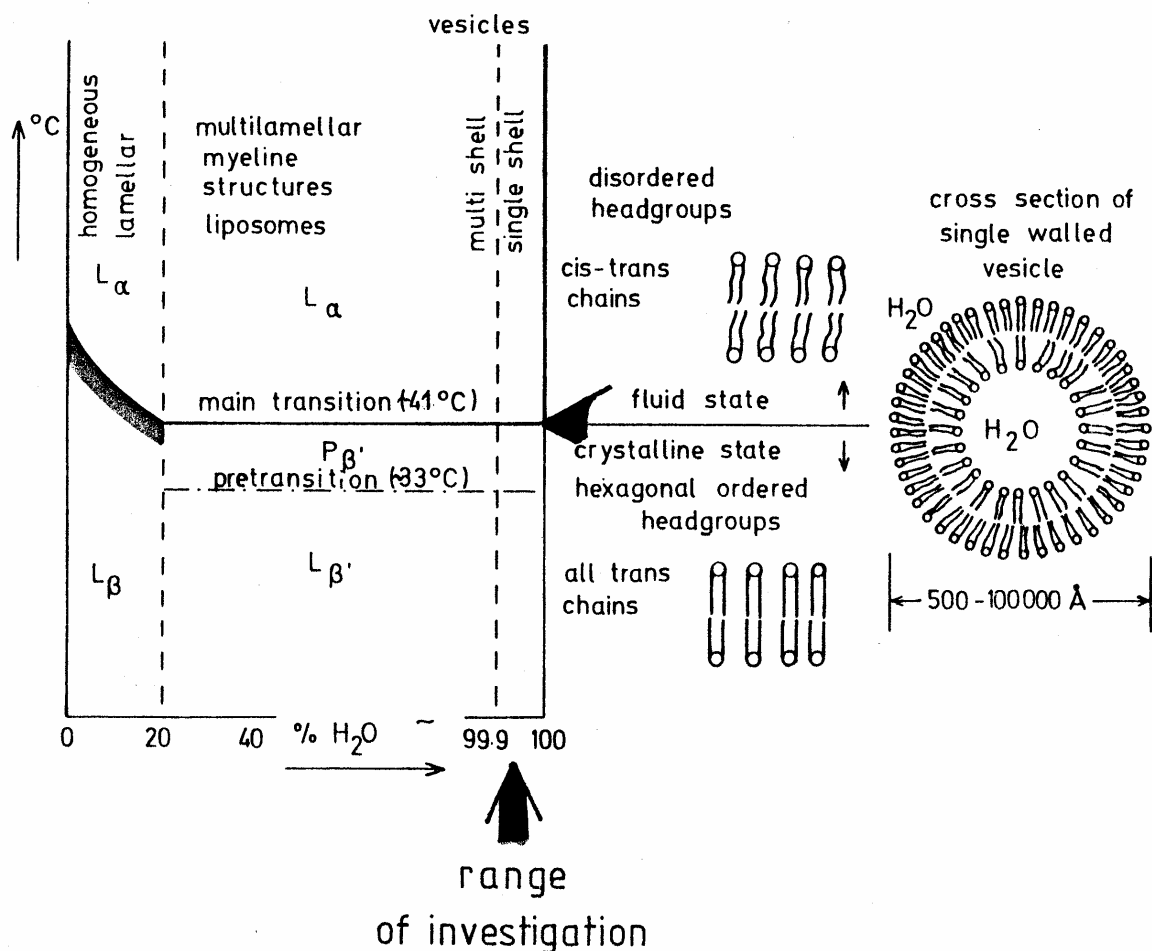


Abb. 6: Phasendiagramm von Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) nach Holzwarth et al. [36].

### 1.3 Surfactin

Mikroorganismen sind in der Natur weit verbreitet und kommen im Boden, im Wasser und in der Luft vor. Sie haben sowohl schädliche Wirkungen als auch nützliche Funktionen. Ihre Stoffwechselprodukte werden in der Industrie, in der Biotechnologie und für therapeutische Zwecke nutzbar gemacht. Industriell werden Antibiotika, Vitamine, Enzyme, organische Säuren und Lösungsmittel hergestellt.

Einige Bakterien aus der Gattung "Bacillus" produzieren Lipopeptide, die eine hohe therapeutische und biotechnologische Bedeutung haben [62,90]. Das antimikrobielle, antivirale und antitumorale Verhalten von Surfactin wurde durch zahlreiche Forschungsarbeiten nachgewiesen [43,50]. Die Arbeiten von Vater et al. zeigten, dass das Lipopeptid Surfactin membranumhüllte Viren, wie Herpes- und Retroviren inaktiviert. Bei höherer Konzentration wird die Lipoprotein-Hüllmembranen bzw. das Kapsid zerstört. Weiterhin wurde die Wirksamkeit von Surfactin auf Mykoplasmen in Zellkulturen untersucht. Im Gegensatz zu zahlreichen herkömmlichen Antibiotika wird das Wachstum von Mykoplasmen von Surfactin stark gehemmt. Durch einmalige Behandlung mit Surfactin können in Zellkulturen alle vitalen Mykoplasmen vollständig entfernt werden [81,85,86]. Durch seine Fähigkeiten, Kanäle und Poren in einer Lipid-Membran zu bilden, kann Surfactin in die Zellwände von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien eindringen und diese zerstören [59]. Lipopeptide besitzen stark oberflächenaktive und emulgierende Eigenschaften. Sie werden daher in verschiedenen Bereichen der Industrie eingesetzt. Anwendungsgebiete bestehen vor allem in der Lebensmitteltechnologie- sowie der kosmetischen und der chemischen Industrie. Dort können Lipopeptide zur Erhöhung der Erdölgewinnung, zur Reduzierung der Rohölviskosität für den Öltransport, zur Reinigung der Ölbehälter und zur Beseitigung von Ölverschmutzungen eingesetzt [6,14,18,19,31,44,45,46]. Die Verwendung von Surfactin für die Trennung von kontaminierten Böden und Sedimenten von toxischen Schwermetallen zeigte hervorragende Ergebnisse [65,66,91]. Da Lipopeptide stabil gegenüber hohen Salz-Konzentrationen sind, können sie im maritimen Bereich zur Bildung von Emulsionen zwischen Öl und Wasser verwendet werden. Obwohl diese Peptide mehrere Vorteile im Vergleich zu anderen oberflächenaktiven Substanzen besitzen, wie zum Beispiel geringere

Toxizität, höhere Selektivität und spezifische Aktivität sowie Stabilität gegenüber extremen Temperatur- und pH-Änderungen, ist ihre Verwendung in der Industrie aufgrund des hohen wirtschaftlichen und technischen Aufwands bei ihrer Herstellung bisher sehr begrenzt [31,44,52,70,83,89].

Für diese Arbeit wurde das Lipopeptid Surfactin aus dem gentechnisch hergestellten *Bacillus subtilis* Stamm OKB105 verwendet [53,84,90]. Seine Struktur besteht aus einer Heptapeptid-Kopfgruppe mit einer Größe von  $1,5 \times 1,0 \text{ nm}^2$  und einer hydrophoben  $\beta$ -Hydroxy-Fettsäure mit einer Länge von  $1,5 \text{ nm}$  [2,39,40,42]. Der Peptidteil mit der Sequenz L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu ist mit der  $\beta$ -Hydroxy-Fettsäure über eine Lactonbindung zu einem Ringsystem geschlossen (s. Abb. 7a). Der Lactonring kann in alkalischem Milieu geöffnet und in eine Linearform überführt werden [41,47,68,70]. Surfactin liegt als Mischung verschiedener Isoformen mit Fettsäurekomponenten, deren Kettenlänge zwischen 13 bis 15 C-Atome variiert, vor. Die Verteilung dieser Isoformen bei dem in dieser Arbeit verwendeten Surfactin beträgt 29%  $\text{C}_{13}$ , 38%  $\text{C}_{14}$  und 33%  $\text{C}_{15}$  (s. Abb. 7b). Seine Zusammensetzung hängt vom Kulturmedium und dem jeweiligen *Bacillus subtilis* Stamm ab [5,35].

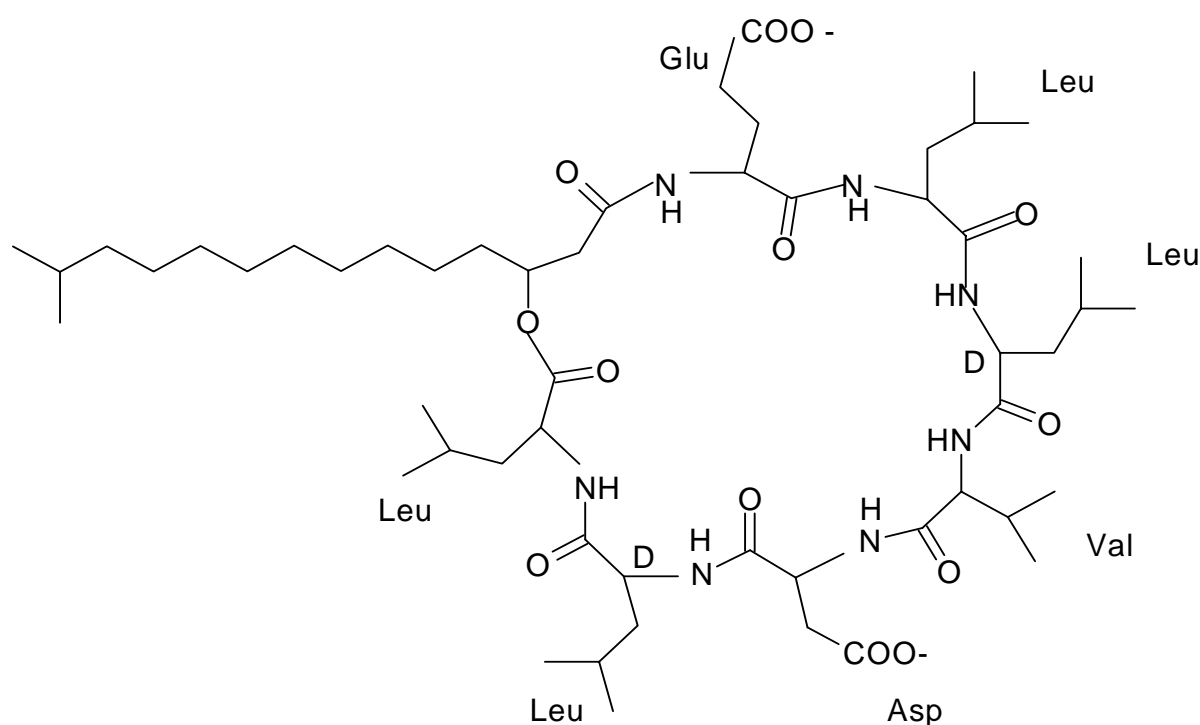


Abb. 7a: Struktur von Surfactin.

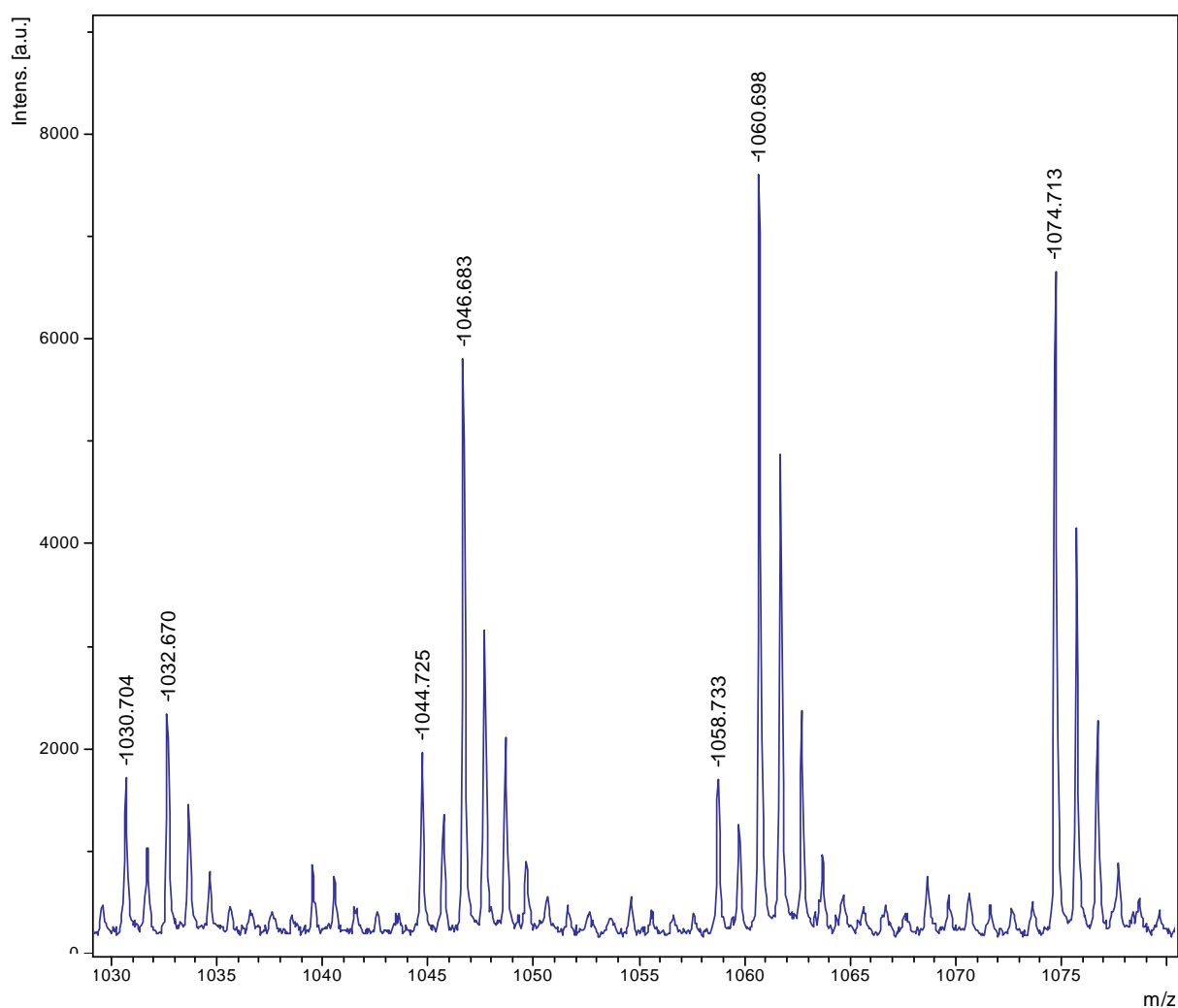


Abb. 7b: MALDI-TOF-Massenspektrum von Surfactin.

Surfactin kommt außerdem in der Natur als Gemisch von Strukturisomeren vor, deren Aminosäure - Kompositionen variieren. Z.B. findet man in Position 7 zwischen 70 bis 80% L-Leucin. In den restlichen 20 bis 30% kann L-Leucin durch L-Valin und / oder L-Isoleucin ersetzt werden [5,72,82]. In anderen isomeren Verbindungen ist an der Position 4 L-Valin durch Isoleucin, Leucin oder Alanin substituiert [24,73]. Surfactin bildet in wässriger Lösung leicht Micellen. In einer Lösung von 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$  bei pH 8,7 bilden sich langgestreckte Stabmicellen mit einer Aggregationszahl  $n$  von 173. Die kritische Micellbildungskonzentration (CMC) beträgt  $9,4 \times 10^{-6}$  M. Bei dieser Konzentration beobachtet man eine Oberflächenspannung von Wasser  $\gamma_{\text{cmc}}$  von  $30 \text{ mN m}^{-1}$  [38]. Durch die Kombination von zwei sauren Aminosäuren, Glutaminsäure und Asparaginsäure, mit fünf hydrophoben Aminosäureresten

(Leucin, Valin und Isoleucin) und einer langen hydrophoben Fettsäurekomponente besitzt das Lipopeptid Surfactin ausgeprägte oberflächen- bzw. membran-aktive Eigenschaften. Surfactin-Micellen zeigen bei verschiedenen pH-Werten unterschiedliche biologische Aktivität, Form und Größe (s. Tab. 2) [47,63].

<b>pH</b>	<b>Form der Surfactin-Micellen</b>	<b>Größe</b>
7	Kugelform	Durchmesser 5 – 9 nm
	Ellipsenform	Länge 19 nm, Breite 11 nm
9,5	Rundform	Durchmesser 10 – 20 nm
	Zylinderform	Länge 40 – 160 nm, Breite 10 – 14 nm
12	Rundform	Durchmesser 8 nm
	Ellipsenform	Länge 9 nm, Breite 6 nm

Tabelle 2: Einfluss des pH-Wertes auf Form und Größe von Surfactin-Micellen.

## 2 Materialien und Präparationen

### 2.1 Materialien

Materialien zur Präparation von Vesikeln:	L- $\alpha$ - Phosphatidylcholin, Dimyristoyl (DMPC), Fa. Sigma-Aldrich. L- $\alpha$ - Phosphatidylcholin, Dipalmitoyl (DPPC), Fa. Sigma-Aldrich.
Trennungsmaterialien:	Dialyseschläuche ( M.W. 12.400, Fa. Sigma- Aldrich ) mit einer Porenweite von 2,4 nm  Sephadex LH 20 ( Pharmacia/LKB, Freiburg ) wird zur Reinigung von Surfactin verwendet.  Dünnschichtchromatographie-Fertigplatten Kieselgel 60 ( Fa. Merck, Darmstadt ) für die qualitative Analyse von Surfactin
Puffersubstanzen:	Tricine Sigma Ultra ( Fa. Sigma-Aldrich )
Chemikalien:	Natriumchlorid, Natriumcarbonat, Ethanol p.a. Natriumhydroxid, Natriumazid, EDTA (Fa. Merck); Methanol (spectrophotometric grade, Fa. Aldrich)
Enzymatischer Test:	Ethanol-Reagenzien, NAD-ADH (Fa.Sigma-Aldrich), dienen zur quantitativen enzymatischen Bestimmung von Ethanol .
Chemikalien zur Anzucht der Zellen:	L-Glutaminsäure, Agar-agar, D(+)-Glucose (Fa. Merck); Hefeextrakt (Oxoid)

## 2.2 Isolierung von Surfactin

Für diese Arbeit wurde das von *Bacillus subtilis* OKB 105 produzierte zyklische Lipoheptapeptid Surfactin verwendet [67]. Dieser Stamm wurde in einem modifizierten Landy-Medium kultiviert [53,81]. Mit daraus gewonnenen Sporen wurde eine Vorkultur mit Landy-Medium angeimpft und bei 28 °C 16 h mit 200 U/min in einem Schüttler (New Brunswick) inkubiert. Danach wurden 10 ml Vorkultur zu 500 ml Hauptkultur mit Landy-Medium hinzugefügt.

Diese wurde nach 27 h Fermentation filtriert und das Filtrat mit konzentrierter HCl auf pH 2 eingestellt. Bei diesem pH-Wert fällt das Surfactin-Gemisch aus.

Der HCl-Niederschlag wurde in Methanol gelöst, mit NaOH neutralisiert, der methanolische Extrakt in einem Rotationsverdampfer eingeeengt und anschließend durch Gelpermeationschromatographie an Sephadex LH-20 mit Methanol als mobiler Phase getrennt und gereinigt [5,49].

Für die gesamten Messungen, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, wurden jeweils dieselbe Stammlösung von Surfactin verwendet. Dazu wurde Surfactin in einer Konzentration von 10 mM in Methanol (spectrophotometric grade, Fa. Aldrich) gelöst. Seine Konzentration wurde für die Experimente zwischen 0,025 und 0,750 mM entsprechend 1 – 30 Mol% variiert.

Als qualitativer Nachweis von Surfactin diente ein Dünnschichtchromatographie-Test. Dafür wurden DC-60 Kieselgel-Platten verwendet. 20 µl methanolische Surfactin-Stammlösung ([Surfactin] = 10 mM) wurden auf DC-Platten aufgetragen. Diese wurden anschließend in dem Laufmittel Chloroform / Methanol / Wasser (65:25:4, v/v/v) entwickelt. Die Entwicklung erfolgte mit einem H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Spühreagenz (5 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 100 ml Ethanol) bei 180 °C für 3 – 5 min [81].



### 2.3 Präparation der Vesikeln

Die Präparation der DMPC- und DPPC-Vesikel erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Ethanol-Einspritz-Methode [51]. Die Lipide wurden zuerst in einer Konzentration von 36 mM in Ethanol gelöst und danach langsam (50  $\mu$ l / min) mit einer Hamilton-Spritze in 10 ml thermostatisierten Tricine – Puffer (2,5 mM Tricine + 10 mM NaCl, pH 7,5) injiziert. Der hohe Wassergehalt führte zur Bildung von Vesikeln mit kugelförmigen, konzentrisch angeordneten Doppelschichten [27].

Während der Injektion wurde die Temperatur der Pufferlösung über der Phasenübergangstemperatur der Lipide gehalten. Für die Bildung von DMPC- bzw. DPPC-Vesikeln wurden Temperaturen von 28 °C bzw. 45 °C eingestellt.

Die Vesikel-Lösung wurde in Dialyseschläuche gefüllt, die vorher in alkalische-EDTA-Lösung gekocht, mit H<sub>2</sub>O neutralisiert und in Natriumazid-Lösung aufbewahrt wurden [9]. Die Lösung wurde anschließend 24 h gegen Tricine-Puffer oberhalb der Lipid-Phasenübergangstemperatur dialysiert. Hierbei wurde das Ethanol entfernt. Der quantitative Test auf Ethanol in der Vesikel-Lösung wurde mit Hilfe einer enzymatischen Bestimmung (NAD-ADH) bei 340 nm durchgeführt. Der Ethanolgehalt in der Vesikel-Lösung betrug nach der Dialyse 0,01% und wurde als vernachlässigbar betrachtet.

Die Vesikel-Lösung ist mehrere Tage stabil, wenn sie oberhalb der Phasenübergangstemperatur gelagert wird [36]. Für jede Messung wurde die Konzentration von DMPC- bzw. DPPC-Vesikeln auf 2,5 mM eingestellt. Die Surfactin-Vesikel-Lösungen wurden erst kurz vor der Durchführung der Experimente vorbereitet. Surfactin wurde in Konzentrationen zwischen 0,025 und 0,750 mM (1 – 30 Mol%) bei Temperaturen oberhalb der Phasenübergangstemperatur von Vesikeln zugegeben.

### 3 Methoden und Experimentelles

#### 3.1 Differential-Scanning-Kalorimetrie (DSC)

Die Differential-Scanning-Kalorimetrie (DSC) dient zur Bestimmung der Wärmekapazität einer wässrigen Probe als Funktion der Temperatur. Diese Methode wird vor allem angewendet, um die thermotropischen Eigenschaften der Lipide in Modell- und biologischen Membranen zu studieren. Dabei wird die Umwandlung der Lipiddoppelschichten von der kristallinen Phase in die fluide Phase beobachtet [64,79]. Für die vorliegende Arbeit wurde das DSC-Instrument "MC-2 Ultrasensitive Scanning Calorimeter" (MicroCal Inc., Northampton, USA) verwendet.

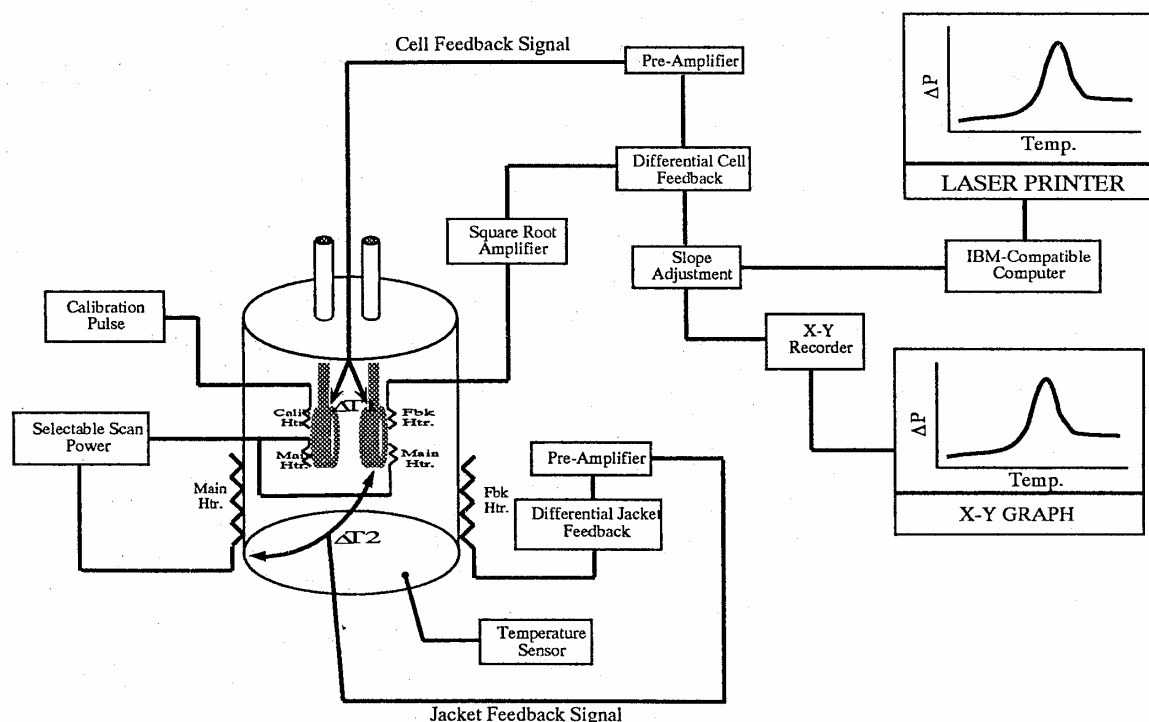


Abb. 7: DSC-Blockdiagramm.

Das Messsystem der DSC-Apparatur besteht aus zwei gleichartigen Messzellen mit je 1,2 ml Volumen, der Proben- und der Referenzzelle, die jeweils zwei Heizplatten enthalten (s. Abb. 7). Die Hauptheizquelle dient zur Kontrolle der Heizrate sowohl in den Zellen als auch im Mantel. Die beiden Zellen sind thermisch voneinander getrennt. Ihre Temperatur wird mit Temperaturmessfühlern gemessen.

Die Temperaturdifferenz zwischen dem adiabatischen Mantel und den Zellen wird mit einem Thermoelement gemessen (s. Abb. 7). Eine wesentliche Voraussetzung des Messsystems ist, dass adiabatische Bedingungen herrschen, wodurch Wärmeverluste an die Umgebung vermieden werden können. Das Messprinzip der DSC besteht darin, dass während der Messung die Temperaturen von Probe und Referenz gleich gehalten werden [34].

Die in dieser Arbeit angewandte Heizrate  $\alpha = 0,5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  wurde vor Messbeginn eingestellt. Probe- und Referenzzelle werden einzeln beheizt.

Die Temperaturdifferenz zwischen beiden Zellen wird mit einem empfindlichen Thermoelement gemessen. Die Temperaturdifferenz  $\Delta T$  zwischen Proben- und Referenzzelle soll Null sein. Die Temperatur des Systems beträgt zur Zeit  $t$ :

$$(3-1) \quad T = T_0 + \alpha \cdot t$$

Findet eine endotherme Phasenumwandlung in der Probe statt, wird die Heizleistung für die Probe erhöht, so dass sich die Temperaturen von Probe und Referenz trotz der ablaufenden Reaktion bei der vorgegebenen Heizrate nicht ändern. Die Temperaturdifferenz zwischen der Probe und der Referenz soll sich dabei Null annähern. Die Heizleistungsdifferenz  $\Delta P$  zwischen der Probe und der Referenz entspricht dann dem DSC-Messsignal:

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

In DSC-Thermogrammen wird  $\Delta P$  als Funktion der Temperatur  $T$  aufgetragen. Bei bekannter Heizrate lässt sich die Wärmekapazitätsdifferenz  $\Delta C_p$  bei konstantem Druck zwischen Probe und Referenz bestimmen:

$$(3-3) \quad \Delta C_p = \frac{\Delta P}{\alpha}$$

Bei bekannter Konzentration der Probe kann aus der Umwandlungskurve die molare Wärmekapazität  $\Delta C_m$  berechnet werden. Anhand des Kurvenverlaufs ("Peaks") wird

die Anfangs- und Endtemperatur des Überganges extrapoliert. Durch Integration der Fläche unter dem Peak ergibt sich die kalorimetrische Enthalpieänderung  $\Delta H_{\text{cal}}$  bei der Phasenumwandlung. Aus den Messsignalen kann man die Umwandlungstemperatur  $T_m$  und die Breite des Peaks  $\Delta T_{1/2}$  ermitteln. Für einen reversiblen Prozess berechnet man die Entropie-Änderung ( $\Delta S$ ) aus der experimentell ermittelten Umwandlungstemperatur  $T_m$  und der kalorimetrischen Enthalpieänderung  $\Delta H_{\text{cal}}$ :

$$(3-4) \quad \Delta S = \Delta H_{\text{cal}} / T_m$$

Die van't Hoff-Enthalpie  $\Delta H_{\text{vH}}$  für ein idealisiertes Zwei-Zustands-System ist:

$$(3-5) \quad \Delta H_{\text{vH}} = 4RT_m^2 / \Delta T_{1/2}$$

(molare Gaskonstante  $R = 8,314510 \text{ J} \cdot \text{Mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )

Die kooperative Einheit ( $N_o$  – Zahl der beteiligten Moleküle) unter diesen Bedingungen ist das Verhältnis der van't Hoff-Enthalpie zur kalorimetrischen Enthalpieänderung:

$$(3-6) \quad N_o = \Delta H_{\text{vH}} / \Delta H_{\text{cal}}$$

Die kooperative Einheit sagt etwas über den Zustand der Phasenumwandlung aus. Je schärfer die Phasenumwandlung, desto größer ist die kooperative Einheit.

### 3.1.1 Durchführung der DSC - Experimente

Der Einfluss von Surfactin auf die endotherme Phasenumwandlung der DMPC- und DPPC-Vesikel lässt sich mit Hilfe von DSC beobachten. Zu der Vesikel-Lösung wurden jeweils unterschiedliche Konzentrationen an Surfactin-Lösung bei einer Temperatur oberhalb der Phasenübergangstemperatur zugegeben. Die Konzentration von DMPC- bzw. DPPC-Vesikeln war konstant und betrug 2,5 mM.

Die Konzentration von Surfactin wurde zwischen 0,025 mM und 0,750 mM (1 – 30 Mol%) variiert (s. Kapitel 2.2). Für jedes DSC-Experiment wurden jeweils 1,5 ml der Vesikel-Surfactin Mischung in die Probenzelle und 1,5 ml Tricine Puffer in die Referenzzelle eingefüllt. Vor dem Start des Experiments wurde 30 min lang äquilibriert. Hierbei wurde die Temperatur mit einem Haake Thermostat F3-C kontrolliert. Es wurde ein steigender Temperatur-“scan“ mit einer Aufheizrate von 0,5 °C/min in einem Temperaturbereich von 8 – 50 °C für die DMPC-Surfactin-Lösung und von 20 – 60 °C für die DPPC-Surfactin-Lösung durchgeführt. Für jedes Konzentrations-Verhältnis wurden 3 – 4 Messungen durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Resultate zu bestätigen.

### 3.1.2 Auswertung der DSC- Kurven

Die Messsignale wurden unter Berücksichtigung der Konzentration an DMPC bzw. DPPC von 2,5 mM und des Probenvolumens von 1,225 ml ausgewertet. Das Ergebnis wurde von kcal/mol in kJ/mol umgerechnet. Aus dem Kurvenverlauf der “Peaks“ wurde die Anfangs- und Endtemperatur der Phasenumwandlungskurve extrapoliert und eine Basislinie erzeugt. Die Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{cal}$  wurde durch Integration der Fläche unter dem Peak ( $C_p$ -Kurve) bestimmt. Die beiden Peaks im Thermogramm für die DMPC-Vesikel wurden durch Gauss-Kurven angepasst. Aus diesen wurden die Umwandlungstemperatur  $T_m$  und die Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{cal}$  für die beiden Peaks bestimmt. Im Falle von DPPC-Vesikeln ließen sich diese Peaks bei einer Surfactin-Konzentration ab 20 Mol% (0,500 mM) praktisch nicht mehr mit Gauss-Funktionen anpassen, so dass die Auswertung hier nur auf Peak 1 beschränkt wurde.

### 3.2 Statische Lichtstreuung nach Rayleigh

Lichtstreuung liefert Informationen über die Größe und Gestalt von Molekülen sowie über Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen. Diese Methode wurde angewendet, um das Streuverhalten von DMPC- bzw. DPPC-Vesikeln und die Abhängigkeit der Messdaten von der Temperatur zu studieren. Bei der Phasenumwandlung der Vesikel erfolgt eine Volumenzunahme der Lipid-Doppelschicht. Dadurch verändert sich auch der Brechungsindex der Lösung [88]. Für Untersuchungen des Einflusses von Surfactin auf die strukturellen Eigenschaften der DMPC- und DPPC-Vesikel wurde die Theorie der Rayleigh-Streuung zugrunde gelegt, da die streuenden Teilchen klein sind im Vergleich zur Wellenlänge der einfallenden Strahlung. Die Wellenlänge der Strahlung ändert sich bei dieser Streuung nicht [27,28,29]. Die einfallende Strahlung mit der Intensität  $I_0$  wird von der Probe unter einem Winkel  $\alpha$  mit der Intensität  $I$  gestreut. Experimentell erhält man nur die Intensität der Streustrahlung. Die Streuintensität  $I$  hängt von der Beobachtungsrichtung ab. In unserem Experiment wurde der Raumwinkel konstant gehalten, wodurch Winkelabhängigkeiten vermieden wurden.

Die Lichtstreuungs-Experimente wurden mit Hilfe eines Shimadzu Spectrofluorophotometers RF-5000 durchgeführt. Als Lichtquelle diente der monochromatische Strahl einer 150 W Xenon-Lampe mit einer Wellenlänge von 300 nm. Das Streulicht wurde unter einem Winkel von  $90^\circ$  beobachtet. Die gestreute Strahlung wurde von einem Photomultiplier detektiert.

Der schematische Aufbau der Apparatur ist in Abbildung 8 dargestellt.

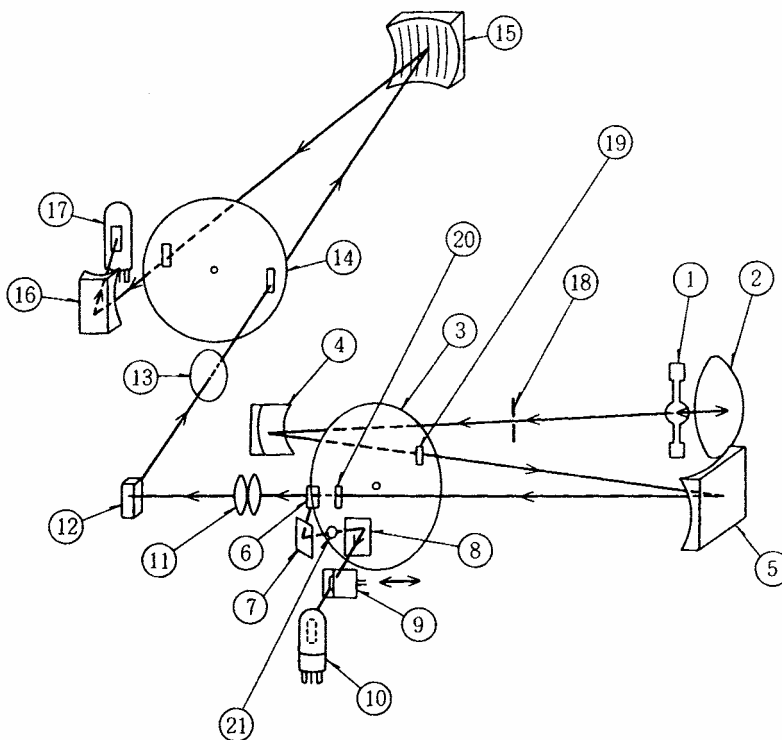


Abb. 8: Optisches System des Fluorimeters RF-5000.

- |    |                               |    |                               |
|----|-------------------------------|----|-------------------------------|
| 1  | Xenon Lampe, 150W             | 15 | Beugungsgitter (für Emission) |
| 2  | Elliptischer Kollimator       | 16 | Konkav-Spiegel                |
| 3  | Chopper (für Anregung)        | 17 | Photomultiplier, R452-01      |
| 4  | Konkav-Spiegel                | 18 | Fokus                         |
| 5  | Beugungsgitter (für Anregung) | 19 | Eingangsspalt                 |
| 6  | Strahlteiler                  | 20 | Ausgangsspalt                 |
| 7  | Teflon Reflektor No.1         | 21 | Ausgleich-Apertu              |
| 8  | Teflon Reflektor No.2         |    |                               |
| 9  | Optisches Dämpfungsglied      |    |                               |
| 10 | Photomultiplier, R212-09      |    |                               |
| 11 | Licht-Kollektor-Linsen        |    |                               |
| 12 | Zelle                         |    |                               |
| 13 | Licht-Sammel Linse            |    |                               |
| 14 | Chopper (für Emission)        |    |                               |

### 3.2.1 Durchführung der Licht-Streuungs-Experimente

Für die gesamten Messungen betrug die Konzentration von DMPC und DPPC-Vesikeln 2,5 mM. Der pH-Wert der Lösung lag bei 7,5. Surfactin wurde in Methanol gelöst und in Konzentrationen zwischen 0,025 mM und 0,750 mM (1 – 30 Mol%) in die Vesikel-Lösung bei einer Temperatur oberhalb des Phasenübergangs zugegeben (s. Kapitel 2.2). Die DMPC- bzw. DPPC-Vesikel mit Surfactin wurden in 10 x 10 mm Quarzküvetten (Fa. Hellma) gefüllt und 15 min temperiert. Anschließend erfolgte für jede Konzentration insgesamt 4 mal der Temperaturdurchlauf mit Start bei der höchsten Temperatur (zuerst fallender und danach steigender Temperaturdurchlauf) in einem Temperatur-Bereich von 15 bis 40 °C für die DMPC-Surfactin-Lösung und 29 bis 45 °C für die DPPC-Surfactin-Lösung. Zur Kontrolle der Temperaturänderungen von 0,2 °C/min wurde ein Haake-PG-Kontroller verwendet. Die Temperaturänderung der Probelösung wurde mit einem Haake-F3-C-Thermostat und Thermoelementen (Therm 2244-1, NTC Typ C, Ahborn Mess- und Regelungstechnik, Holzkirchen, Germany) je 5 min direkt in der Lösung kontrolliert. Die Streuungskurven wurden bei einer Wellenlänge von 300 nm, einem Streuwinkel von  $90^\circ \pm 20\%$  und einer Heizrate von 0,2 °C/min aufgenommen.

### 3.2.2 Auswertung der Licht-Streuungs-Experimente

Für die Streuungskurven der DMPC- bzw. DPPC-Vesikel wurde die gemessene Streuungsintensität als Funktion von der Temperatur aufgetragen. Zur Darstellung der Phasenumwandlungskurven wurde die Höhe der linear extrapolierten Streuungsintensität zwischen der fluiden und der kristallinen Phase gemessen. Die Phasenübergangstemperatur  $T_m$  in °C ergibt sich als Temperatur bei der Hälfte der gemessenen Streuungsintensitätshöhe.



### 3.3 Kryoelektronenmikroskopie

Die Struktur der DMPC-Surfactin-Aggregate wurde bei einer konstanten DMPC-Konzentration von 2,5 mM und bei einer variablen Konzentration von Surfactin zwischen 0,05 und 0,2 mM (2 – 8 Mol%) untersucht. Surfactin wurde dazu in Methanol gelöst und zu einer DMPC-Vesikel-Lösung oberhalb der Phasenübergangstemperatur zugegeben (s. Kapitel 2.3). Die Surfactin-DMPC Lösung wurde bei Temperaturen von 20 °C bzw. 28 °C in einer Kammer (CEVS) für die Kryo-TEM Untersuchungen präpariert. Die CEVS-Kammer erlaubt die Kontrolle von Temperatur und Luftfeuchtigkeit für die Handhabung der Probe. Diese Experimente wurden mit Hilfe eines Philips Tecnai F20 Elektronenmikroskops am Forschungszentrum für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Einzelne Tropfen von ca. 5 µl der frisch zubereiteten Surfactin-DMPC-Lösung wurden bei Temperaturen oberhalb bzw. unterhalb der Phasenübergangstemperatur von DMPC auf lochfolienbefilmte Kupfergrids (200 mesh) aufgebracht, die zuvor durch Glimmentladung hydrophilisiert worden waren (Baltec MED 020, 60 s bei 8 W). Die überschüssige Lösung wurde vorsichtig mit Filterpapier bis auf eine dünne Schicht von 100 - 200 nm abgesaugt und über einen Guillotine-ähnlichen Mechanismus unmittelbar in flüssiges Ethan eingeschossen. Die Abkühlraten liegen dabei in der Größenordnung von  $10^4$  K/s, so dass es zu einem amorphen Gefrieren des Lösungsmittels Wasser ohne Bildung von Eiskristallen kommt. Die vitrifizierten Präparate wurden zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Sie wurden mit Hilfe eines Gatan-Kryo-Halters (Model 626-DH, Gatan Inc., California, USA) in ein Transmissions-Elektronenmikroskop Philips Tecnai F20 (FEI, Oregon, USA) transferiert, wobei die Temperatur bei etwa  $-180$  °C gehalten wurde. Die Probe wurde direkt im Elektronenstrahl zur Abbildung gebracht. Die Primärvergrößerung für die Kryo-Aufnahmen betrug  $M = 61.702x$  bei einer Beschleunigungsspannung von 160 kV (FEG-Beleuchtung). Durch Defokussierung der Objektivlinse (Phasenkontrast) wurde eine kontrastreiche direkte Abbildung des eingebetteten Objektes erzielt. Der Defokus war in alle Fälle auf 1,96 µm eingestellt, was den ersten Nulldurchgang der Phasenkontrastfunktion bei 2,35 nm entspricht [10].

### **3.4 Neutronenkleinwinkelstreuung (SANS)**

#### **3.4.1 Durchführung der SANS-Experimente**

Die Neutronenkleinwinkelstreuung-Experimente wurden im Rutherford Appleton Laboratory UK durchgeführt. Die Streukurven wurden an dem LOQ-Diffraktometer mit Hilfe einer gepulsten Neutronenquelle ermittelt. Mit dieser Methode können Moleküle in der Größenordnung von 1 – 100 nm untersucht werden. Die Untersuchung beruht auf der sogenannten "white beam" Flugzeit-Methode mit einer Wellenlängenbreite von 2 – 10 Å bei einer Frequenz von 50 Hz. Es wurde bei ein Streurichtung  $Q$  von 0,02 bis 0,25 Å<sup>-1</sup> gemessen. Die Strahlapertur betrug 12 mm. Der Probe-Detektor-Abstand lag bei 5 m. Die Instrumentkonfiguration und die Stellung der Probe wurden so optimiert, dass eine maximale Sensitivität erzielt wurde.

In eine Lösung von 2,5 mM DMPC wurde ein Anteil von 30 Mol% (0,750 mM) Surfactin gegeben. Der für die Präparation der Vesikel verwendete Tricine Puffer wurde in D<sub>2</sub>O bei pH 7,5 angesetzt. Die DMPC-Surfactin-Lösung wurde vor der Messung durch mehrmaligen Temperaturdurchlauf in einem Temperatur-Bereich von 15 bis 40 °C behandelt, um eine stabile Aggregatform zu erreichen. Die Messung wurde in einem D<sub>2</sub>O-Medium bei einer Temperatur von 29 °C durchgeführt.

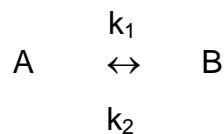
#### **3.4.2 Auswertung der SANS-Experimente**

Die ermittelte Streuungsintensität der Experimente ist von der Form und Größe der Micellen abhängig. Die Anpassung der experimentellen Streukurven  $I(Q)$  an unterschiedliche theoretische Modelle wurden mit Hilfe verschiedener Gleichungen durchgeführt [19,75]. Als Modelle kamen oblate und prolate Ellipsoide so wie polydisperse und monodisperse Kugeln in Frage. Die Anpassungen zeigten, dass die Experimentelle Streukurve durch je eine Oblate- und Prolateform an Kurven approximiert wurde.

### 3.5 Relaxationsspektroskopie: “Poor Man’s Temperature Jump” (PT- Jump)

Die Prinzipien der Relaxationskinetik wurden von Czerlinski und Eigen Mitte der Fünfzigerjahre entwickelt. Dieses Verfahren geht von einem chemischen System aus, dessen Gleichgewichtslage sich in einem stationären Zustand befindet und sich durch eine kurzzeitige Störung verändert. Das System muß sich dann den veränderten Bedingungen anpassen und einen neuen Gleichgewichtszustand erreichen. Die Anpassung an das neue Gleichgewicht wird dann zeitlich verfolgt. Die Veränderung des Gleichgewichts kann durch Temperatur-, Druck- oder Feldsprung erreicht werden. Zum Nachweis von Konformationsänderungen eignet sich vor allem die Temperatursprung-Methode [7].

Eine Reaktion erster Ordnung eines Systems wird durch folgende Reaktionsgleichung dargestellt:



Hierbei entspricht die Abnahme der Konzentration der Reaktanden A der Zunahme des Produkts B. Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  hängt nicht von den Konzentrationen der Reaktionspartner ab, ist aber temperaturabhängig. Ihre Dimension ist  $s^{-1}$ .

Eine schnelle Temperaturänderung des Systems und somit die Verschiebung der Gleichgewichtslage hat Konzentrationsänderungen pro Zeiteinheit  $d[A]/dt$  der Reaktanden zur Folge, die der Einstellung des „neuen“ Gleichgewichtszustandes entspricht. Für die Reaktionsgeschwindigkeit des Systems gilt [3]:

$$(3-7) \quad \frac{d[A]}{dt} = -k_1 [A] + k_2 [B]$$

Im Gleichgewicht ist  $\frac{d[A]}{dt} = 0$ . Folglich ist die Gleichgewichtskonzentration :

$$(3-8) \quad k_1 [A]_{\text{eq}} = k_2 [B]_{\text{eq}}$$

$$(3-9) \quad \frac{d[A]}{dt} = - (k_1 + k_2) [A]'$$

$[A]'$  : Die Abweichung der Konzentration von A vom neuen Gleichgewicht

Da  $d[A]/dt = d[A]'/dt$  gilt, lässt sich der zeitliche Verlauf der Reaktion durch folgende Differentialgleichung beschreiben:

$$(3-10) \quad [A]' = [A]_0 \cdot e^{-t/\tau} \quad \text{mit} \quad \frac{1}{\tau} = k_1 + k_2$$

$[A]'$  : Konzentration von A zu einem beliebigem Zeitpunkt t

$[A]_0$  : Ausgangskonzentration von A zum Zeitpunkt t = 0

t : Zeit

k : Geschwindigkeitskonstante

$\tau$  : Relaxationszeit

Gleichung (3-10) verdeutlicht, dass die Konzentrationen der Reaktanden bei einer Reaktion erster Ordnung exponentiell abnehmen. Die Geschwindigkeitskonstante bestimmt, wie schnell diese Abnahme erfolgt. Im Gleichgewicht gilt für diese Reaktion:

$$(3-11) \quad K = k_1 / k_2$$

Die Relaxationszeit ist von der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion und von der Gleichgewichtskonzentration abhängig:

$$(3-12) \quad \frac{1}{\tau} = k [A]$$

Für die Temperatursprung-Methode ist die Gleichgewichtskonstante K nach der van't Hoff'schen Gleichung (bei konstantem Druck p) von der absoluten Temperatur abhängig und es gilt für  $\Delta H \neq 0$ :

$$(3-13) \quad \left( \frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta H}{RT^2}$$

K	:	Gleichgewichtskonstante
T	:	Temperatur
R	:	Gaskonstante ( 8,314510 J · Mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
p	:	Druck
Δ H	:	Enthalpieänderung

### 3.5.1 Durchführung der Temperatursprung-Experimente

Um den zeitlichen Verlauf der Relaxation unseres Systems zu verfolgen, wurde die sogenannte Poor Man's Temperatursprung-Methode verwendet. Zur Erzielung des Temperatursprungs werden zwei Thermostate benötigt. Im ersten Thermostat wird die Ausgangstemperatur eingestellt. Der zweite Thermostat hält die Temperatur im Probenhalter konstant. Die Überführung der Küvette aus dem 1. Thermostat (Temperatur 1) in den Probenhalter (Temperatur 2) erfolgt manuell. Die Tot-Zeit beträgt nach Messungen für „schnelle“ Proben 5 s. Es können ohnehin nur Vorgänge, die langsamer als 10 s sind, verfolgt werden. Da die Temperaturwahl von Thermostat 1 und 2 frei ist, kann sowohl ein positiver wie auch ein negativer Temperatursprung zwischen 1 und 30 °C durchgeführt werden. Für Vorgänge, die langsamer als 10 s ablaufen, wird somit eine hohe Flexibilität erzielt. Größe und Richtung des Temperatursprungs können frei gewählt werden. Als Relaxationssignal wurde bei einer Wellenlänge von 350 nm (Filter cut 320 nm, UG 11) und einem Streuwinkel von 90° die zeitliche Änderung des Streulichts detektiert. Als Lichtquelle wurde eine Xe/Hg 200W Bogenlampe verwendet. Die Konzentration von DMPC-Vesikeln wurde konstant gehalten. Sie betrug 2,5 mM (s. Kapitel 2.3). Die Konzentration von Surfactin wurde zwischen 0,025 und 0,1 mM (1 – 4 Mol%) variiert (s. Kapitel 2.2). Die reinen DMPC-Vesikel und die DMPC-Surfactin Lösung wurden in eine Quarzküvette (Schichtdicke 2 x 10 mm, Fa. Hellma) gefüllt und 5 min thermostatisiert. Die Küvette wurde anschließend in den thermostatisierbaren

Probenhalter des Spektrophotometers gestellt und das Signal sofort Trigger-gesteuert aufgenommen. Die Temperatur wurde mit einem Haake Thermostat kontrolliert.

Die Temperatursprung-Messungen an DMPC-Vesikeln in Gegenwart von 1 – 3 Mol% (0,025 – 0,075 mM) Surfactin wurden bei Temperaturen von 32 – 14 °C bzw. 14 – 32 °C und für DMPC mit 4 Mol% (0,1 mM) Surfactin von 35 – 24 °C bzw. 24 – 35 °C durchgeführt. Es wurde zuerst ein fallender (Down-Jump) und danach ein steigender (Up-Jump) Temperaturdurchlauf durchgeführt. Das Relaxationssignal wurde bis 100 s verfolgt. Die Messungen wurden 5 – 8 mal wiederholt, um daraus einen Mittelwert der Relaxationszeit  $\tau$  sowohl für T-Sprung abwärts als auch für T-Sprung aufwärts zu bestimmen. Die Temperatur der Lösung wurde vor und nach dem Triggersignal manuell mit einem NiCr/Ni-Thermoelement (Therm 2201, Ahborn Mess- und Regelungstechnik, Germany) gemessen.

### 3.5.2 Auswertung der Relaxationssignale

Die Relaxationssignale verlaufen nach einer Reaktion erster Ordnung. Für diese Reaktionsordnung erhält man eine exponentiell verlaufende Kurve. Die Reaktionsgeschwindigkeit zu einer bestimmten Zeit  $t$  ergibt sich aus der Steigung der Tangenten. Das Signal wurde mit dem Programm Hi-Tech-Scientific (Hi-Tech Limited, Salisbury, United Kingdom) aufgezeichnet. Die Relaxationszeiten  $\tau$  (s) und die Amplitude  $A$  (a.u.) wurden als Parameter der Anpassung der Relaxationskurve durch das Auswerteprogramm Origin zusammen mit den zugehörigen Korrekturfehlern ermittelt. Die Überlagerung der wirklichen, chemischen Relaxation mit der Dauer des Störsignals der Messanordnung wurde durch die folgende Korrekturformel berücksichtigt:

$$(3-14) \quad \tau_{\text{chem}} = \sqrt{(\tau^2 \exp - \tau^2 pT)} \quad ; \quad \tau_{pT} = 5 \text{ s} \quad [37]$$

$\tau_{\text{chem}}$  : Chemische Relaxationszeit

$\tau_{\text{exp}}$  : Relaxationszeit aus dem Experiment

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Wechselwirkung des Lipopeptids Surfactin mit DMPC-Vesikeln

#### 4.1.1 Differential-Scanning-Kalorimetrie (DSC)

Die Ergebnisse der DSC-Experimente zur Wechselwirkung von Surfactin mit DMPC-Vesikeln sind in Abbildung 10 – 13 und Tabelle 3 dargestellt. Die Messungen wurden bei steigendem Temperatur-“scan“ mit einer Aufheizrate von 0,5 °C/min durchgeführt (s. Kapitel 3.1.1). Der pH-Wert von Surfactin-DMPC-Lösungen lag bei 7,5 (s. Kapitel 2.3).

Das DSC-Thermogramm der reinen DMPC-Vesikel zeigt einen DSC-Peak, dessen Maximum bei 23,5 °C liegt. Dieses entspricht der Phasenübergangstemperatur  $T_{m1}$  der reinen DMPC-Vesikel [77]. Ab 2 Mol% Surfactin beobachtet man eine Abnahme dieser Umwandlungstemperatur  $T_{m1}$  auf 23 °C, eine Zunahme der Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{cal1}$  und eine Verbreiterung des ersten DSC-Peaks ( $\Delta T_{1/2}$ ) (s. Abb. 10 und Tab. 3). Dies deutet auf strukturelle Veränderungen der DMPC-Vesikel hin.

Bei einer Surfactin-Konzentration von 3 Mol% zeigt die DSC-Kurve eine Schulter bei höherer Temperatur, aus der sich ab 4 Mol% Surfactin ein separater zweiter Peak entwickelt (s. Abb. 10 und 11). Beide Peaks wurden durch Gaußfunktionen angenähert. Die Abhängigkeiten der Umwandlungstemperatur  $T_m$  und der Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{cal}$  von der Surfactin-Konzentration wurden für beide Peaks separat ermittelt.  $T_{m1}$  und  $\Delta H_{cal1}$  beziehen sich auf den ersten DSC-Peak.  $T_{m2}$  und  $\Delta H_{cal2}$  sind dem zweiten DSC-Peak zugeordnet. Die gesamte Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{calges}$  wurde durch Integration der Fläche unter der DSC-Kurve bestimmt und entspricht der Summe der beiden Umwandlungsenthalpien  $\Delta H_{cal1}$  und  $\Delta H_{cal2}$ . Der erste Peak nimmt ab 8 Mol% Surfactin stark ab (s. Abb. 12) und verschwindet ab 15 Mol% Surfactin vollständig. Oberhalb dieser Konzentration ist nur noch der zweite breite, abgeflachte Peak sichtbar (s. Abb. 13).

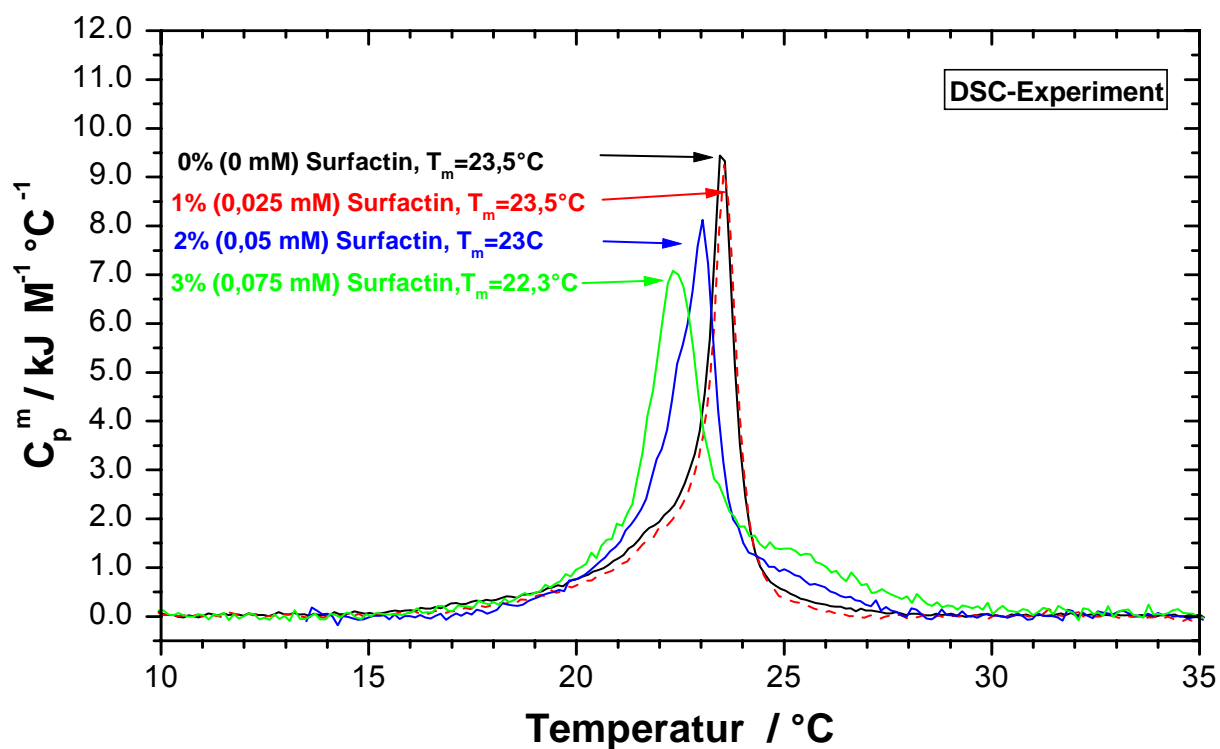


Abb. 10: Thermogramm für DMPC-Vesikel ([DMPC] = 2,5 mM) in Gegenwart von 0 bis 3 Mol% Surfactin.

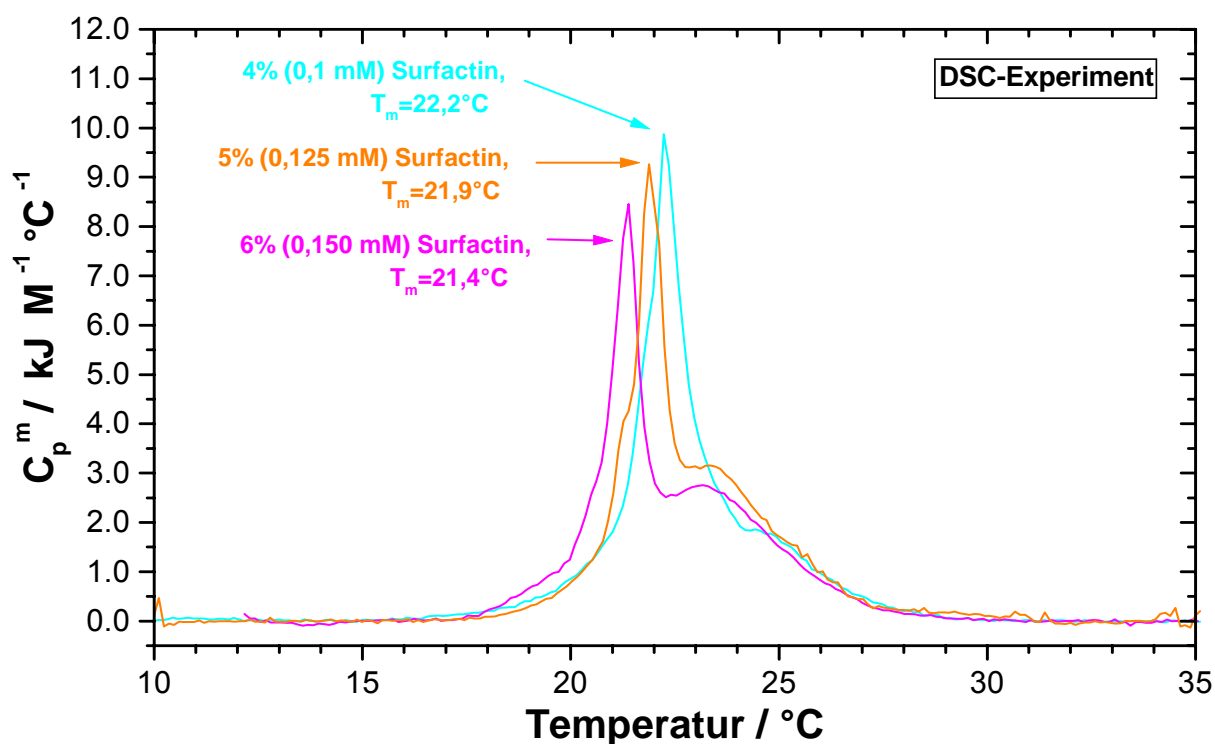


Abb. 11: Thermogramm für DMPC-Vesikel ([DMPC] = 2,5 mM) in Gegenwart von 4 bis 6 Mol% Surfactin.



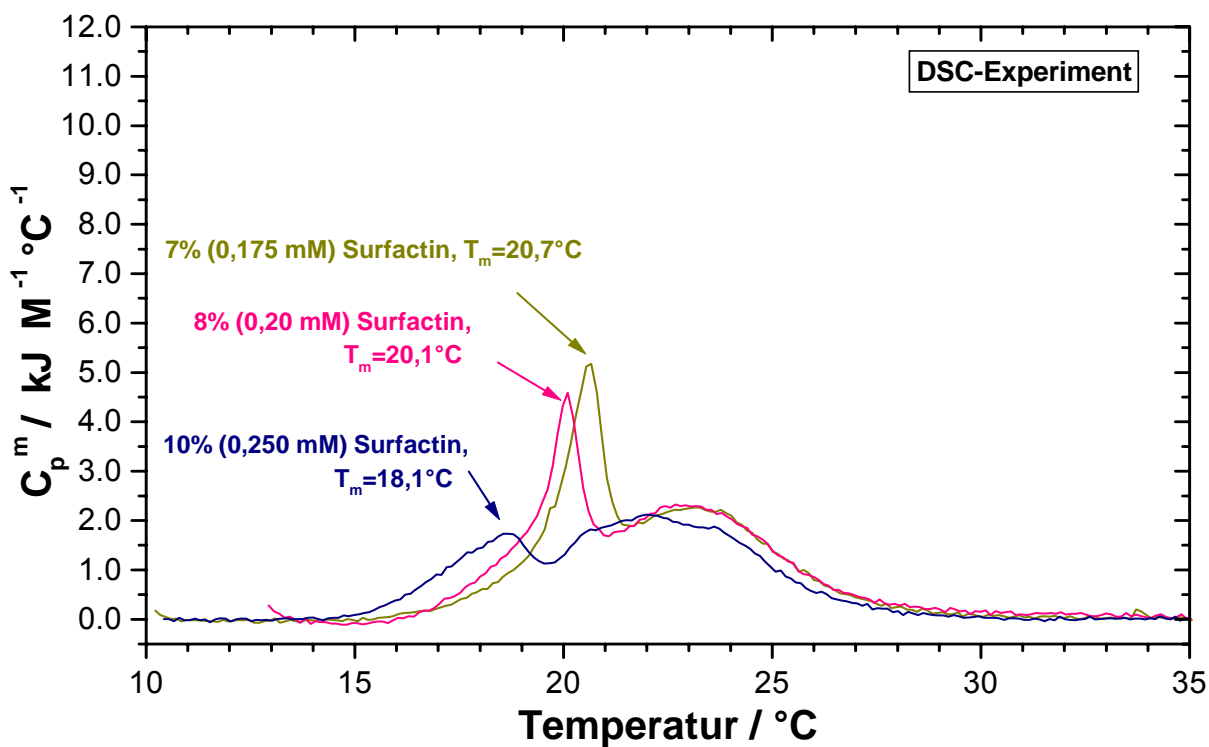


Abb. 12: Thermogramm für DMPC-Vesikel ( $[\text{DMPC}] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 7 bis 10 Mol% Surfactin.

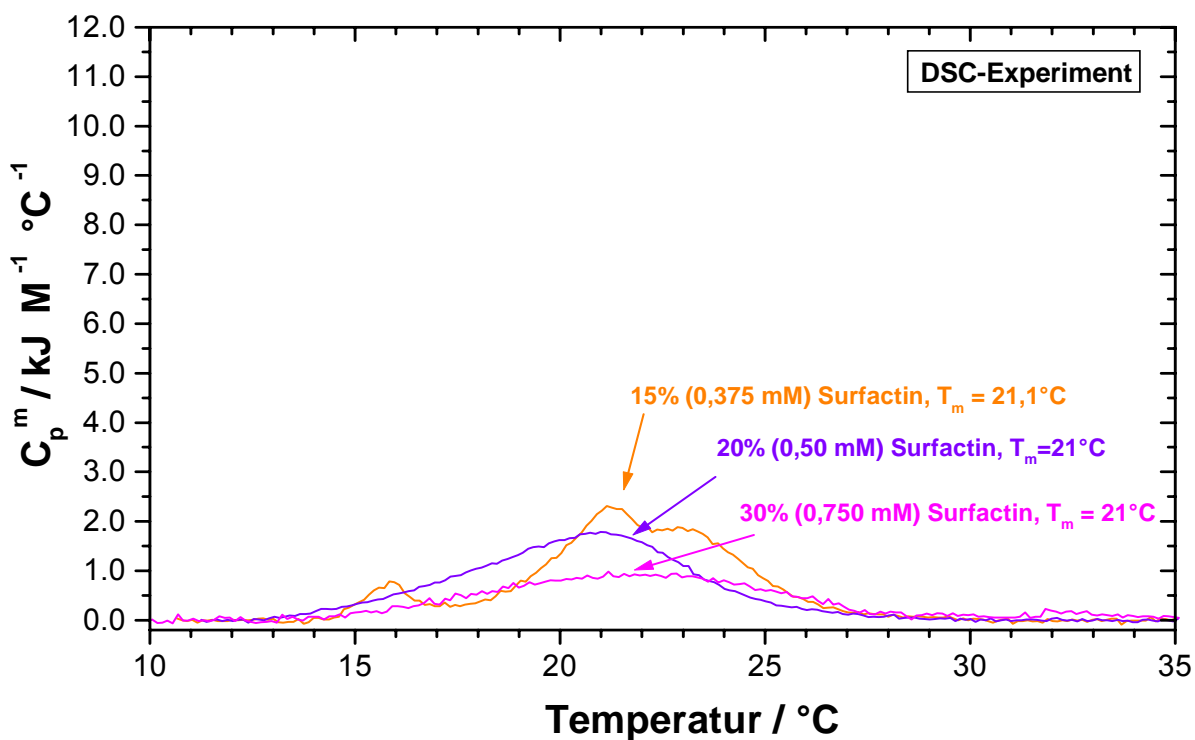


Abb. 13: Thermogramm für DMPC-Vesikel ( $[\text{DMPC}] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 15 bis 30 Mol% Surfactin.

Surfactin-Konzentration		Phasenumwandlung der DMPC-Vesikel				
		$T_{m1}$	$T_{m2}$	$\Delta H_{calges}$	$\Delta H_{cal1}$	$\Delta H_{cal2}$
mM	Mol%	°C	°C	kJ / M	kJ / M	kJ / M
0,000	0	23,5 ± 0,0		18,7 ± 0,3	18,7 ± 0,3	
0,025	1	23,5 ± 0,1		18,7 ± 0,3	18,7 ± 0,3	
0,050	2	23,0 ± 0,1		19,7 ± 0,2	19,7 ± 0,2	
0,075	3	22,3 ± 0,1		20,1 ± 0,3	20,1 ± 0,3	
0,100	4	22,2 ± 0,0	23,0 ± 0,1	20,6 ± 0,3	13,7 ± 0,2	7,1 ± 0,1
0,125	5	21,9 ± 0,2	23,0 ± 0,1	20,4 ± 0,7	10,9 ± 0,4	11,5 ± 0,4
0,150	6	21,4 ± 0,1	22,7 ± 0,1	19,4 ± 1,1	9,6 ± 0,6	11,8 ± 0,7
0,175	7	20,7 ± 0,2	22,5 ± 0,1	19,3 ± 1,1	7,8 ± 0,4	11,8 ± 0,7
0,200	8	20,1 ± 0,2	22,4 ± 0,1	18,4 ± 1,1	6,3 ± 0,4	11,8 ± 0,7
0,250	10	18,1 ± 0,2	22,0 ± 0,1	15,5 ± 0,9	3,8 ± 0,2	11,5 ± 0,7
0,350	14	16,8 ± 0,2	21,5 ± 0,1	14,4 ± 0,8	1,8 ± 0,1	11,4 ± 0,7
0,375	15		21,1 ± 0,1	12,6 ± 0,7	1,0 ± 0,1	11,4 ± 0,7
0,500	20		21,0 ± 0,1	11,1 ± 0,7		11,1 ± 0,7
0,750	30		21,0 ± 0,1	9,7 ± 0,6		9,7 ± 0,6

Tabelle 3: Einfluss von Surfactin auf die endotherme Phasenumwandlung von DMPC-Vesikeln ([DMPC] = 2,5 mM) (DSC-Experiment).

- $T_{m1}$  Umwandlungstemperatur für den ersten Umwandlungsprozess  
 $T_{m2}$  Umwandlungstemperatur für den zweiten Umwandlungsprozess  
 $\Delta H_{calges}$  Gesamte Umwandlungsenthalpie für beide Umwandlungsprozesse  
 $\Delta H_{cal1}$  Umwandlungsenthalpie für den ersten Umwandlungsprozess  
 $\Delta H_{cal2}$  Umwandlungsenthalpie für den zweiten Umwandlungsprozess

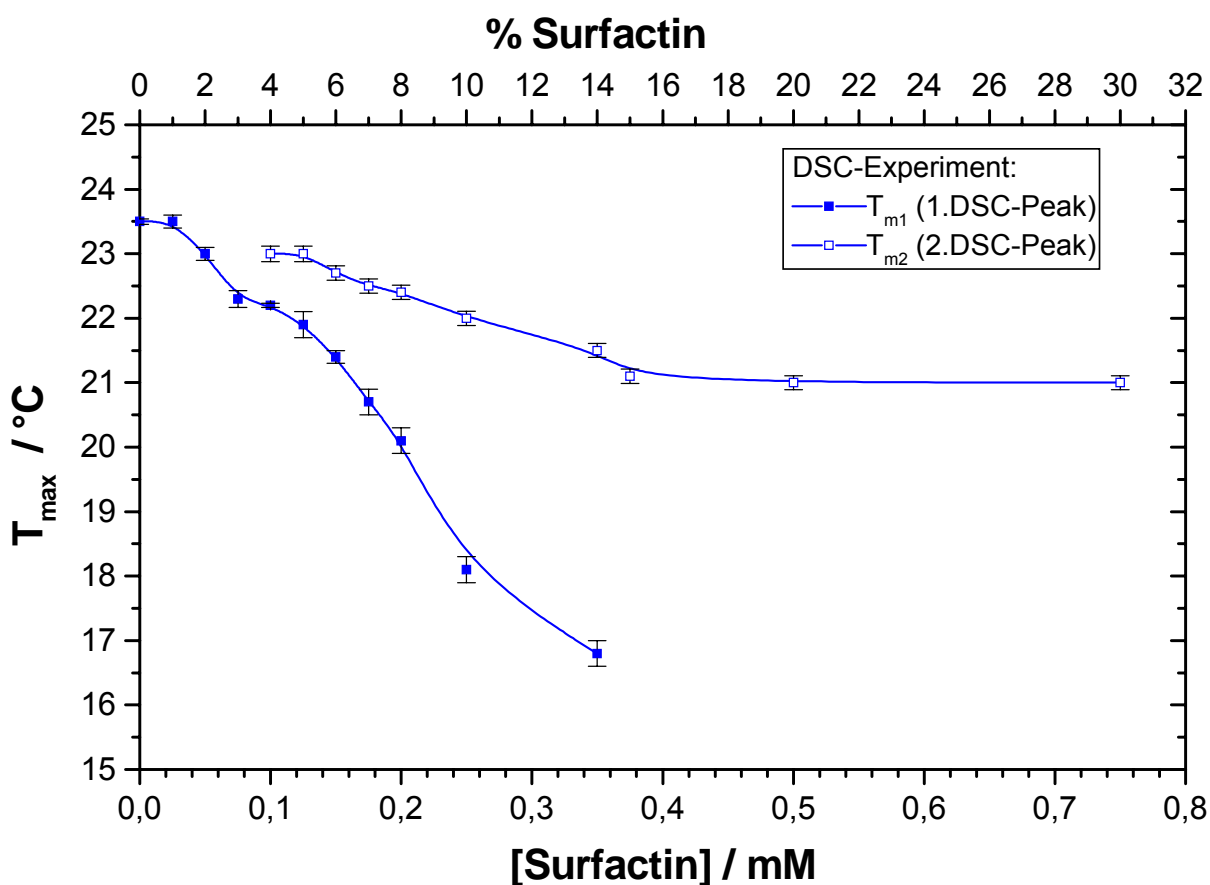


Abb. 14: Abhängigkeit der Phasenübergangstemperatur  $T_{\max}$  der DMPC-Vesikel ([DMPC] = 2,5 mM) von der Surfactin-Konzentration.

Die Phasenübergangstemperatur  $T_m$  verschiebt sich bei beiden Peaks mit wachsender Surfactin-Konzentration zu niedrigerer Temperatur (s. Tab. 3 und Abb. 14). Die Abnahme  $T_{m1}$  für den ersten Peak ist deutlich stärker als von  $T_{m2}$  für den zweiten Peak.  $T_{m1}$  verschiebt sich von 23,5 °C bei 0 Mol% Surfactin auf 16,8 °C bei 14 Mol% Surfactin.  $T_{m2}$  vermindert sich von 23 °C bei 4 Mol% Surfactin auf 21 °C bei 30 Mol% Surfactin.

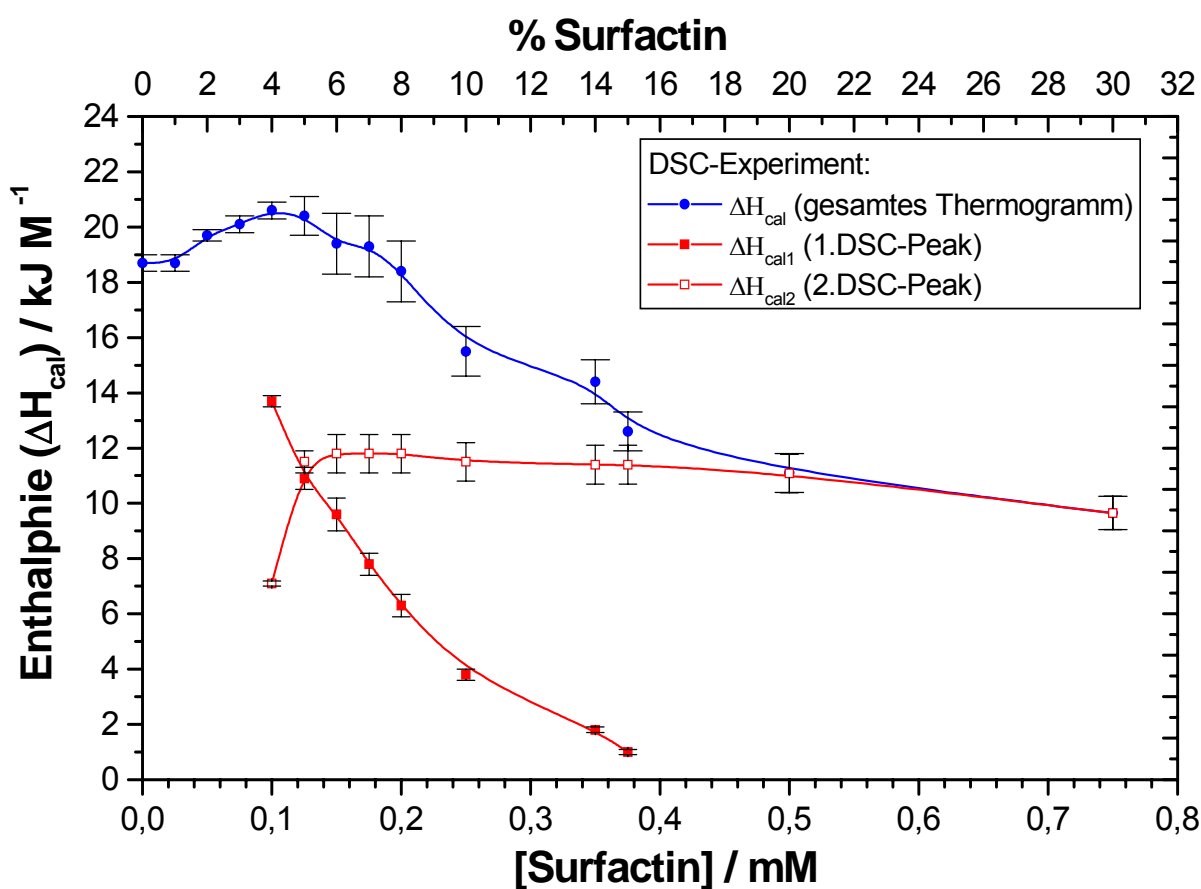


Abb. 15: Abhängigkeit der Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{cal}$  der DMPC-Vesikel ( $[\text{DMPC}] = 2,5 \text{ mM}$ ) von der Surfactin-Konzentration.

Die Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{cal}$  für die Hauptphasenumwandlung der reinen DMPC-Vesikel liegt bei  $18,7 \text{ kJ/M}$ . Für das Gesamtsystem nimmt  $\Delta H_{cal}$  bis zu 4 Mol% Surfactin auf  $20,6 \text{ kJ/M}$  zu und fällt dann bis 30 Mol% auf  $9,7 \text{ kJ/M}$  ab (s. Tab. 3 und Abb. 15). Die dem ersten Peak zugeordnete Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{cal1}$  nimmt ab 4 Mol% Surfactin stark ab. Im Gegensatz hierzu ist die dem zweiten Umwandlungsprozess  $\Delta H_{cal2}$  entsprechende Umwandlungsenthalpie im Bereich von 5 - 20 Mol% Surfactin weitgehend konstant.

#### 4.1.2 Statische Licht-Streuungs-Experimente

Die Ergebnisse der Lichtstreuungsexperimente werden in Abbildung 16 – 24 und Tabelle 4 dargestellt. Die Messungen wurden zuerst bei fallendem und danach bei steigendem Temperaturdurchlauf (Down- und Up scan) durchgeführt (s. Kapitel 3.2.1).

Die Veränderung der Streuintensität von DMPC-Vesikeln beginnt bereits ab 2 Mol% Surfactin. Ab dieser Surfactin-Konzentration beobachtet man wie bei den DSC-Messungen (s. Abb. 10) eine Verschiebung der Phasenübergangstemperatur  $T_{m1}$  (s. Abb. 16) zu einem niedrigeren Wert. Die Streuintensität der reinen DMPC-Vesikel nimmt hierbei mit steigender Temperatur ab. Ein ähnliches Streuverhalten ist bis zu 3 Mol% Surfactin zu sehen. Bis zu dieser Surfactin-Konzentration beobachtet man nur einen Hysterese-Effekt. Die Breite dieser Hysterese nimmt mit steigender Surfactin-Konzentration von 0,8 °C bei 4 Mol% auf 1,5 °C bei 8 Mol% zu.

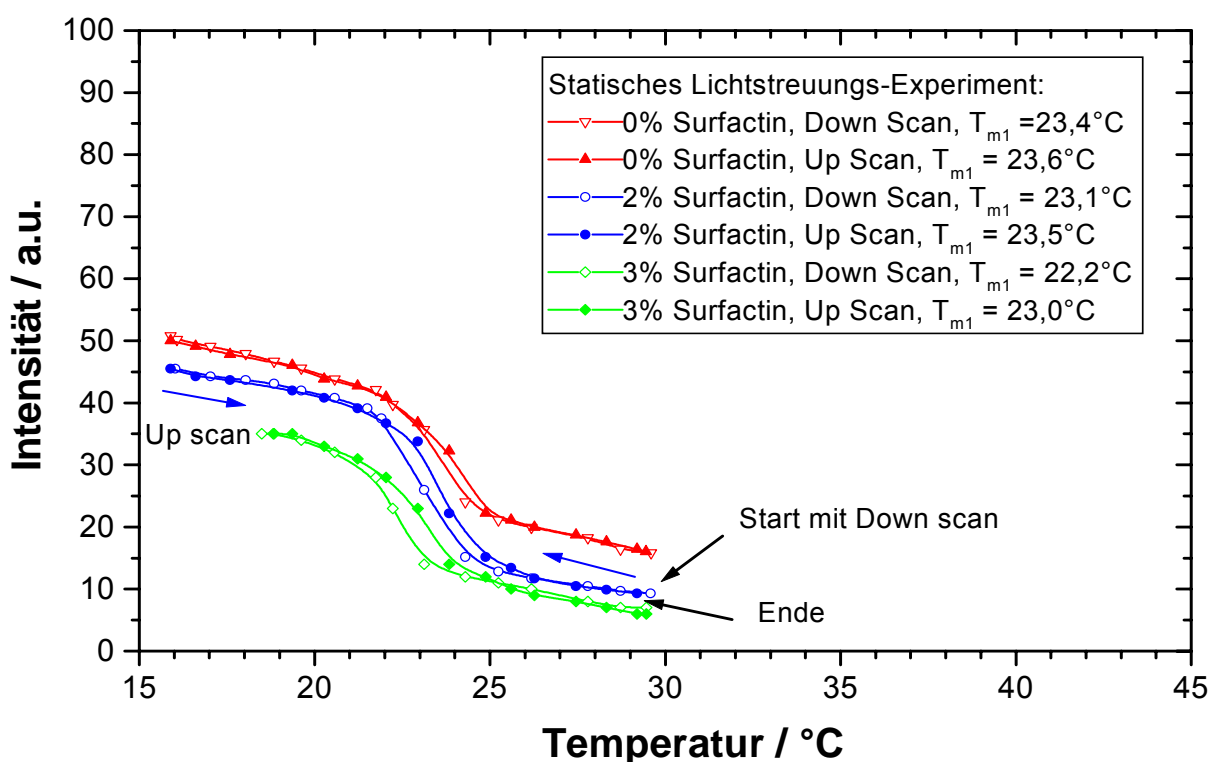


Abb. 16: Lichtstreuungsintensität von DMPC-Vesikeln ( $[\text{DMPC}] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 0 bis 3 Mol% Surfactin als Funktion der Temperatur.

Ab 4 bis ca. 8 Mol% Surfactin zeigt die Streukurve einen zusätzlichen Hysterese-Effekt bei höherer Temperatur. Bei 4 Mol% Surfactin liegt die Umwandlungs-temperatur dieses zweiten Phasenübergangs ( $T_{m2}$ ) bei 23,5 °C (Down-scan) bzw. 26,2 °C (Up-scan). Die Streuintensität von DMPC-Surfactin nimmt in diesem Bereich mit steigender Temperatur zu (s. Abb. 17). Dieses Verhalten ist umgekehrt wie bei reinen DMPC-Vesikeln. Daraus lässt sich schließen, dass unter diesen Bedingungen DMPC-Surfactin zusätzlich in einer zweiten Aggregatform vorliegt.

Bei 10 Mol% Surfactin nimmt die Streuintensität der DMPC-Surfactin-Aggregate stark zu (s. Abb. 22). Ab 15 Mol% Surfactin zeigt die Streukurve praktisch kein Hysterese-Verhalten mehr (s. Abb. 23). Ein viermaliger Temperaturdurchlauf bei 0 bis 15 Mol% Surfactin zeigt, dass diese Reaktionen noch reversible sind.

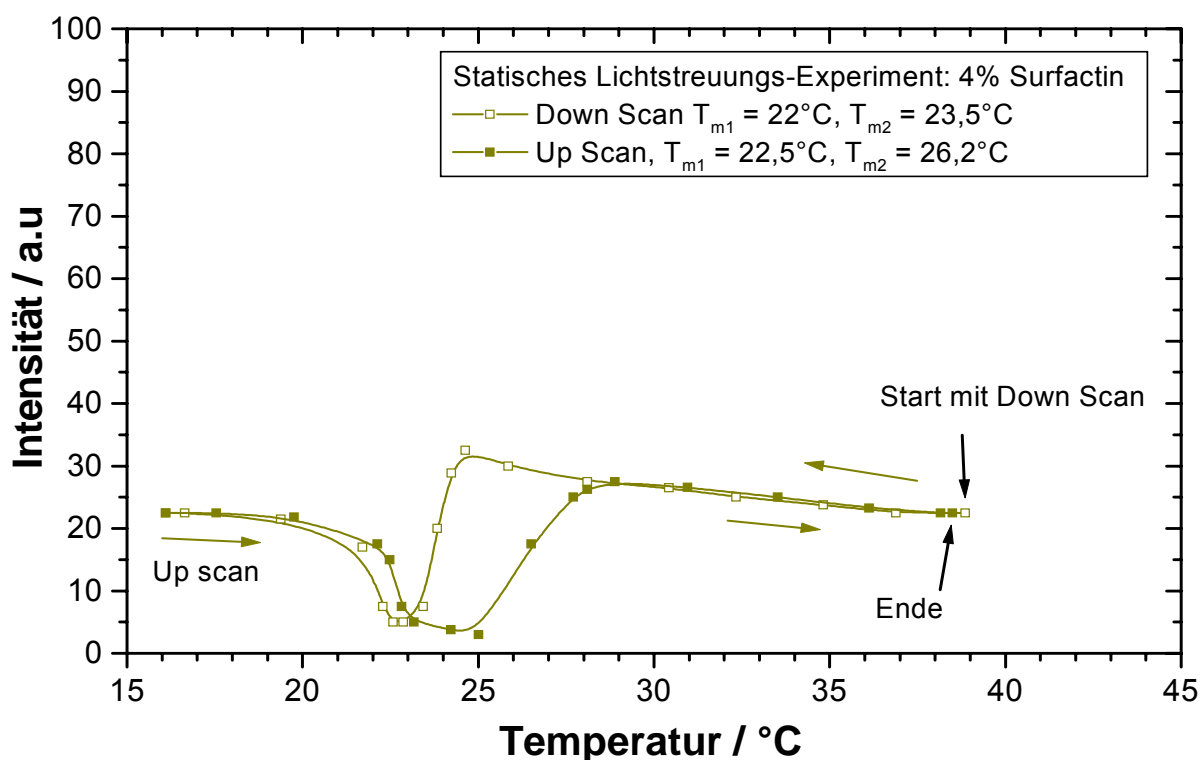


Abb. 17: Lichtstreuungsintensität von DMPC-Vesikeln ( $[\text{DMPC}] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 4 Mol% Surfactin als Funktion der Temperatur.

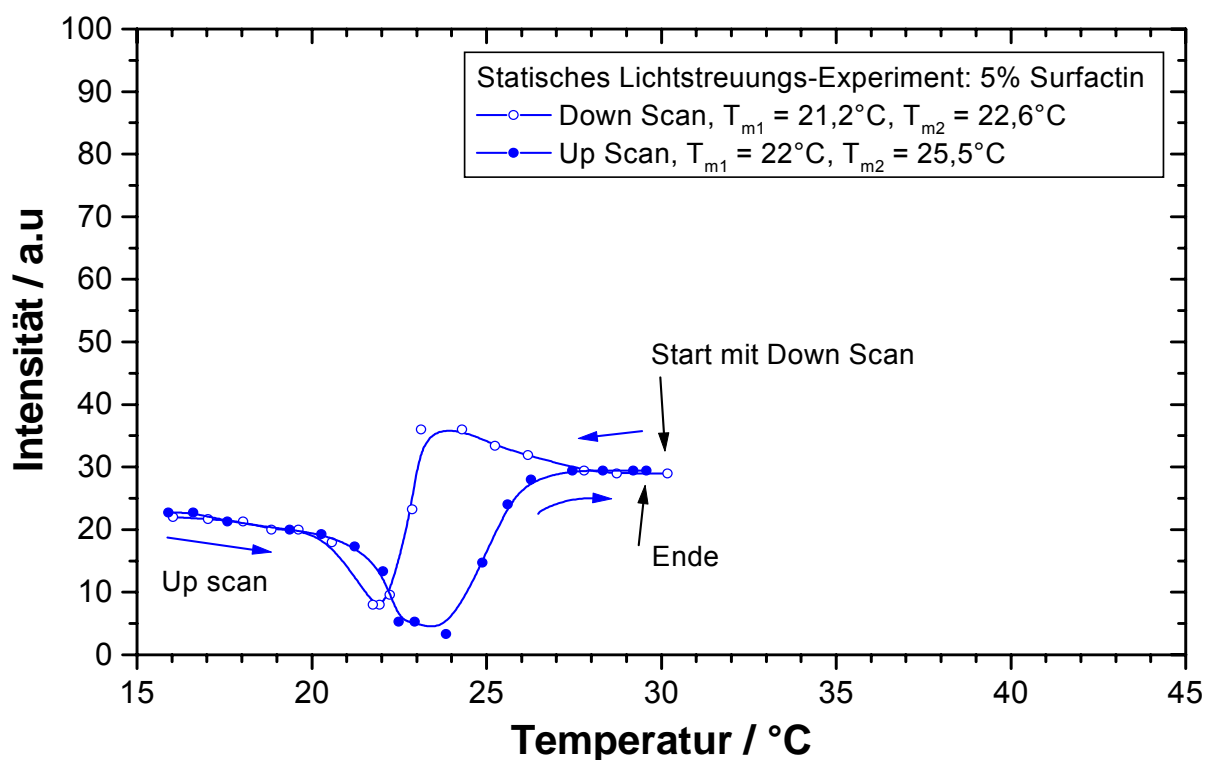


Abb. 18: Lichtstreuungsintensität von DMPC-Vesikeln ( $[\text{DMPC}] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 5 Mol% Surfactin als Funktion der Temperatur.

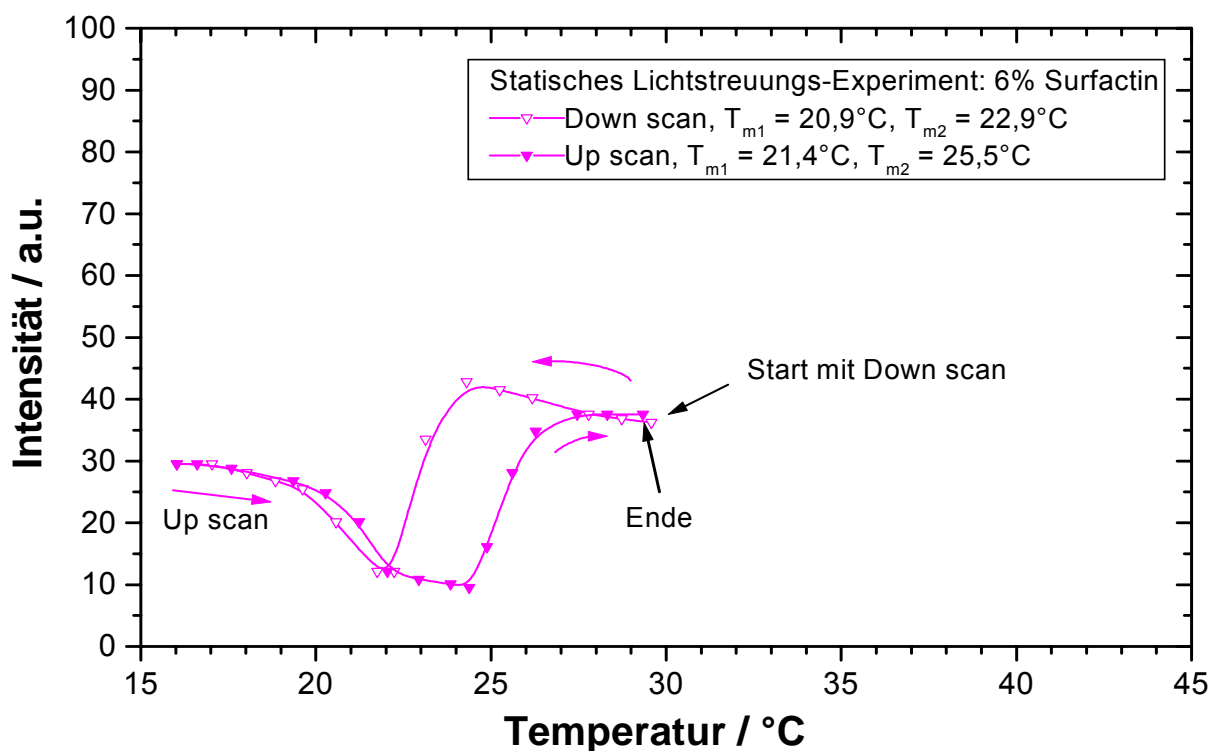


Abb. 19: Lichtstreuungsintensität von DMPC-Vesikeln ( $[\text{DMPC}] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 6 Mol% Surfactin als Funktion der Temperatur.

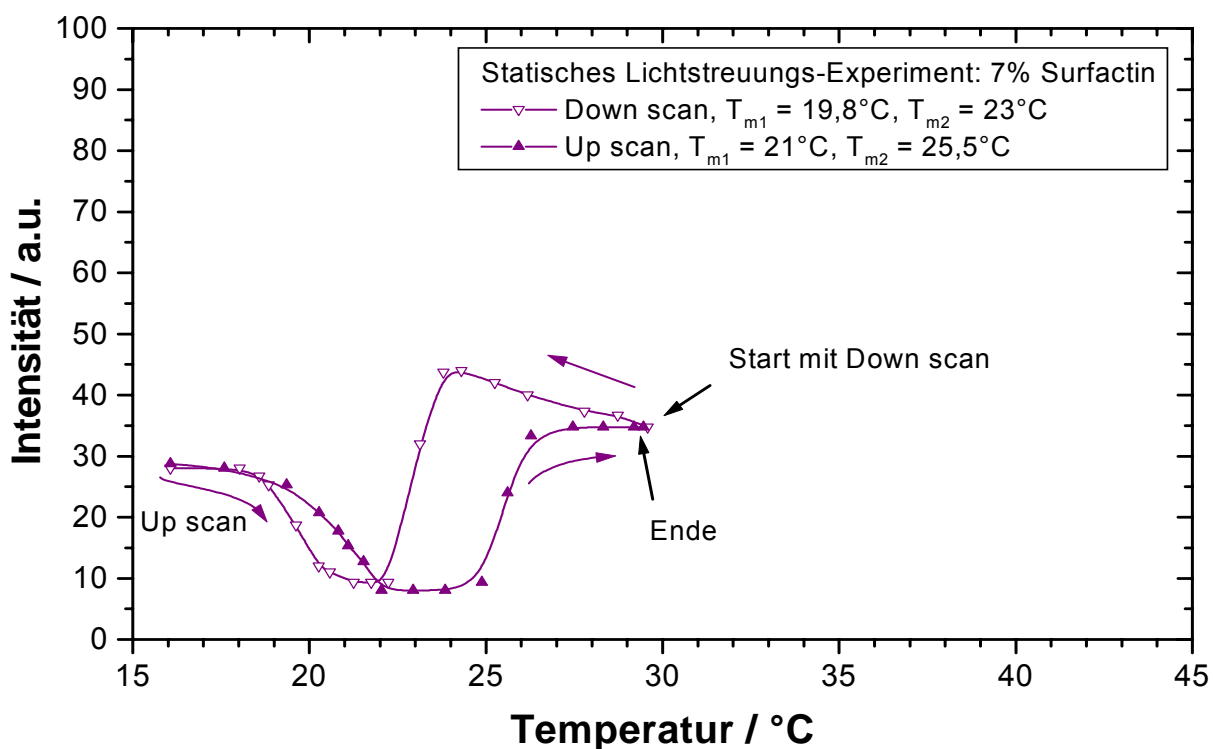


Abb. 20: Lichtstreuungsintensität von DMPC-Vesikeln ( $[\text{DMPC}] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 7 Mol% Surfactin als Funktion der Temperatur.

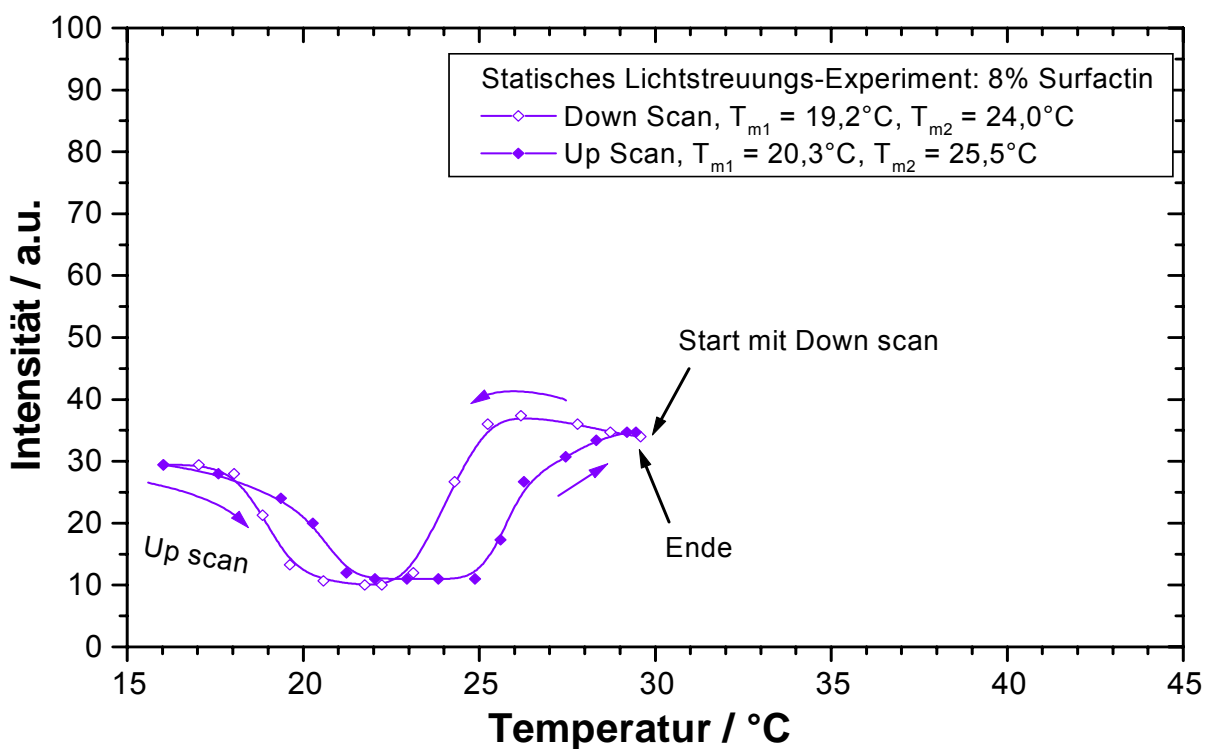


Abb. 21: Lichtstreuungsintensität von DMPC-Vesikeln ( $[\text{DMPC}] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 8 Mol% Surfactin als Funktion der Temperatur.



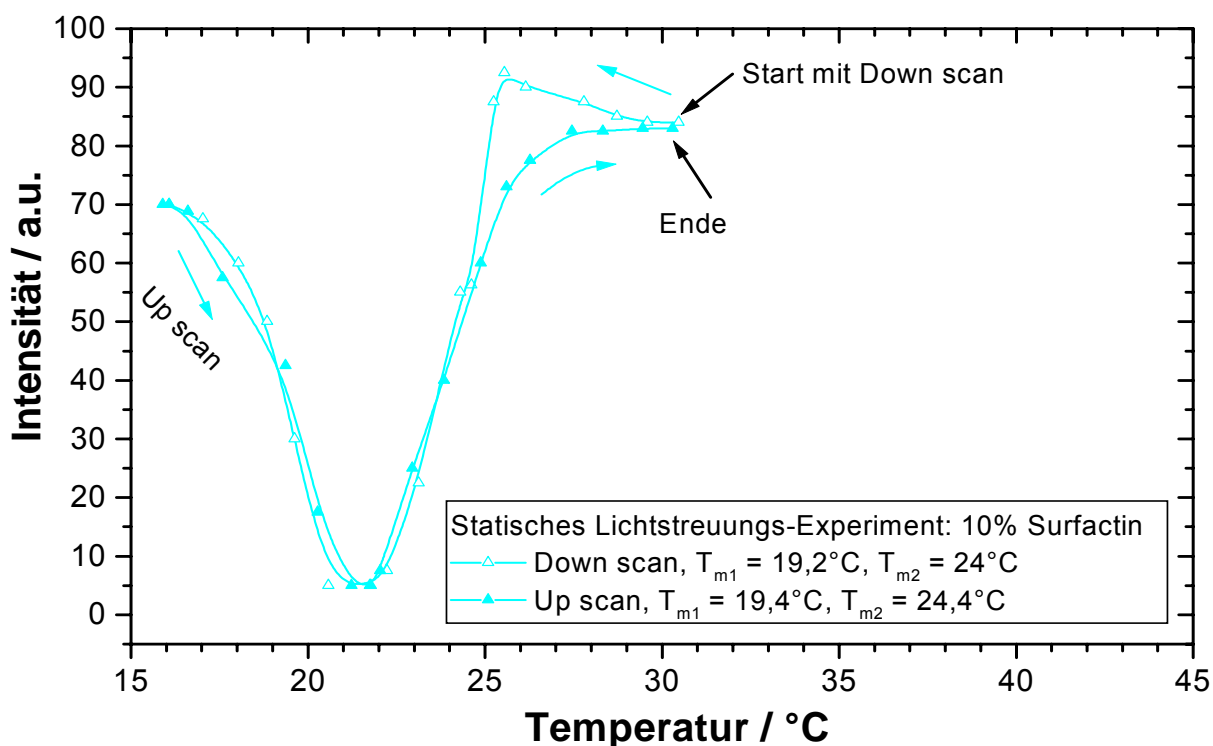


Abb. 22: Lichtstreuungsintensität von DMPC-Vesikeln ( $[\text{DMPC}] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 10 Mol% Surfactin als Funktion der Temperatur.

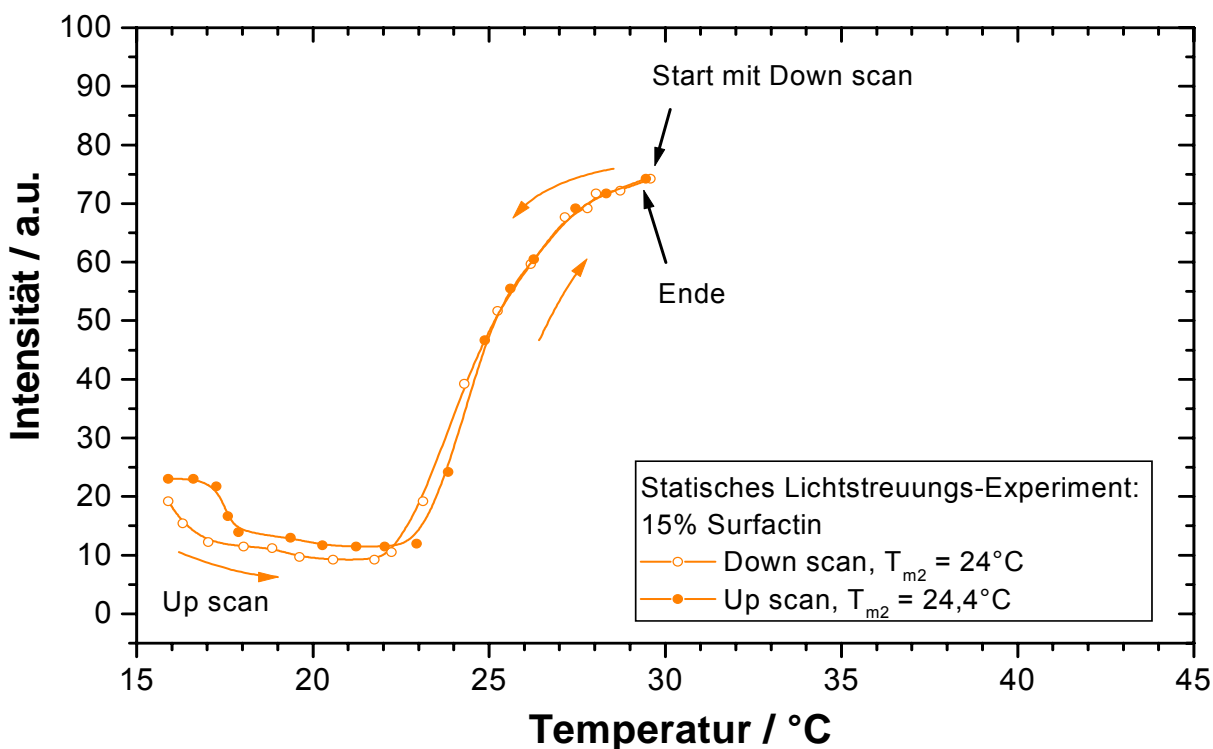


Abb. 23: Lichtstreuungsintensität von DMPC-Vesikeln ( $[\text{DMPC}] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 15 Mol% Surfactin als Funktion der Temperatur.

Bei 20 Mol% Surfactin erreicht die Streuintensität beim Up-scan nicht mehr die zu Beginn der Down-scan beobachteten Intensitätswerte. Dieser Effekt ist bei 30 Mol% Surfactin noch wesentlich stärker ausgeprägt (s. Abb. 24). Diese Resultate zeigen, dass in diesen Surfactin-Konzentrationsbereich die Wechselwirkung von DMPC mit Surfactin irreversible verläuft.

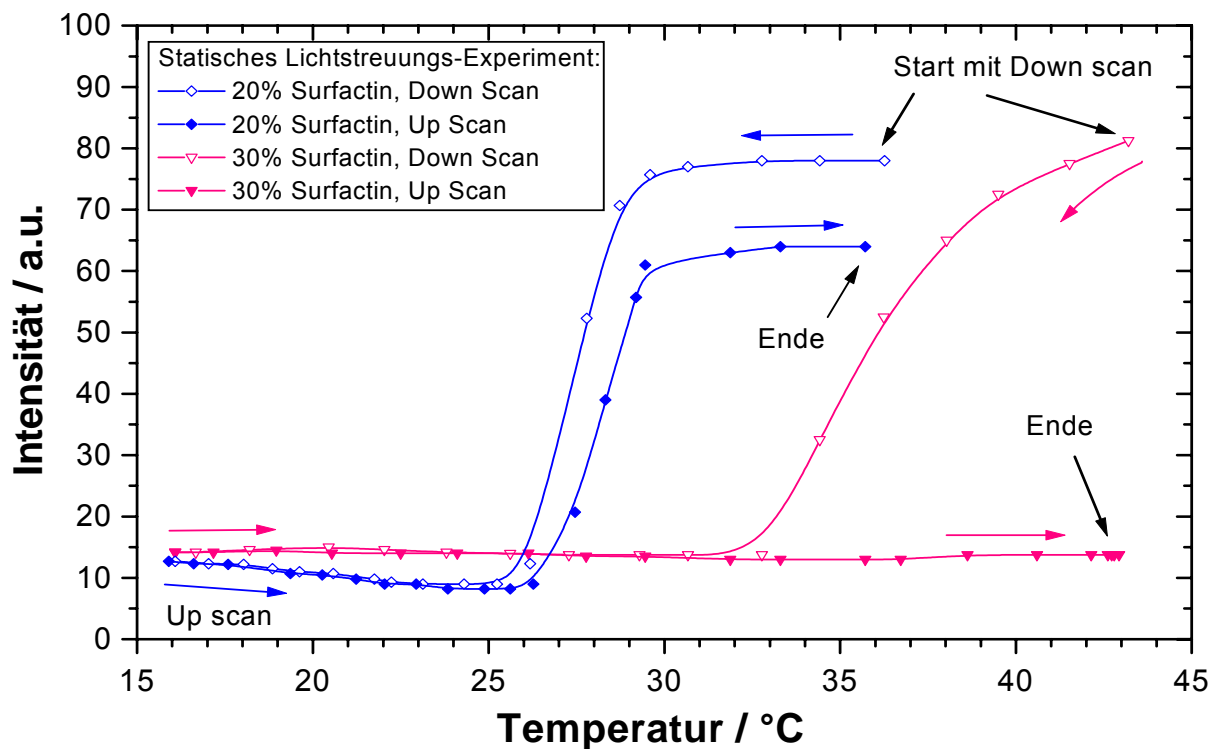


Abb. 24: Lichtstreuungsintensität von DMPC-Vesikeln ( $[DMPC] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 20 und 30 Mol% Surfactin als Funktion der Temperatur.

Surfactin-Konzentration		Phasenübergangstemperatur $T_m$ der DMPC-Vesikel			
		$T_{m1}$ -Down scan	$T_{m2}$ -Down scan	$T_{m1}$ -Up scan	$T_{m2}$ -Up scan
mM	Mol%	°C	°C	°C	°C
0,000	0	$23,4 \pm 0,1$		$23,6 \pm 0,1$	
0,025	1	$23,3 \pm 0,1$		$23,6 \pm 0,1$	
0,050	2	$23,1 \pm 0,1$		$23,5 \pm 0,1$	
0,075	3	$22,2 \pm 0,1$		$23,0 \pm 0,1$	
0,100	4	$22,0 \pm 0,1$	$23,5 \pm 0,1$	$22,5 \pm 0,1$	$26,2 \pm 0,2$
0,125	5	$21,2 \pm 0,1$	$22,6 \pm 0,1$	$22,0 \pm 0,1$	$25,5 \pm 0,2$
0,150	6	$20,9 \pm 0,1$	$22,9 \pm 0,1$	$21,4 \pm 0,1$	$25,5 \pm 0,2$
0,175	7	$19,8 \pm 0,1$	$23,0 \pm 0,1$	$21,0 \pm 0,1$	$25,5 \pm 0,2$
0,200	8	$19,2 \pm 0,1$	$24,0 \pm 0,1$	$20,3 \pm 0,1$	$25,5 \pm 0,2$
0,250	10	$19,2 \pm 0,1$	$24,0 \pm 0,1$	$19,4 \pm 0,1$	$24,4 \pm 0,2$
0,375	15	-	$24,0 \pm 0,1$	-	$24,4 \pm 0,2$
0,500	20	teilweise irreversibel			
0,750	30	vollständig irreversibel			

Tabelle 4: Phasenübergangstemperatur  $T_m$  der DMPC-Vesikel ( $[DMPC] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Abhängigkeit von der Surfactin-Konzentration (Lichtstreuungs-Experiment).

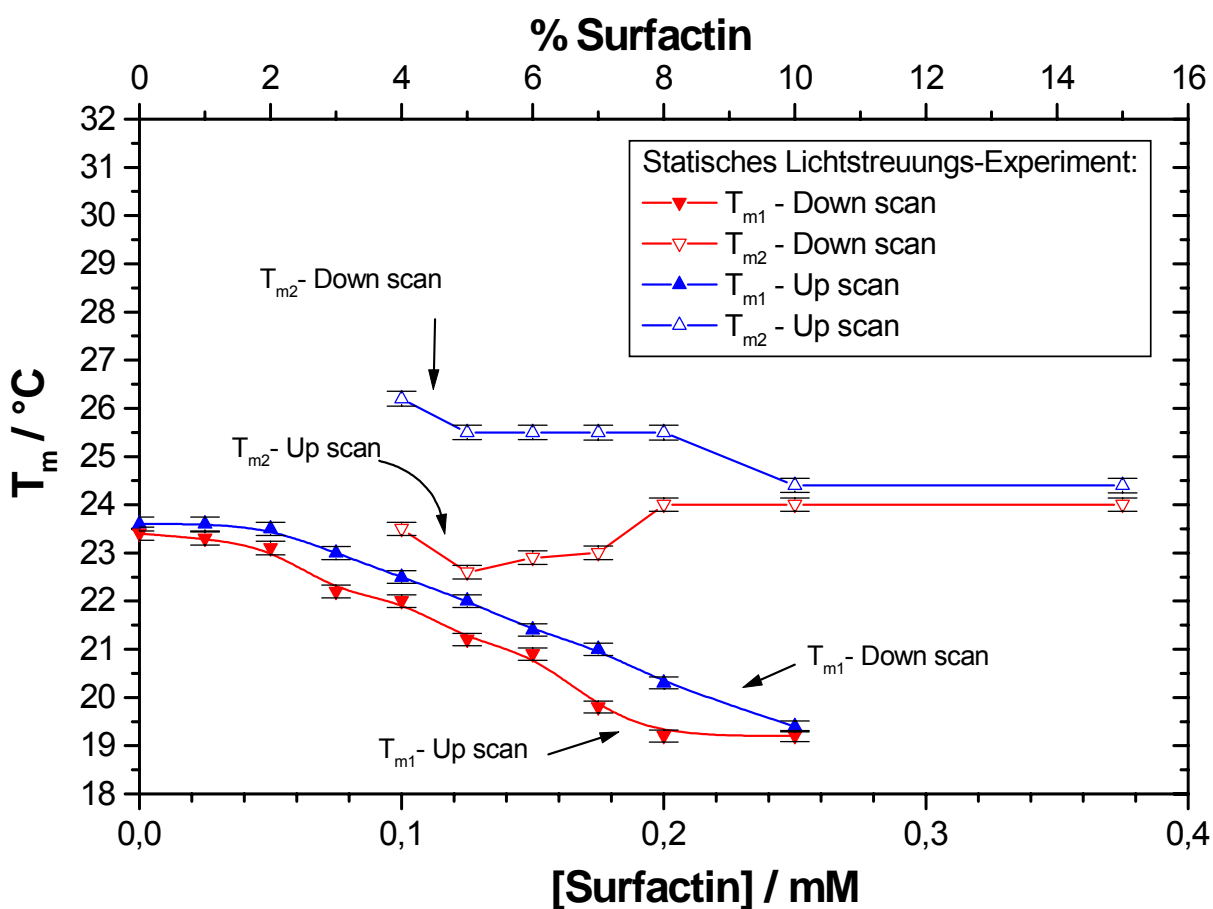


Abb. 25: Phasenübergangstemperatur  $T_m$  der DMPC-Vesikel ( $[DMPC] = 2,5 \text{ mM}$ ) als Funktion von der Surfactin-Konzentration.

Tabelle 4 und Abbildung 25 verdeutlichen, dass mit steigender Surfactin-Konzentration sowohl bei Down scan als auch bei Up scan die Umwandlungstemperatur  $T_{m1}$  von DMPC-Surfactin nahezu linear abnimmt. Gleichzeitig beobachtet man zunehmende Hysterese-Effekte bis zu ca. 8 Mol% Surfactin. Wie bei den DSC-Messungen (s. Abb. 14) ist hier die Abnahme von  $T_{m1}$  deutlich stärker als von  $T_{m2}$ , das praktisch temperaturunabhängig ist. Bei einem Durchlauf von höherer zu niedrigerer Temperatur verschiebt sich  $T_{m1}$  von  $23,4 \text{ °C}$  in Abwesenheit von Surfactin bis auf  $19,2 \text{ °C}$  bei 10 Mol% Surfactin. In umgekehrter Scan-Richtung ergibt sich eine Temperaturverschiebung von  $23,6 \text{ °C}$  auf  $19,4 \text{ °C}$ . Oberhalb 15 Mol% Surfactin liegen irreversible Prozesse vor. Hier kann  $T_{m2}$  nicht mehr ermittelt werden.

### 4.1.3 Kryoelektronenmikroskopie

Die Struktur der aus den DSC- und Lichtstreuungsdaten abgeleiteten DMPC-Surfactin-Aggregate wurde mit Hilfe der Kryoelektronenmikroskopie sichtbar gemacht. Die Aufnahmen von DMPC-Surfactin sind in Abbildung 26 – 30 dargestellt.

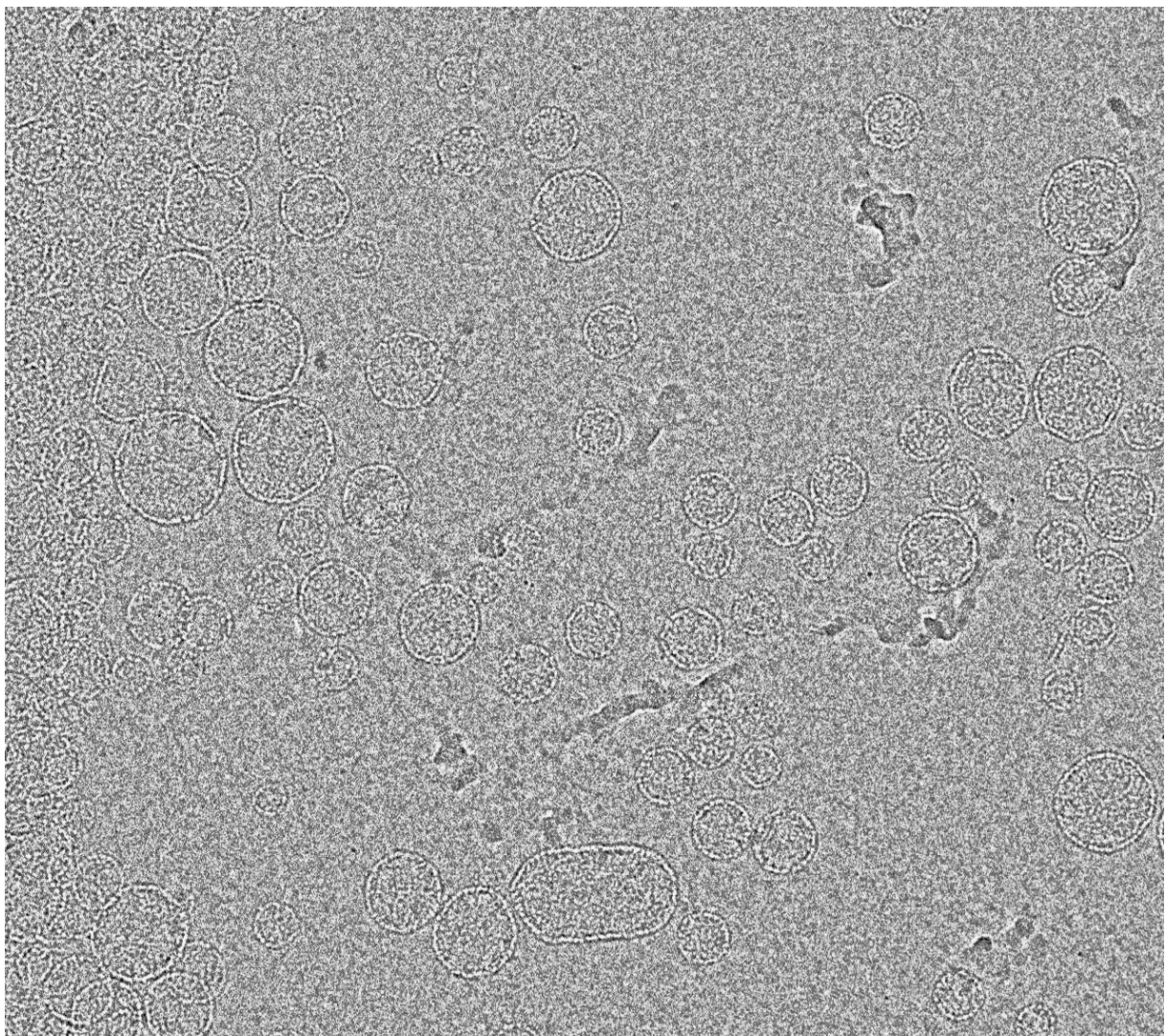
Abbildung 26 zeigt eine kryoelektronenmikroskopische Aufnahme von reinen DMPC-Vesikeln oberhalb ihrer Phasenübergangstemperatur. Sie zeigt eine gleichmäßige, runde äußere Form von unilamellaren Vesikeln in einem Durchmesser im Bereich von 50 – 100 nm. Diese bestehen aus Lipiddoppelschichten mit einer Dicke von 5 – 6 nm.

Abbildung 27 zeigt die Aufnahme der DMPC-Vesikel in Gegenwart von 2 Mol% Surfactin oberhalb des Phasenübergangs. Die Vesikel weisen bei dieser Surfactin-Konzentration noch eine runde Form auf, jedoch kommt es bereits zur Ausprägung von Segmenten der Oberfläche, die auf Konformationsänderungen in den Vesikeln hindeutet. Sowohl deren Durchmesser als auch die Dicke der Lipiddoppelschichten entsprechen den Parametern reiner DMPC-Vesikel.

Abbildung 28 und 29 zeigen die Aufnahmen von DMPC-Vesikeln in Gegenwart von 4 Mol% Surfactin. Die DMPC-Surfactin-Lösungen wurden hier bei Starttemperaturen von 20 °C (unterhalb der Phasenübergangstemperatur) bzw. 28 °C (oberhalb der Phasenübergangstemperatur) eingefroren. Diese Aufnahmen zeigen zwei Formen von DMPC-Surfactin-Aggregaten, und zwar kugelförmige und linear lamellare, die offensichtlich Bruchstücke der Vesikel darstellen. Die vesikulären Aggregate entsprechen denen, die bereits bei 2 Mol% Surfactin beobachtet wurden. Die linear lamellaren Aggregate besitzen eine Länge von 50 – 100 nm und eine Breite von 5 – 7 nm. Diese Ergebnisse veranschaulichen die DSC- und Lichtstreuungsmessungen, die ab 4 Mol% Surfactin auf zwei unterschiedliche Konformationszustände hinweisen (s. Abb. 11 und 17).

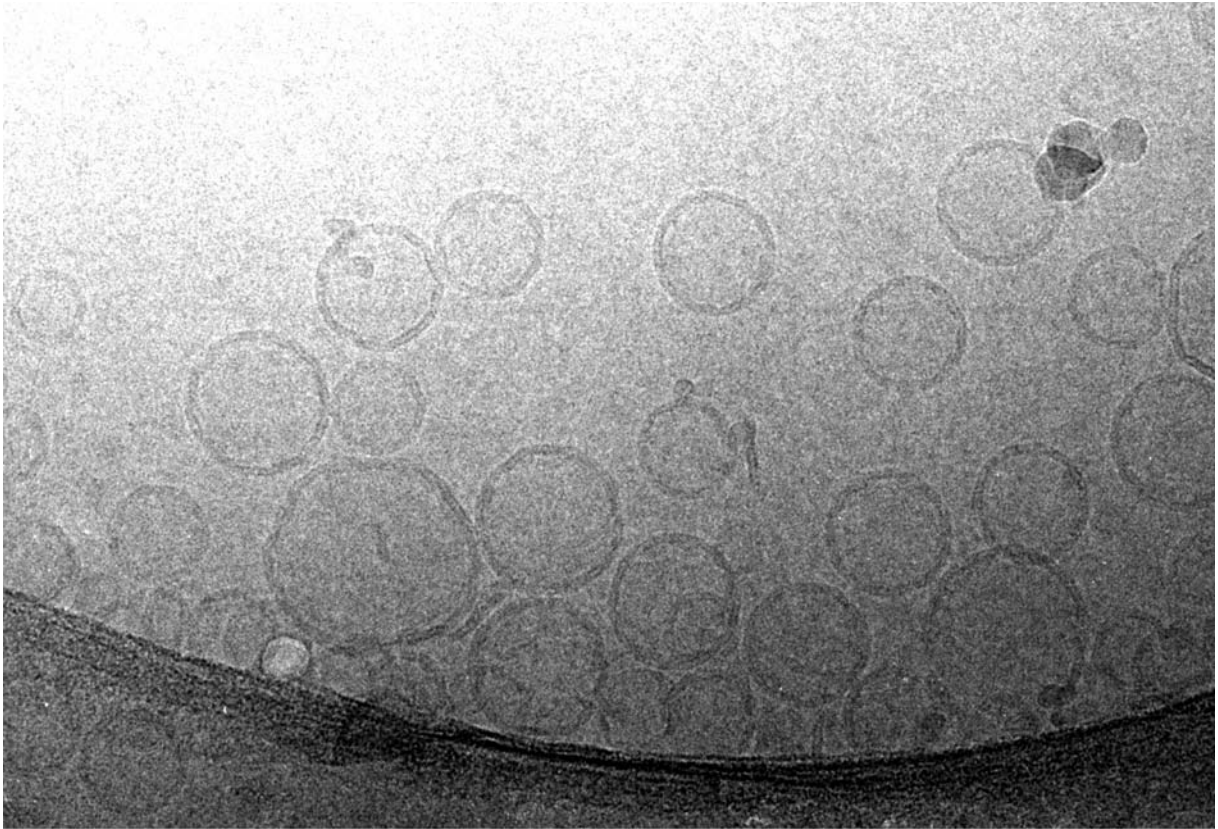
Die Aufnahmen von DMPC-Vesikeln in Gegenwart von 8 Mol% Surfactin sind in Abbildung 30 dargestellt. Hier liegen hauptsächlich die lamellaren Bruchstücke der DMPC-Vesikel vor, die bereits bei 4 Mol% Surfactin beobachtet werden.

Die linear lamellaren DMPC-Surfactin-Aggregate haben eine Länge von 50 – 150 nm und eine Breite von 5 – 7 nm. Vesikuläre Aggregate sind bei dieser Surfactin-Konzentration praktisch nicht mehr nachweisbar. Oberhalb von 20 Mol% Surfactin waren die DMPC-Surfactin-Aggregate so klein, so dass sie elektronenmikroskopisch nicht mehr aufgelöst werden konnten. Ihre Struktur wurde mit Hilfe der Neutronenkleinwinkelstreuung charakterisiert.



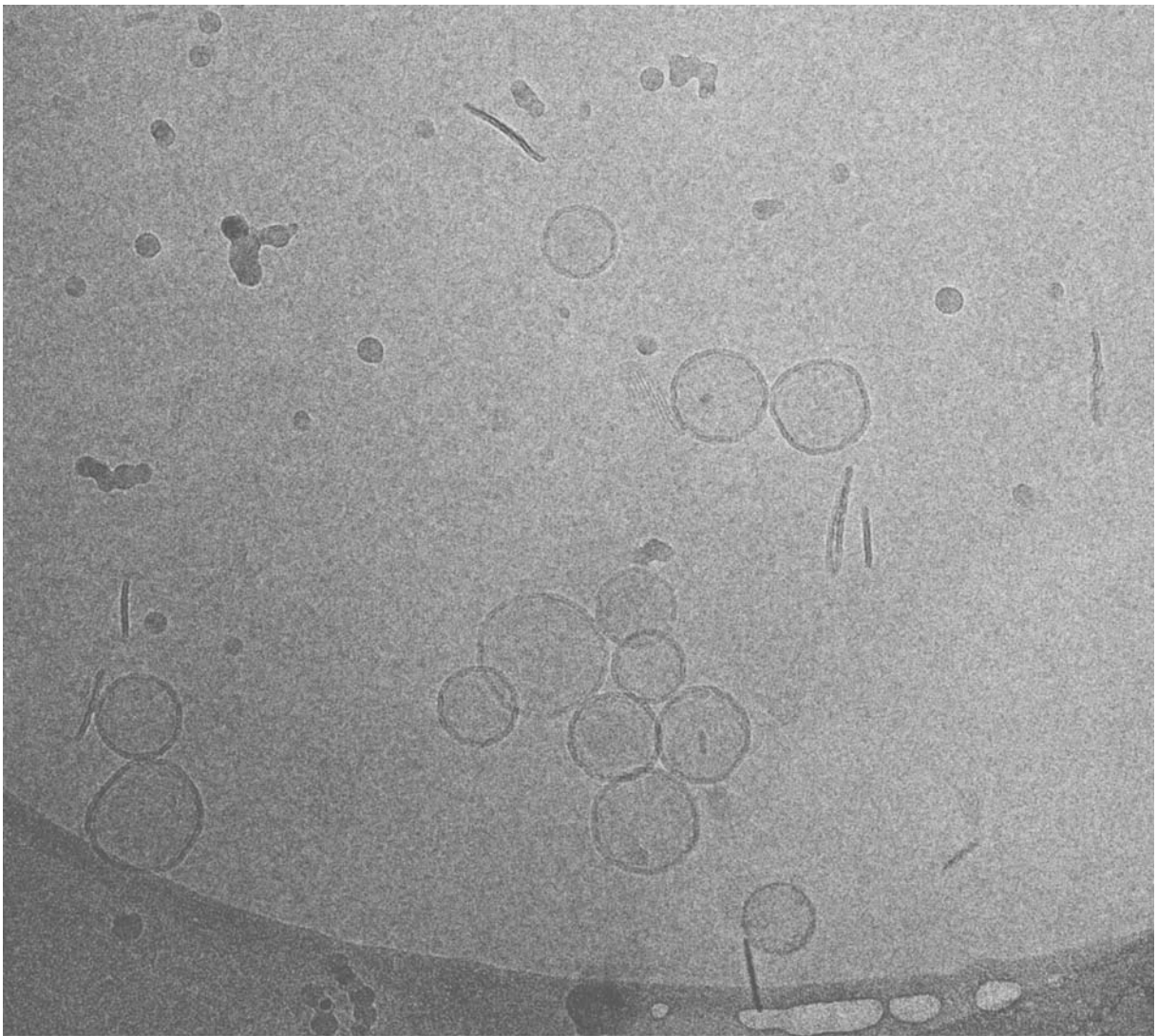
100 nm

Abb. 26: Kryoelektronenmikroskopie von reinen DMPC-Vesikeln ( $[DMPC] = 2,5 \text{ mM}$ ); Die Vesikel-Lösung wurde mit einer Abkühlgeschwindigkeit von  $10^4 \text{ K/s}$  eingefroren. Die Starttemperatur von  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  lag oberhalb der Phasenübergangstemperatur.



100 nm

Abb. 27: Kryoelektronenmikroskopie von DMPC-Vesikeln ( $[DMPC] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 2 Mol% (0,05 mM) Surfactin; Die DMPC-Surfactin-Lösung wurde mit einer Abkühlgeschwindigkeit von  $10^4 \text{ K/s}$  eingefroren. Die Starttemperatur von  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  lag oberhalb der Phasenübergangstemperatur.



100 nm

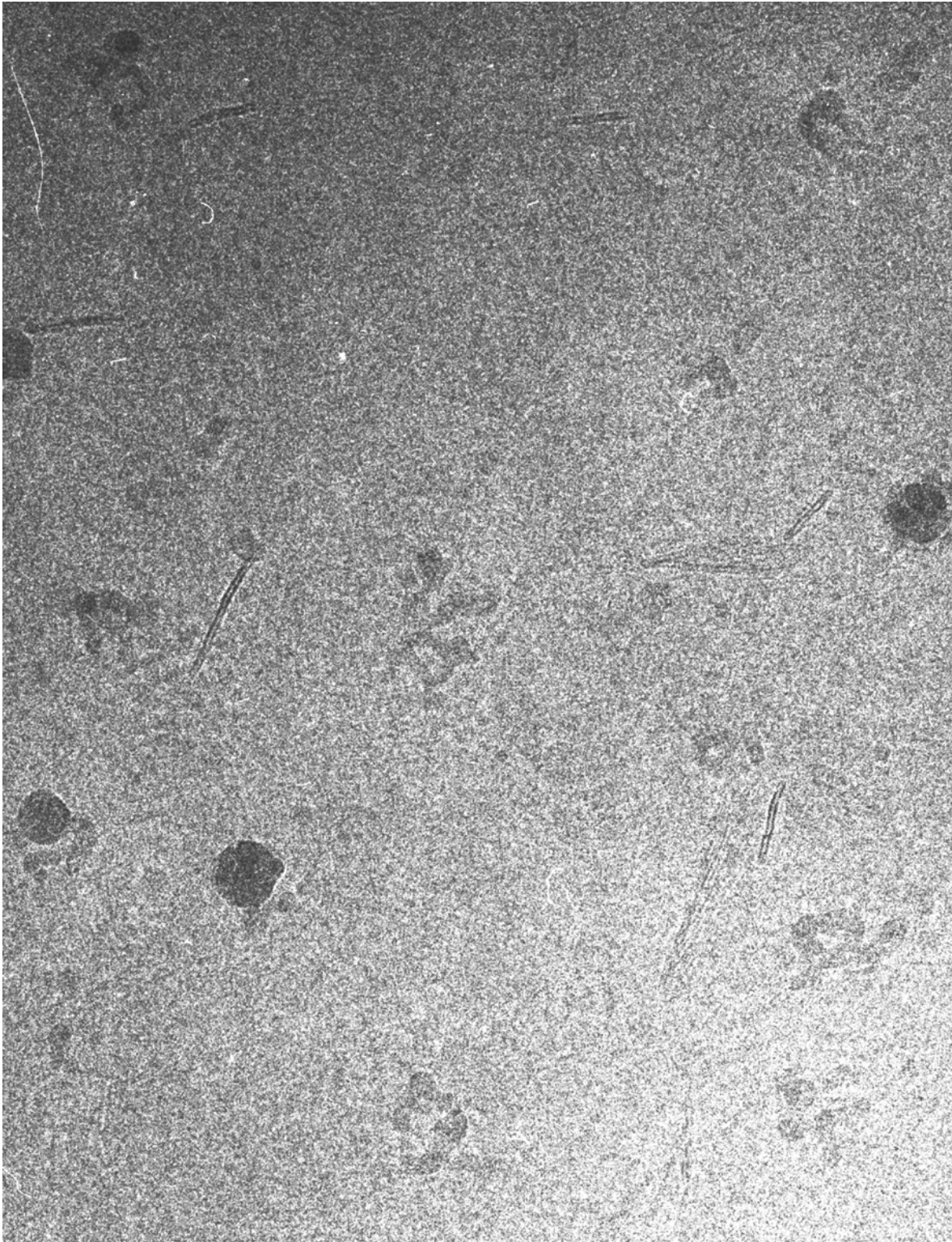
Abb. 28: Kryoelektronenmikroskopie von DMPC-Vesikeln ( $[DMPC] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 4 Mol% (0,1 mM) Surfactin; Die DMPC-Surfactin-Lösung wurde mit einer Abkühlgeschwindigkeit von  $10^4 \text{ K/s}$  eingefroren. Die Starttemperatur von  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  lag unterhalb der Phasenübergangstemperatur.





100 nm

Abb. 29: Kryoelektronenmikroskopie von DMPC-Vesikeln ( $[DMPC] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 4 Mol% (0,1 mM) Surfactin; Die DMPC-Surfactin-Lösung wurde mit einer Abkühlgeschwindigkeit von  $10^4 \text{ K/s}$  eingefroren. Die Starttemperatur von  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  lag oberhalb der Phasenübergangstemperatur.



100 nm

Abb. 30: Kryoelektronenmikroskopie von DMPC-Vesikeln ( $[DMPC] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 8 Mol% (0,2 mM) Surfactin; Die DMPC-Surfactin-Lösung wurde mit einer Abkühlgeschwindigkeit von  $10^4 \text{ K/s}$  eingefroren. Die Starttemperatur von  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  lag oberhalb der Phasenübergangstemperatur.

#### 4.1.4 Neutronenkleinwinkelstreuungsexperimente (SANS)

Die Lichtstreuungsexperimente zeigen, dass die DMPC-Surfactin-Wechselwirkung oberhalb von 20 Mol% Surfactin irreversibel ist. Ab dieser Surfactin-Konzentration tritt eine weitere Aggregationsform auf, die mit Hilfe von Neutronenkleinwinkelstreuung untersucht wurde. Hierbei handelt es sich sehr wahrscheinlich um DMPC-Surfactin-Mischmicellen. Die Experimente wurden bei einer Temperatur von 29 °C durchgeführt (s. Kapitel 3.4.1).

Abbildung 31 zeigt die Streulichtintensität  $I(Q)$  als Funktion des Streuvektors  $Q$  von DMPC-Vesikeln in Gegenwart von 30 Mol% Surfactin. Die Streukurve wurde durch zwei theoretische Modelle angenähert und zwar durch kleine ellipsoide Aggregate von oblater oder prolater Form. Die beste Anpassung wurde für oblate DMPC/Surfactin-Mischmicellen mit einem Radius  $R_1$  von etwa 5,1 nm und einem Radius  $R_3$  von etwa 1,6 nm bzw. für prolate Mischmicellen mit Radien  $R_1$  und  $R_3$  von 2,9 nm bzw. 7 nm erhalten.

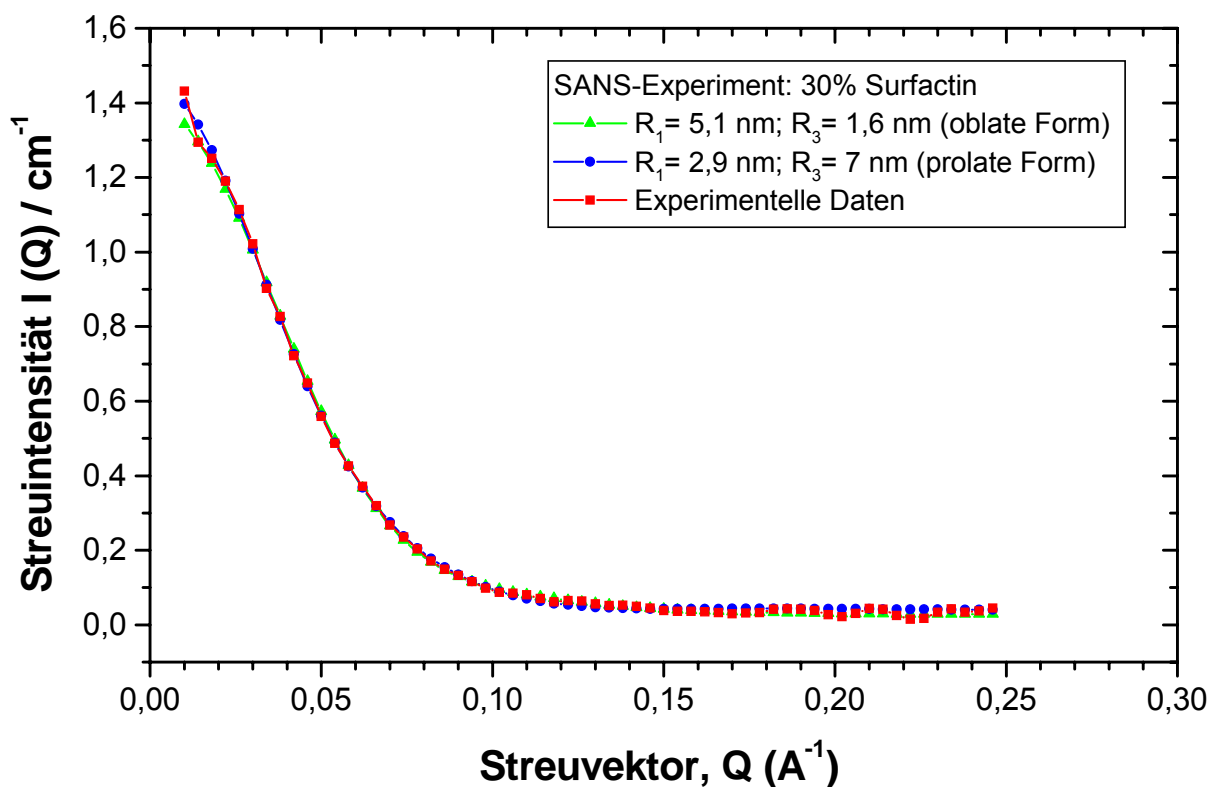


Abb. 31: Streulichtintensität  $I(Q)$  als Funktion des Streuvektors  $Q$  von DMPC-Vesikeln ( $[\text{DMPC}] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 30 Mol% ( $0,75 \text{ mM}$ ) Surfactin.

#### 4.1.5 Temperatursprung-Experimente (Poor Man's Temperatursprung)

Temperatursprung-Experimente wurden angewendet, um die Relaxationszeiten langsamer Veränderungen bei der Hauptphasenumwandlung der DMPC-Vesikel und ihre Wechselwirkung mit Surfactin zu ermitteln. Diese Messungen waren nur im Bereich vesikulärer Aggregate bis zu 4 Mol% Surfactin möglich. Die entsprechenden Relaxationsprozesse beobachtet man in Zeitbereich von ca. 30 – 100 s. Sie machen ca. 8% des Gesamtsignals aus. Die Messergebnisse bei einer DMPC-Konzentration von 2,5 mM in Gegenwart von 0 bis 4 Mol% Surfactin werden in Abbildung 32 – 36 dargestellt. Es wurden sowohl Temperatursprünge von höherer zu niedrigerer Temperatur (T-Sprung abwärts) als auch von niedrigerer zu höherer Temperatur (T-Sprung aufwärts) durchgeführt. Die zeitlichen Änderungen der Streuintensität wurden bei einer Wellenlänge von 350 nm und einem Streuwinkel von 90° gemessen. Diese Streusignale wurden hierbei bis 100 s verfolgt (s. Kapitel 3.5.1). Die Relaxationszeiten  $\tau$  (s) wurden durch Anpassung der Streukurven mit Hilfe des Auswerteprogramms Origin ermittelt (s. Kapitel 3.5.2). Die kinetischen Messungen zeigen zwei Relaxationsprozesse. Die Relaxationszeit des schnelleren Prozesses konnten nicht aufgelöst werden, da er in der Totzeit des Gerätes (ca. 5 s) lag. Für den langsamen Prozess bei der Hauptphasenumwandlung im Falle reiner DMPC-Vesikel ergab sich eine Relaxationszeit  $\tau$  von ca. 29,8 s (s. Abb. 32). Sie nimmt mit wachsender Surfactin-Konzentration ab. Schon bei 1 Mol% Surfactin beobachtet man eine Verminderung von  $\tau$  um ca. 5 s (s. Abb. 33). Bei 4 Mol% Surfactin ist  $\tau$  auf ca. 11,3 s reduziert (s. Abb. 34 – 36). Die Resultate zeigen, dass Surfactin den langsamen Umwandlungsprozess von DMPC-Vesikeln beschleunigt.

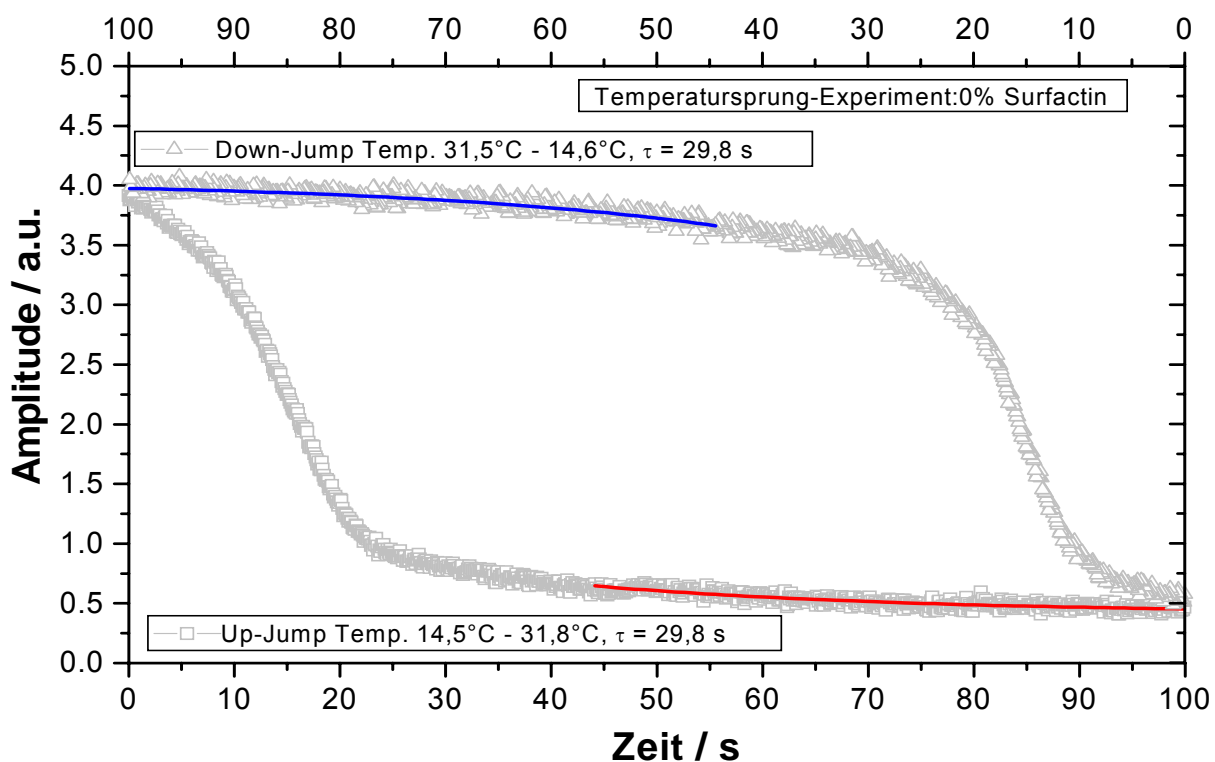


Abb. 32: Streuintensität als Funktion von der Zeit im Temperatursprung-Experiment an DMPC-Vesikeln ( $[DMPC] = 2,5$  mM).

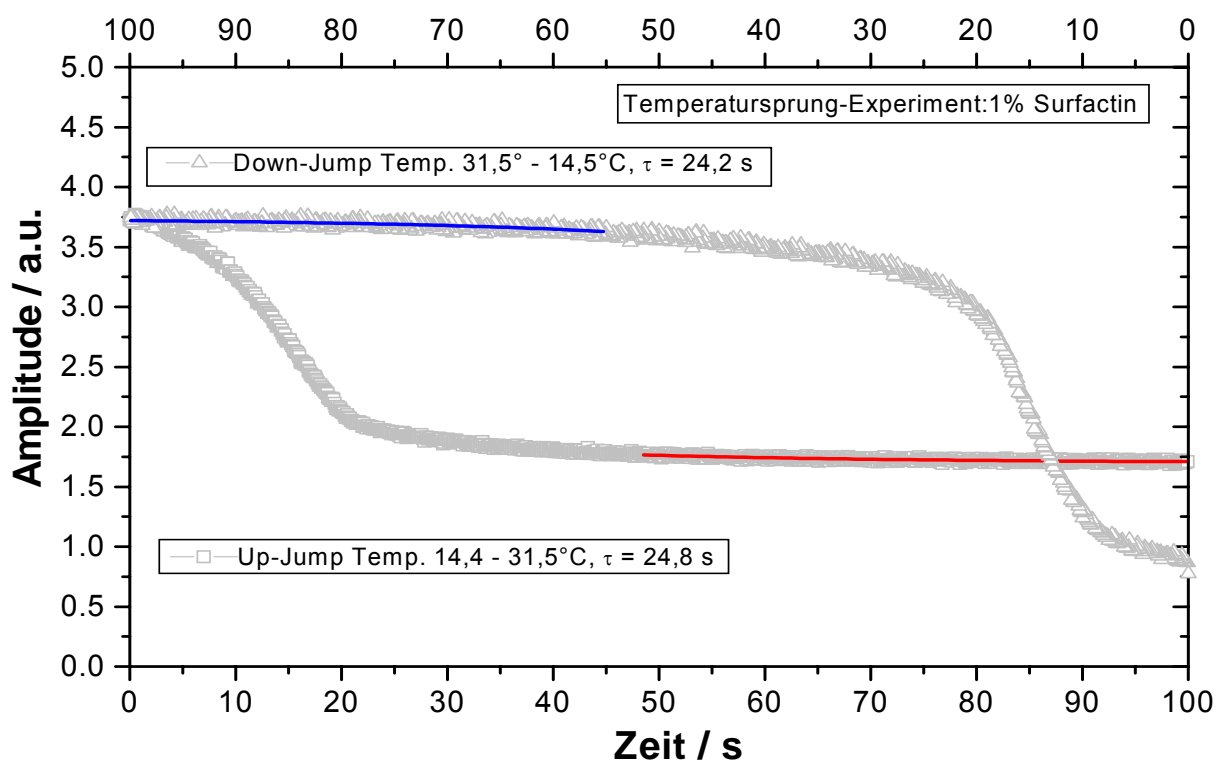


Abb. 33: Streuintensität als Funktion von der Zeit im Temperatursprung-Experiment an DMPC-Vesikeln ( $[DMPC] = 2,5$  mM) in Gegenwart von 1 Mol% Surfactin.

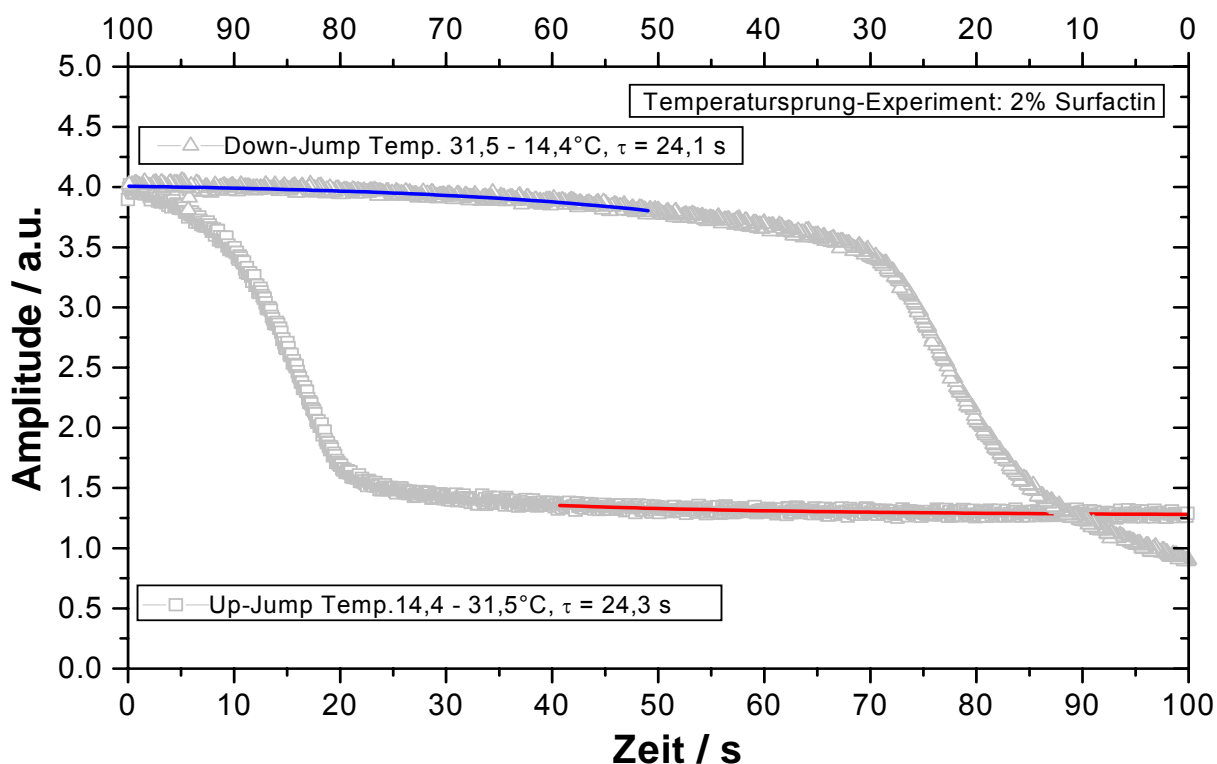


Abb. 34: Streuintensität als Funktion von der Zeit im Temperatursprung-Experiment an DMPC-Vesikeln ( $[DMPC] = 2,5$  mM) in Gegenwart von 2 Mol% Surfactin.

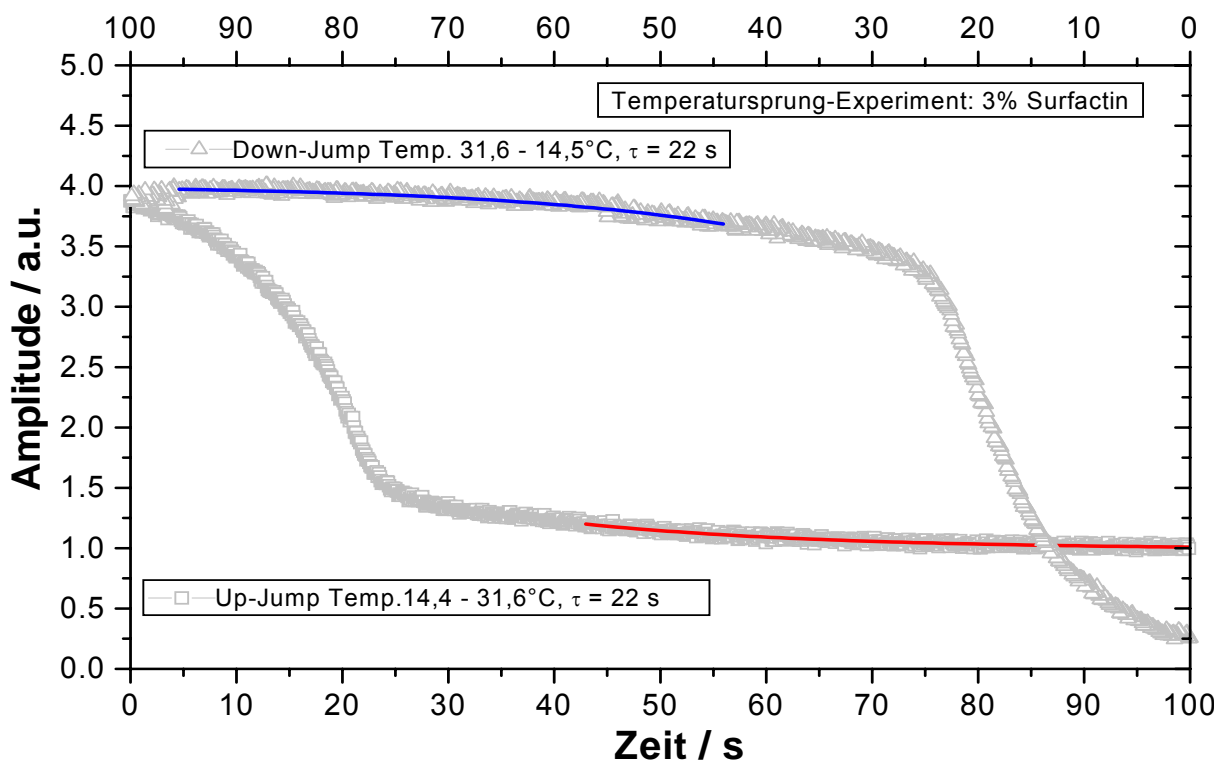


Abb. 35: Streuintensität als Funktion von der Zeit im Temperatursprung-Experiment an DMPC-Vesikeln ( $[DMPC] = 2,5$  mM) in Gegenwart von 3 Mol% Surfactin.

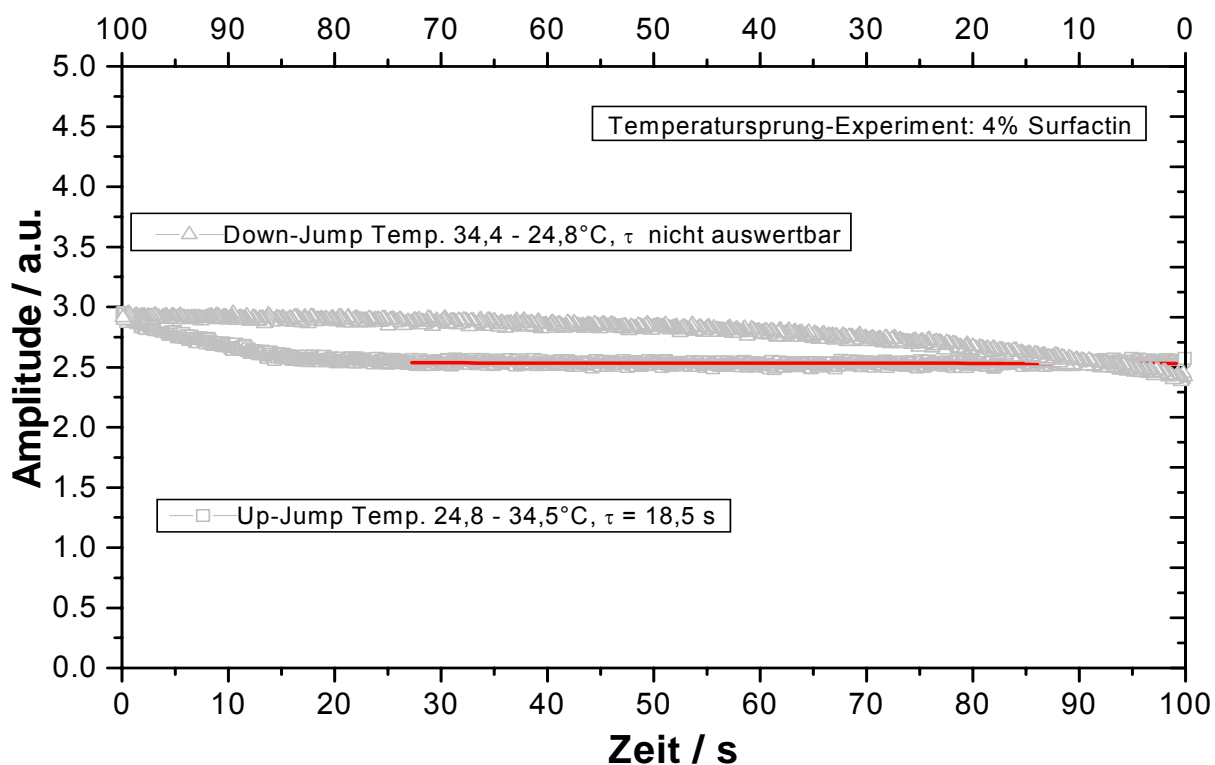


Abb. 36: Streuintensität als Funktion von der Zeit im Temperatursprung-Experiment an DMPC-Vesikeln ( $[DMPC] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 4 Mol% Surfactin.

Surfactin-Konzentration		Relaxationszeiten	
		$\tau_{\text{down-jump}}$	$\tau_{\text{up-jump}}$
mM	Mol%	s	s
0,000	0	$29,8 \pm 1,5$	$29,8 \pm 1,5$
0,025	1	$24,2 \pm 1,2$	$24,8 \pm 1,2$
0,050	2	$24,1 \pm 1,2$	$24,3 \pm 1,2$
0,075	3	$22,0 \pm 1,1$	$22,0 \pm 1,1$
0,100	4	nicht auswertbar	$18,5 \pm 0,9$

Tabelle 5: Relaxationszeit  $\tau$  (s) für die langsame Konformationsänderung bei der Phasenumwandlung von DMPC-Vesikeln ( $[DMPC] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Abhängigkeit von der Surfactin-Konzentration (Temperatursprung-Experiment).



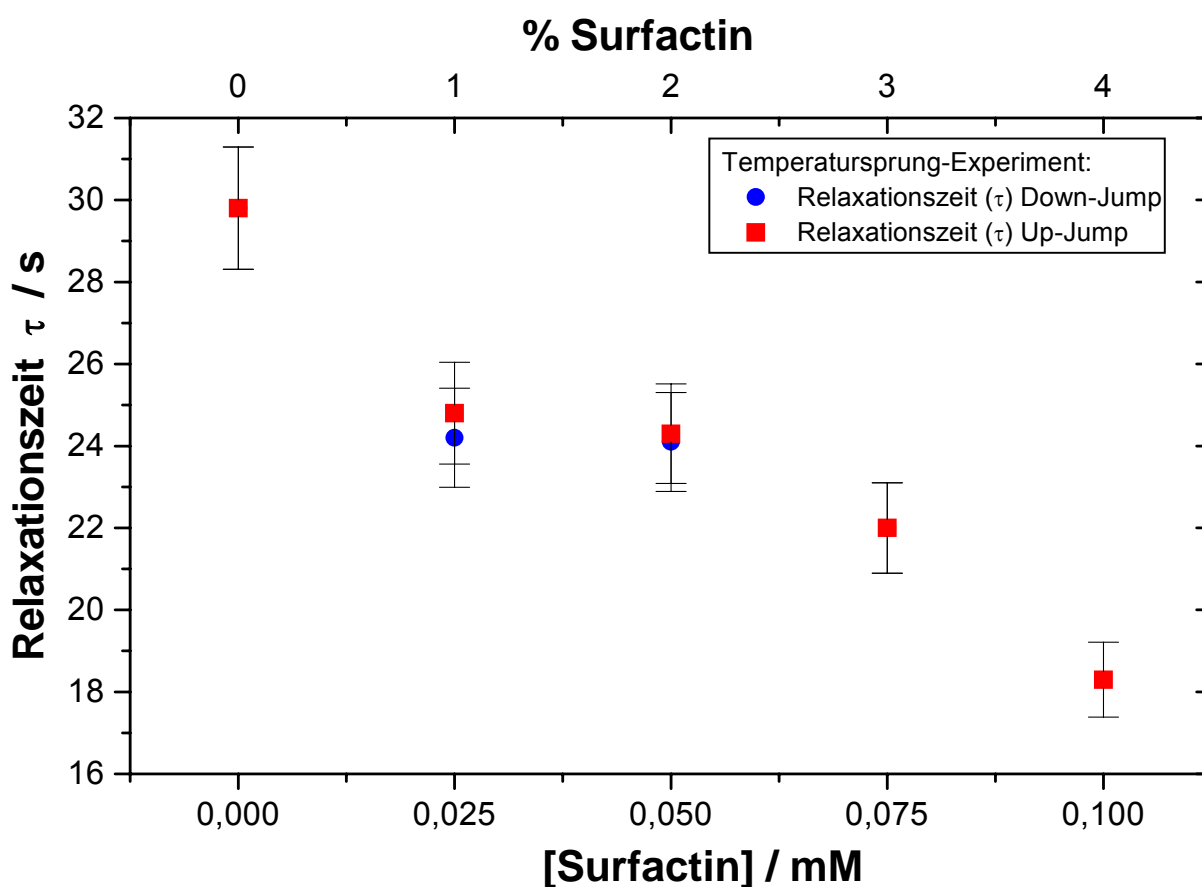


Abb. 37: Relaxationszeit  $\tau$  (s) für die langsame Konformationsänderung bei der Phasenumwandlung von DMPC-Vesikeln ( $[DMPC] = 2,5 \text{ mM}$ ) als Funktion der Surfactin-Konzentration.

Tabelle 5 und Abbildung 37 zeigen sowohl für Down-Jump als auch für Up-Jump keinen signifikanten Unterschied der Relaxationszeiten  $\tau_{\text{down}}$  bzw.  $\tau_{\text{up}}$  für die langsame Konformationsänderung. In beiden Fällen beobachtet man eine Abnahme der Relaxationszeiten in Abhängigkeit von der Surfactin-Konzentration. Beim Down-Jump verkürzt sich die Relaxationszeit ( $\tau_{\text{down}}$ ) von 29,8 s bei 0 Mol% Surfactin auf 22 s bei 3 Mol% Surfactin. Entsprechend nimmt im Falle des Up-Jumps  $\tau_{\text{up}}$  von 29,8 s bei 0 Mol% Surfactin auf 18,5 s bei 4 Mol% Surfactin ab.



## 4.2 Wechselwirkung des Lipopeptides Surfactin mit DPPC-Vesikeln

### 4.2.1 Differential-Scanning-Kalorimetrie (DSC)

Der Einfluss von Surfactin auf die endotherme Hauptphasenumwandlung von DPPC-Vesikeln wird in Abbildung 38 – 40 und in Tabelle 6 dargestellt. Die Messungen wurden bei steigendem Temperatur-scan mit einer Aufheizrate von 0,5 °C/min durchgeführt (s. Kapitel 3.1.1). Der pH-Wert der Surfactin-DPPC-Lösungen lag bei pH 7,5 (s. Kapitel 2.3).

Strukturelle Veränderungen der DPPC-Vesikel beobachtet man ab 4 Mol% Surfactin. Die Phasenübergangstemperatur  $T_{m1}$  des ersten Peaks von DPPC-Vesikeln (1.DSC-Peak) verschiebt sich von 40,3 °C auf 39,9 °C (s. Abb. 38).

Bei einer Surfactin-Konzentration von 10 Mol% beobachtet man die Ausbildung einer Schulter, der eine niedrigere Umwandlungstemperatur  $T_{m2}$  zuzuordnen ist. Ab 15 Mol% entwickelt sich ein zweiter Peak bei ca. 35 °C. Gleichzeitig verschiebt sich die dem ersten Peak zuzuordnende Umwandlungstemperatur weiter zu niedrigerer Temperatur (s. Abb. 39). Bei 10 Mol% Surfactin erreicht die gesamte Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{cal\ ges}$  ihr Maximum.

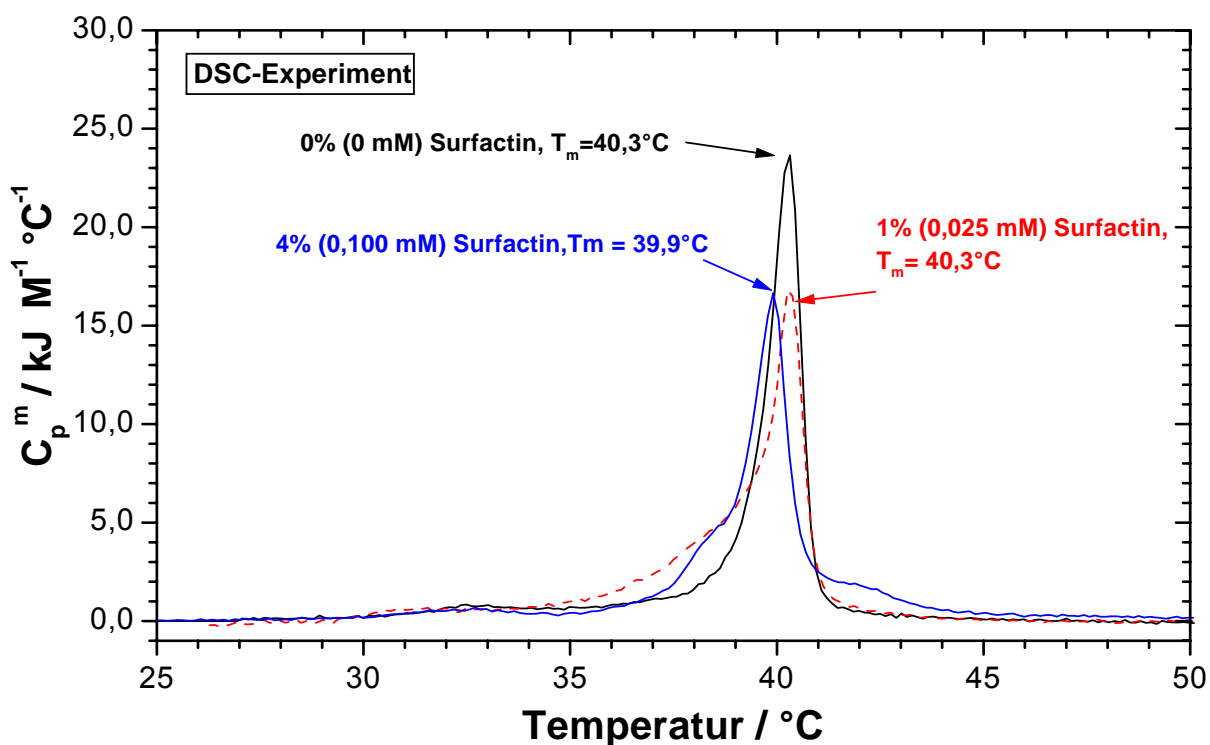


Abb. 38: Thermogramm für DPPC-Vesikel ([DPPC] = 2,5 mM) in Gegenwart von 0 bis 4 Mol% Surfactin.

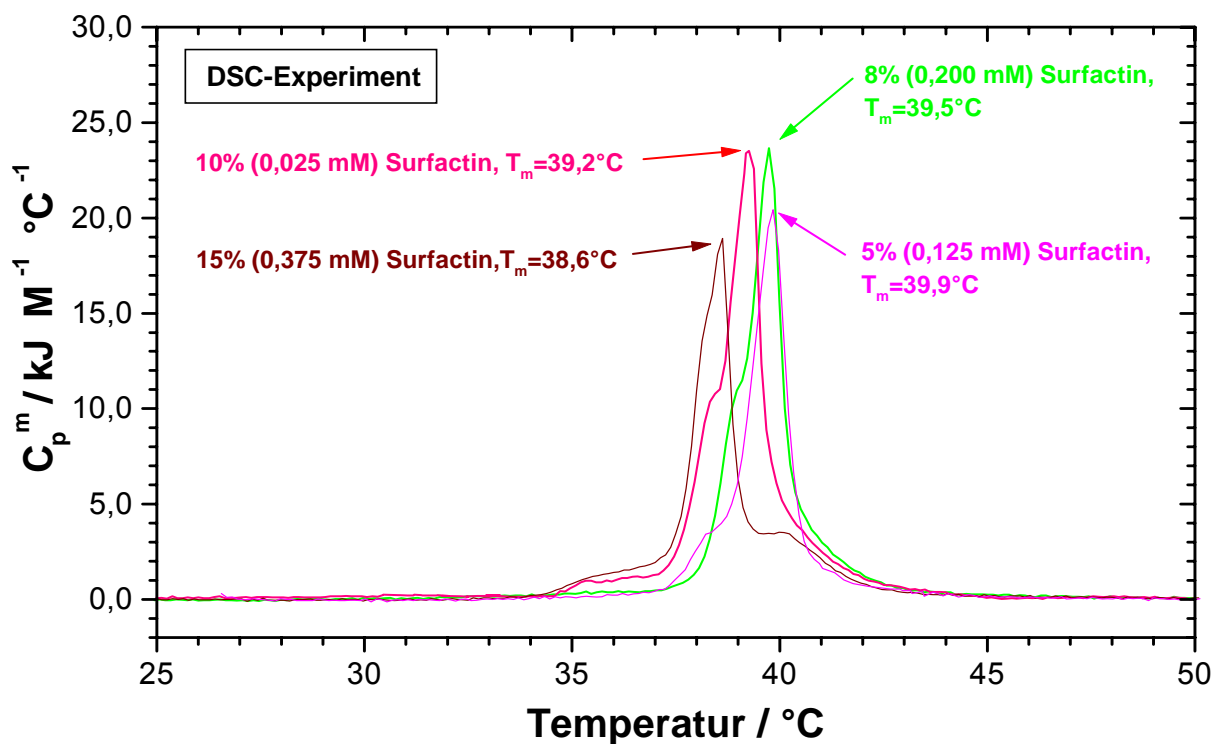


Abb. 39: Thermogramm für DPPC-Vesikel ([DPPC] = 2,5 mM) in Gegenwart von 5 bis 15 Mol% Surfactin.

Ab 20 Mol% Surfactin beobachtet man deutlich zwei Peaks (s. Abb. 40). Der zweite Peak ist sehr breit, so dass hier die beiden Peaks im Thermogramm nicht durch Gaußfunktionen angenähert und separiert werden konnten. Damit bezieht sich die gesamte Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{\text{cal}_{\text{ges}}}$  und deren Abhängigkeit von der Surfactin-Konzentration auf die beiden Umwandlungsprozesse. Die Abhängigkeit der Umwandlungstemperatur  $T_m$  von der Surfactin-Konzentration konnte nur für den ersten DSC-Peak ermittelt werden.

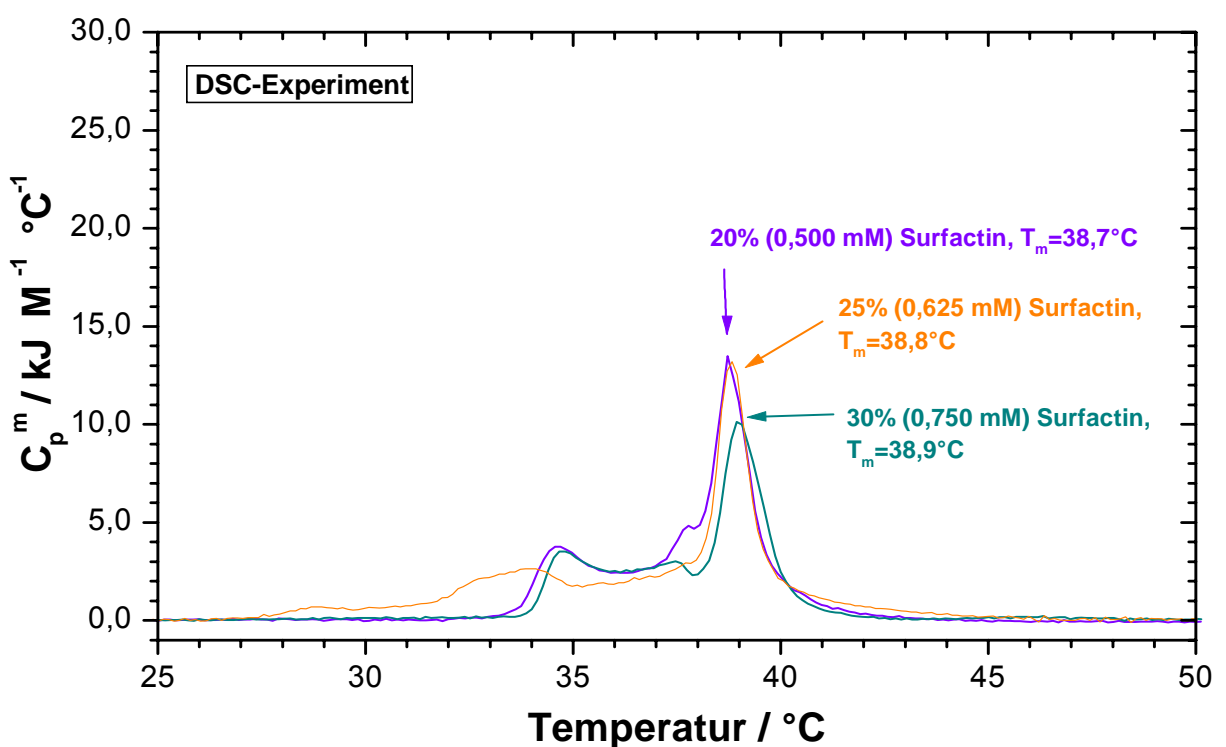


Abb. 40: Thermogramm für DPPC-Vesikel ( $[\text{DPPC}] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 20 bis 30 Mol% Surfactin.

Surfactin-Konzentration		Hauptphasenumwandlung der DPPC-Vesikel	
		$T_{m1}$ des 1.DSC-Peaks	$\Delta H_{cal}$
mM	Mol%	°C	kJ / M
0,000	0	$40,3 \pm 0,1$	$34,5 \pm 1,7$
0,025	1	$40,3 \pm 0,1$	$34,8 \pm 1,7$
0,050	2	$40,2 \pm 0,1$	$34,9 \pm 1,7$
0,075	3	$40,2 \pm 0,1$	$34,9 \pm 1,7$
0,100	4	$39,9 \pm 0,1$	$35,1 \pm 1,8$
0,125	5	$39,9 \pm 0,1$	$35,7 \pm 1,8$
0,200	8	$39,5 \pm 0,1$	$36,5 \pm 1,8$
0,250	10	$39,2 \pm 0,1$	$37,8 \pm 1,9$
0,300	12	$38,8 \pm 0,1$	$32,1 \pm 1,7$
0,375	15	$38,6 \pm 0,1$	$32,1 \pm 1,6$
0,450	18	$38,6 \pm 0,1$	$30,2 \pm 1,5$
0,500	20	$38,7 \pm 0,1$	$30,1 \pm 1,5$
0,650	25	$38,8 \pm 0,1$	$29,6 \pm 1,5$
0,750	30	$38,9 \pm 0,1$	$26,6 \pm 1,3$

Tabelle 6: Einfluss von Surfactin auf die endotherme Hauptphasenumwandlung von DPPC-Vesikeln ([DPPC = 2,5 mM]) (DSC-Experiment).

$T_{m1}$  Umwandlungstemperatur für den ersten Umwandlungsprozess

$\Delta H_{cal}$  Gesamte Umwandlungsenthalpie für beide Umwandlungsprozesse

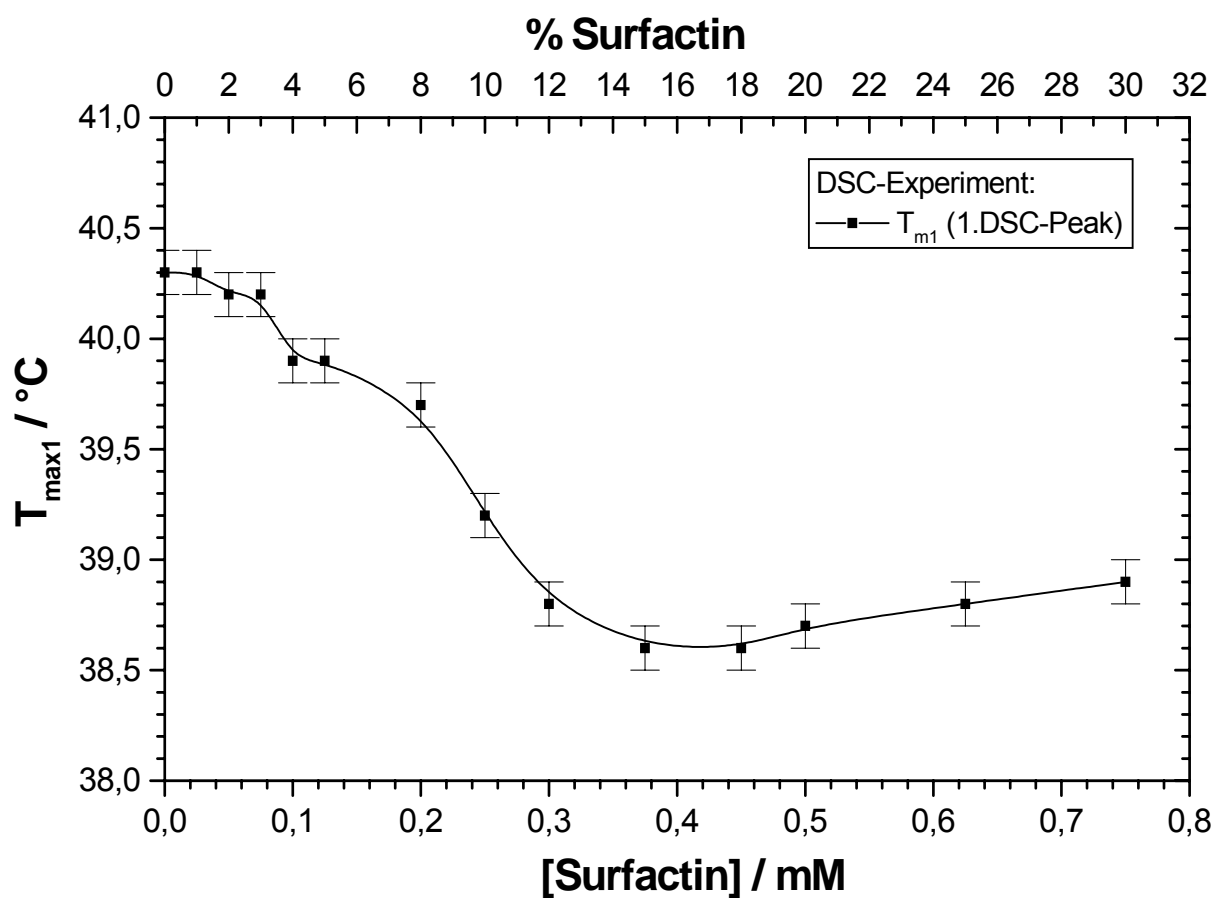


Abb. 41: Abhängigkeit der Umwandlungstemperatur ( $T_{\max 1}$ ) der DPPC-Vesikel ([DPPC] = 2,5 mM) von der Surfactin-Konzentration.

Die dem ersten Umwandlungsprozess entsprechende Umwandlungstemperatur  $T_{m1}$  verschiebt sich mit wachsender Surfactin-Konzentration leicht zu niedrigerer Temperatur.  $T_{m1}$  nimmt von 40,3°C in Abwesenheit von Surfactin bis auf 38,6°C bei 18 Mol% Surfactin nahezu linear ab. Oberhalb dieser Surfactin-Konzentration verändert sich  $T_{m1}$  nur noch wenig (s. Tab. 6 und Abb. 41).

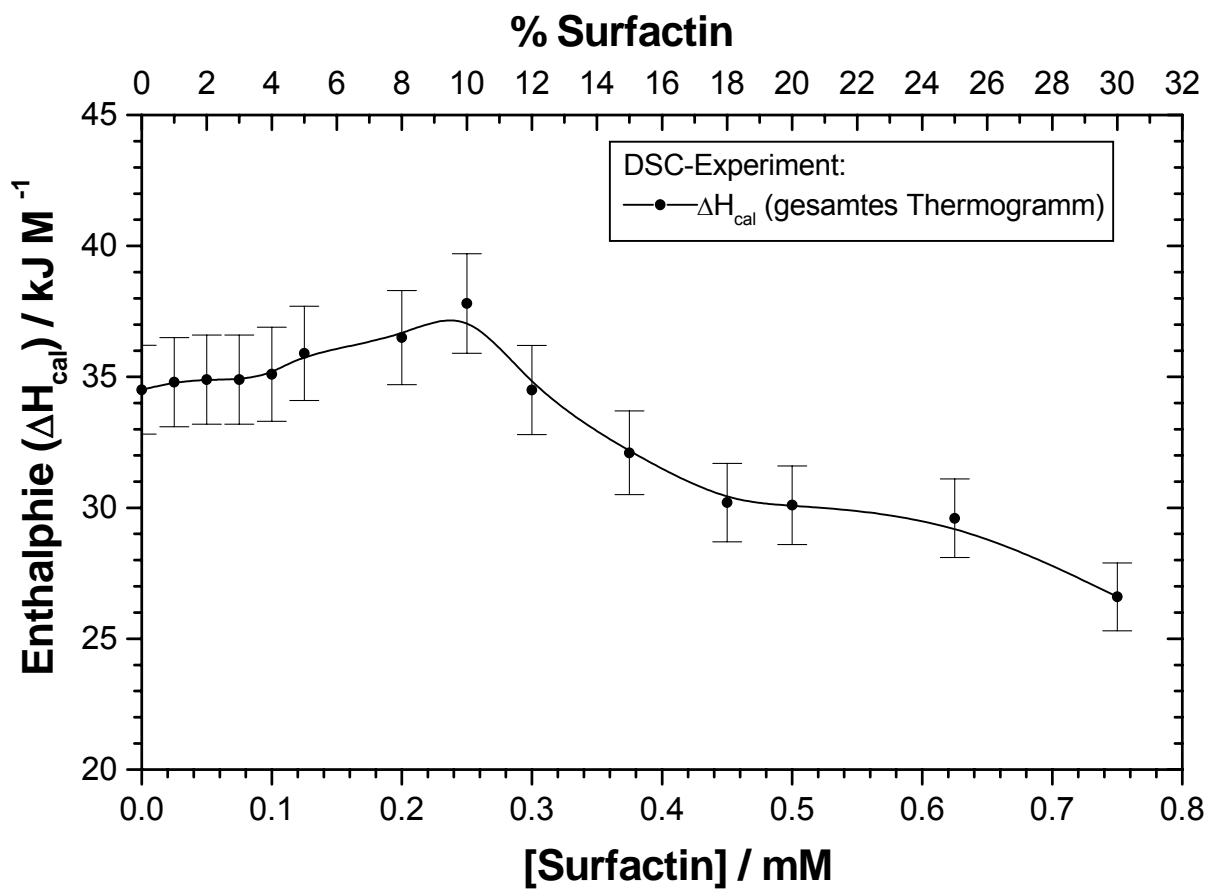


Abb. 42: Abhängigkeit der Umwandlungsenthalpie ( $\Delta H_{\text{cal}}$ ) der DPPC-Vesikel von der Surfactin-Konzentration.

Die gesamte Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{\text{calges}}$  der reinen DPPC-Vesikel beträgt  $34,5 \text{ kJ/M}$ . Sie nimmt bis  $10 \text{ Mol\%}$  Surfactin auf  $37,8 \text{ kJ/M}$  zu und fällt dann bis  $30 \text{ Mol\%}$  auf  $26,6 \text{ kJ/M}$  ab (s. Tab. 6 und Abb. 42).

#### 4.2.2 Statische Licht-Streuungs-Experimente

Die Ergebnisse der Licht-Streuungs-Experimente an DPPC-Vesikeln in Gegenwart von Surfactin werden in Abbildung 43 – 49 und Tabelle 7 dargestellt. Die Experimente wurden zuerst bei fallendem und danach bei steigendem Temperaturverlauf durchgeführt (s. Kapitel 3.2.1).

Wie bei den DSC-Messungen (s. Abb. 38) beobachtet man ab 4 Mol% Surfactin eine Verschiebung der Phasenübergangstemperatur  $T_{m1}$  zu niedrigeren Temperaturen (s. Abb. 43). Die Streuintensität der reinen DPPC-Vesikel nimmt hierbei wie im Falle von DMPC mit steigender Temperatur ab. Bis 5 Mol% Surfactin beobachtet man nur einen Hysterese-Effekt.

Bei 10 Mol% Surfactin prägt sich bei höherer Temperatur ein zweiter Hysterese-Effekt aus. Die Umwandlungstemperatur dieses zweiten Phasenübergangs ( $T_{m2}$ ) liegt bei 38,7 °C (Down-scan) bzw. 39,2 °C (Up-scan). Hierbei nimmt die Streuintensität von DPPC-Surfactin im Gegensatz zu reinen DPPC-Vesikeln mit steigender Temperatur zu (s. Abb. 45). Daraus lässt sich schließen, dass unter diesen Bedingungen DPPC-Surfactin zusätzlich in einer zweiten Aggregationsform vorliegt. Nach viermaligem Temperaturdurchlauf blieben die Messergebnisse bei allen Messungen im Bereich von 0 bis 20 Mol% Surfactin konstant, d.h. die Phasenübergänge waren reversibel.

Bei 25 Mol% Surfactin erreicht die Streuintensität bei einem viermaligen Temperaturdurchlauf nicht mehr den ursprünglichen Wert (s. Abb. 48 und 48b). Dieses Streuverhalten deutet auf einen teilweise irreversiblen Prozess hin. Ab 30 Mol% Surfactin zeigt die Streukurve kein Hysterese-Verhalten mehr. Dies bedeutet, dass ab dieser Surfactin-Konzentration die DPPC-Surfactin-Wechselwirkung vollständig irreversibel ist.

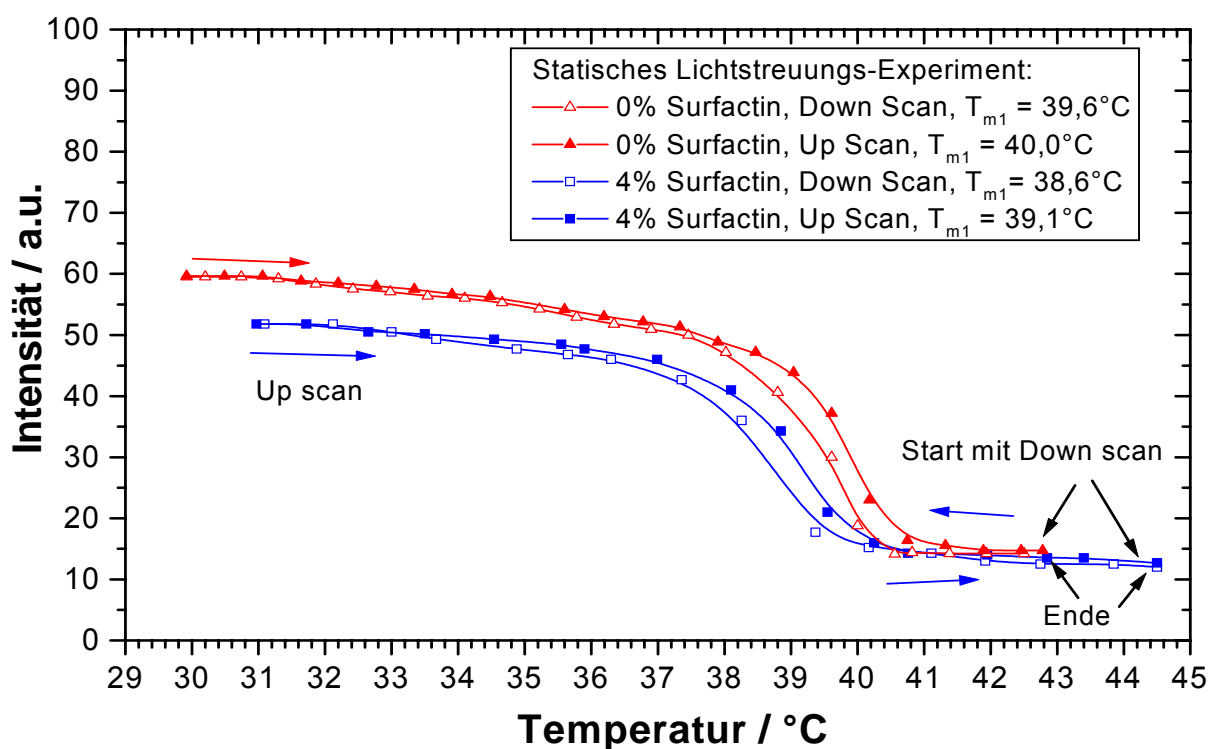


Abb. 43: Lichtstreuungsintensität von DPPC-Vesikeln ( $[\text{DPPC}] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 0 bis 4 Mol% Surfactin als Funktion der Temperatur.

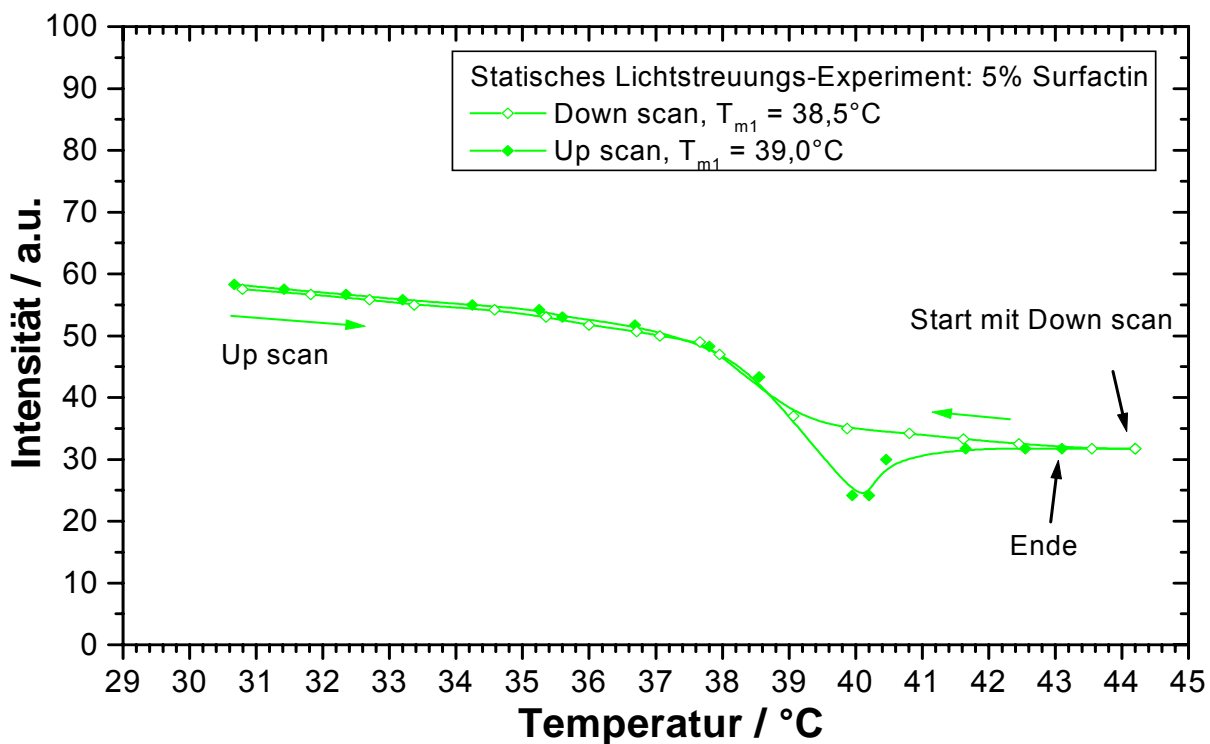


Abb. 44: Lichtstreuungsintensität von DPPC-Vesikeln ( $[\text{DPPC}] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 5 Mol% Surfactin als Funktion der Temperatur.



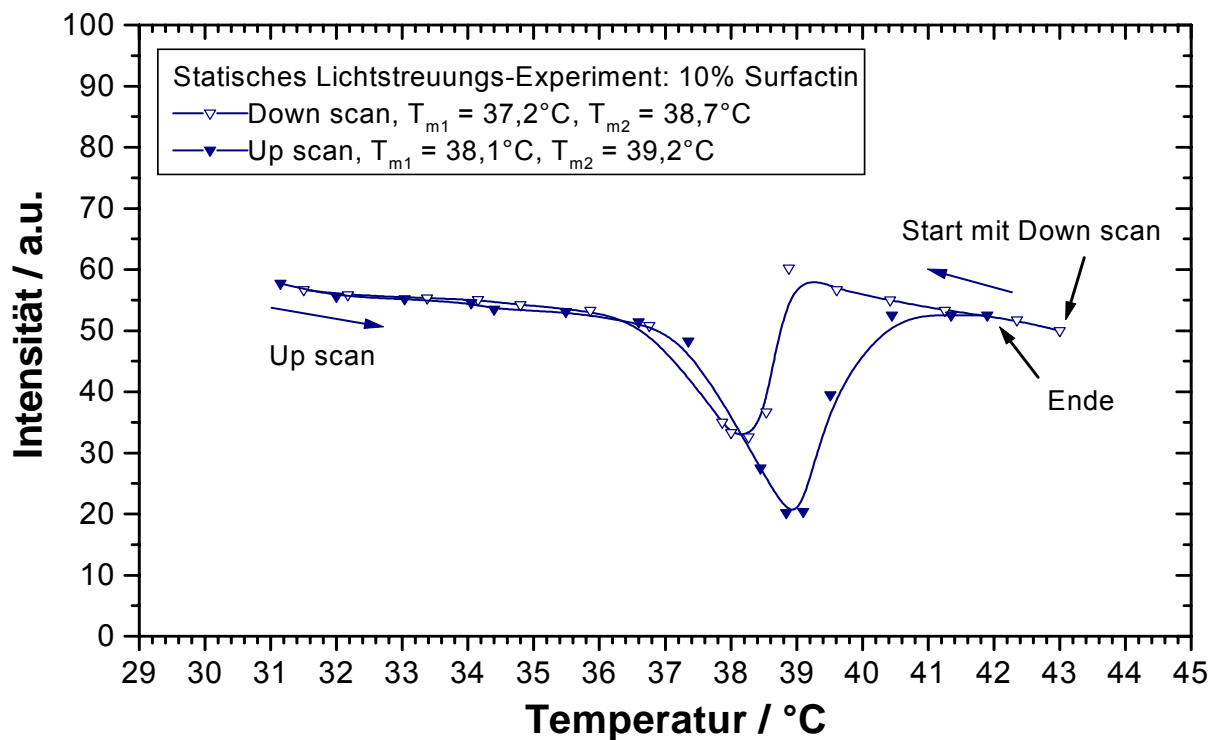


Abb. 45: Lichtstreuungsintensität von DPPC-Vesikeln ( $[\text{DPPC}] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 10 Mol% Surfactin als Funktion der Temperatur.

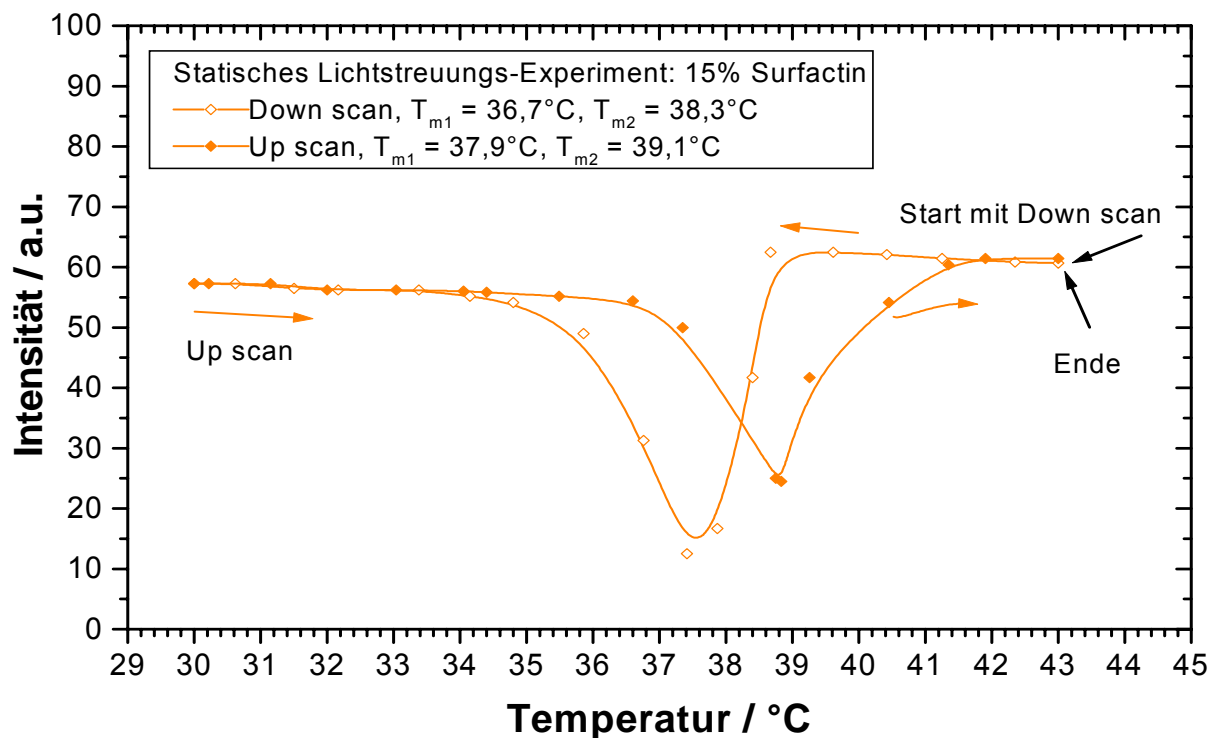


Abb. 46: Lichtstreuungsintensität von DPPC-Vesikeln ( $[\text{DPPC}] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 15 Mol% Surfactin als Funktion der Temperatur.

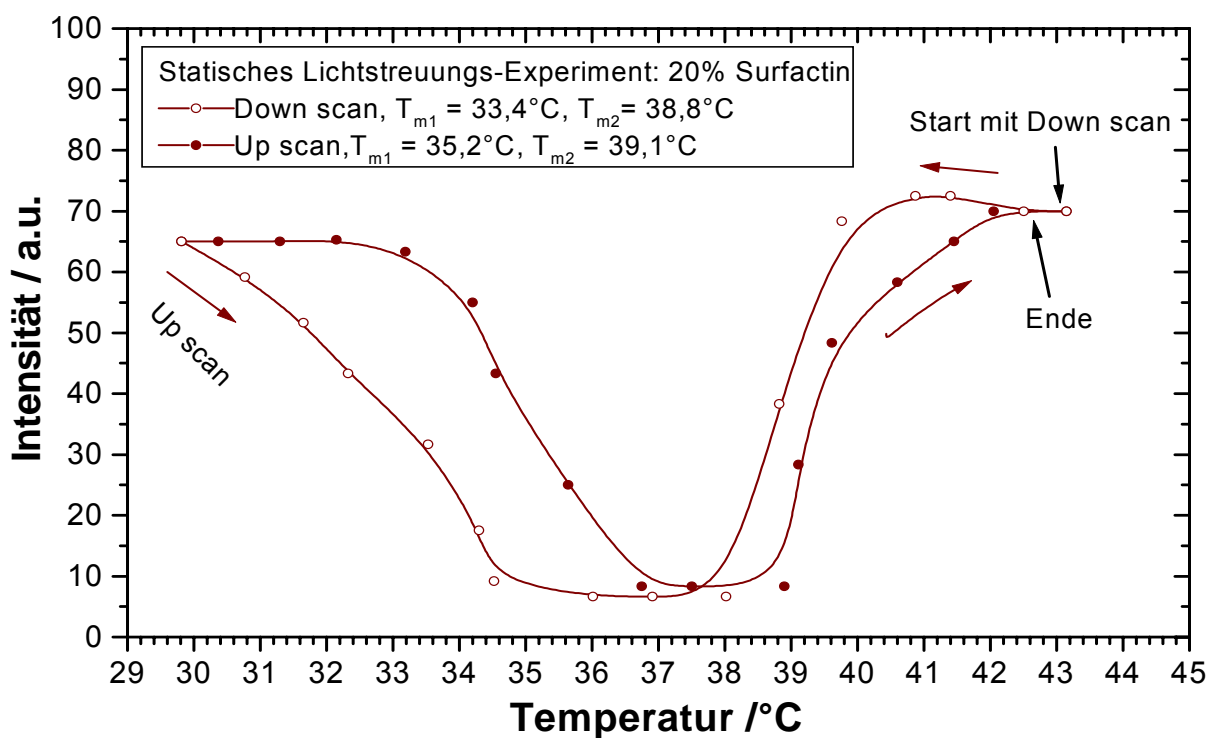


Abb. 47: Lichtstreuungsintensität von DPPC-Vesikeln ( $[\text{DPPC}] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 20 Mol% Surfactin als Funktion der Temperatur.

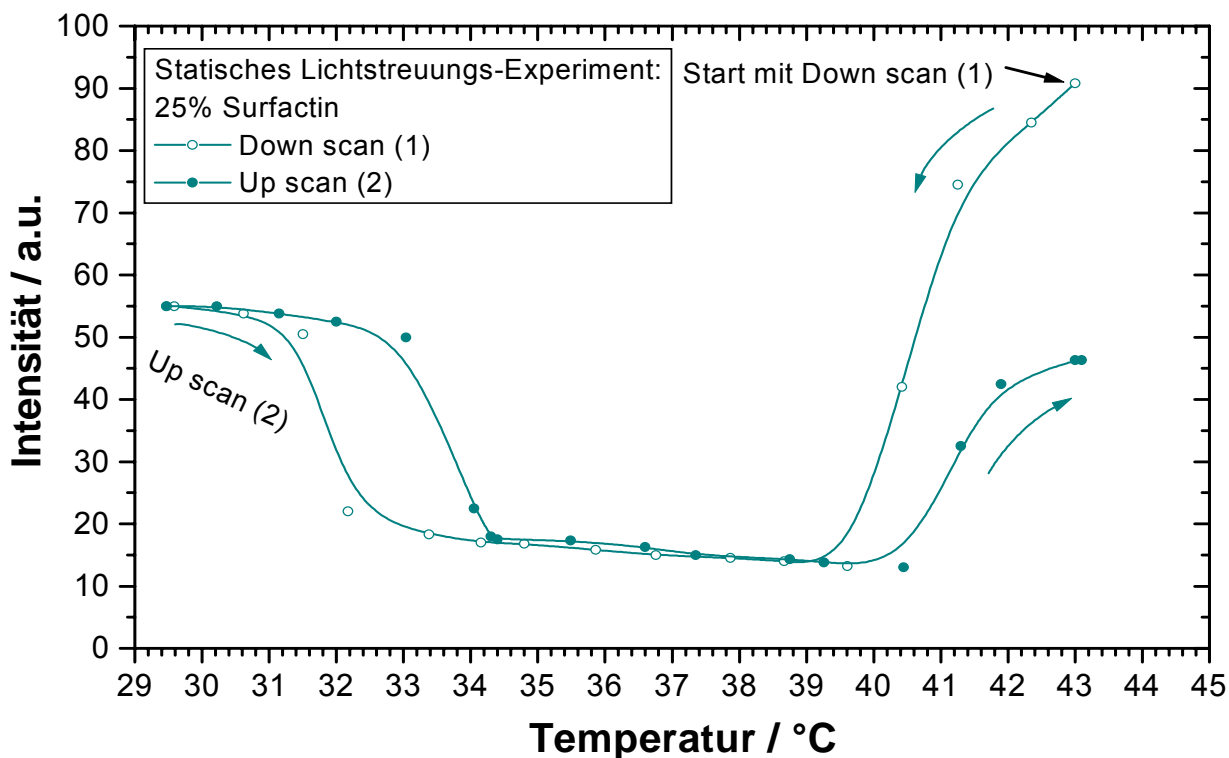


Abb. 48a: Lichtstreuungsintensität von DPPC-Vesikeln ( $[\text{DPPC}] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 25 Mol% Surfactin als Funktion der Temperatur.

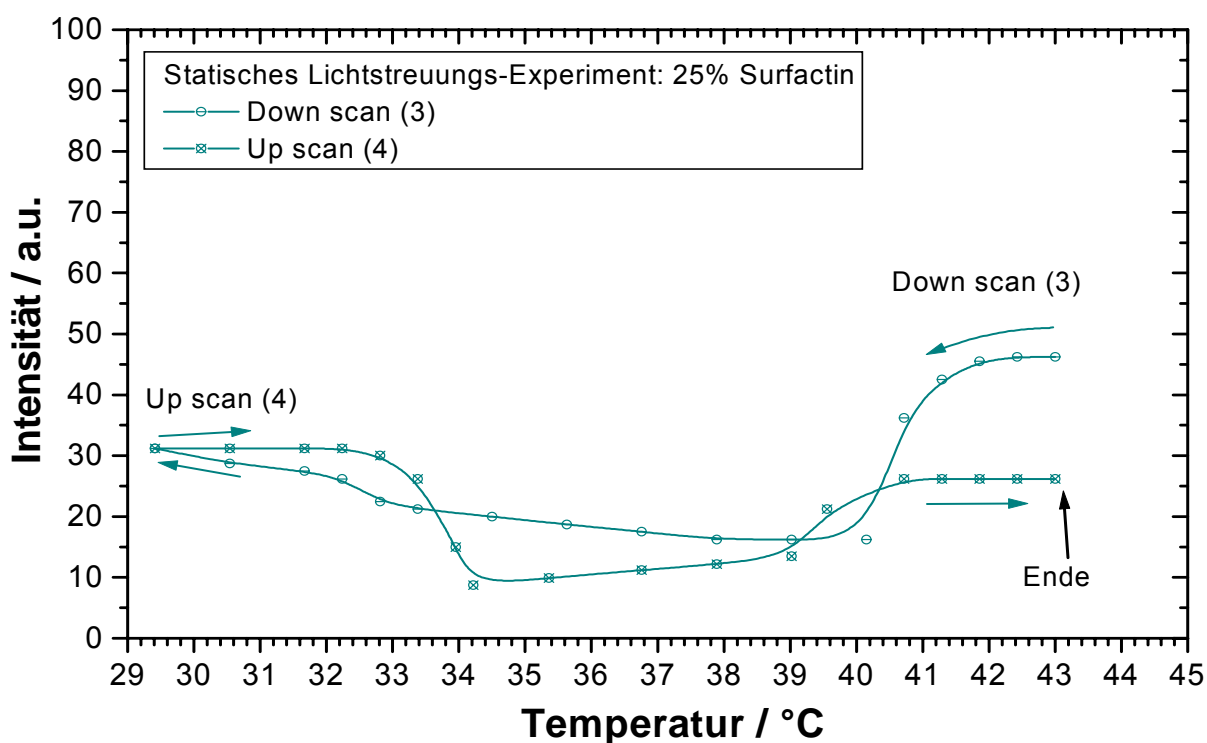


Abb. 48b: Lichtstreuungsintensität von DPPC-Vesikeln ( $[DPPC] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 25 Mol% Surfactin als Funktion der Temperatur.

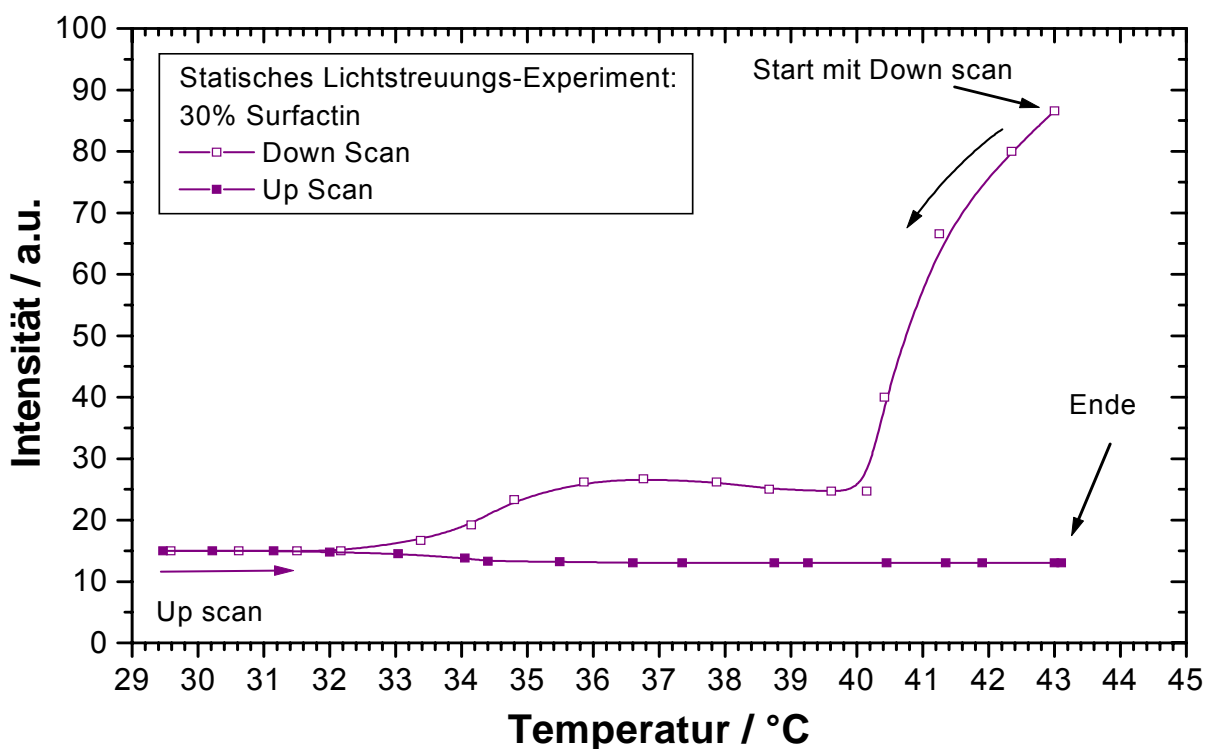


Abb. 49: Lichtstreuungsintensität von DPPC-Vesikeln ( $[DPPC] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von 30 Mol% Surfactin als Funktion der Temperatur.

Surfactin-Konzentration		Phasenübergangstemperatur $T_m$ der DPPC-Vesikel			
		Temperatur abwärts		Temperatur aufwärts	
		$T_{m1}$ -down scan	$T_{m2}$ -down scan	$T_{m1}$ -up scan	$T_{m2}$ -up scan
mM	Mol%	°C	°C	°C	°C
0,000	0	$39,6 \pm 0,3$		$40,0 \pm 0,3$	
0,075	3	$39,6 \pm 0,3$		$40,0 \pm 0,3$	
0,100	4	$38,6 \pm 0,3$		$39,1 \pm 0,3$	
0,125	5	$38,5 \pm 0,3$		$39,0 \pm 0,3$	
0,250	10	$37,2 \pm 0,3$	$38,7 \pm 0,4$	$38,0 \pm 0,3$	$39,5 \pm 0,4$
0,375	15	$36,7 \pm 0,3$	$38,3 \pm 0,4$	$37,8 \pm 0,3$	$39,4 \pm 0,4$
0,500	20	$33,4 \pm 0,3$	$38,8 \pm 0,4$	$35,2 \pm 0,3$	$39,1 \pm 0,4$
0,625	25	teilweise irreversibel			
0,750	30	vollständig irreversibel			

Tabelle 7: Phasenübergangstemperatur  $T_m$  der DPPC-Vesikel ( $[DPPC] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Abhängigkeit von der Surfactin-Konzentration (Lichtstreuungs-Experimente).

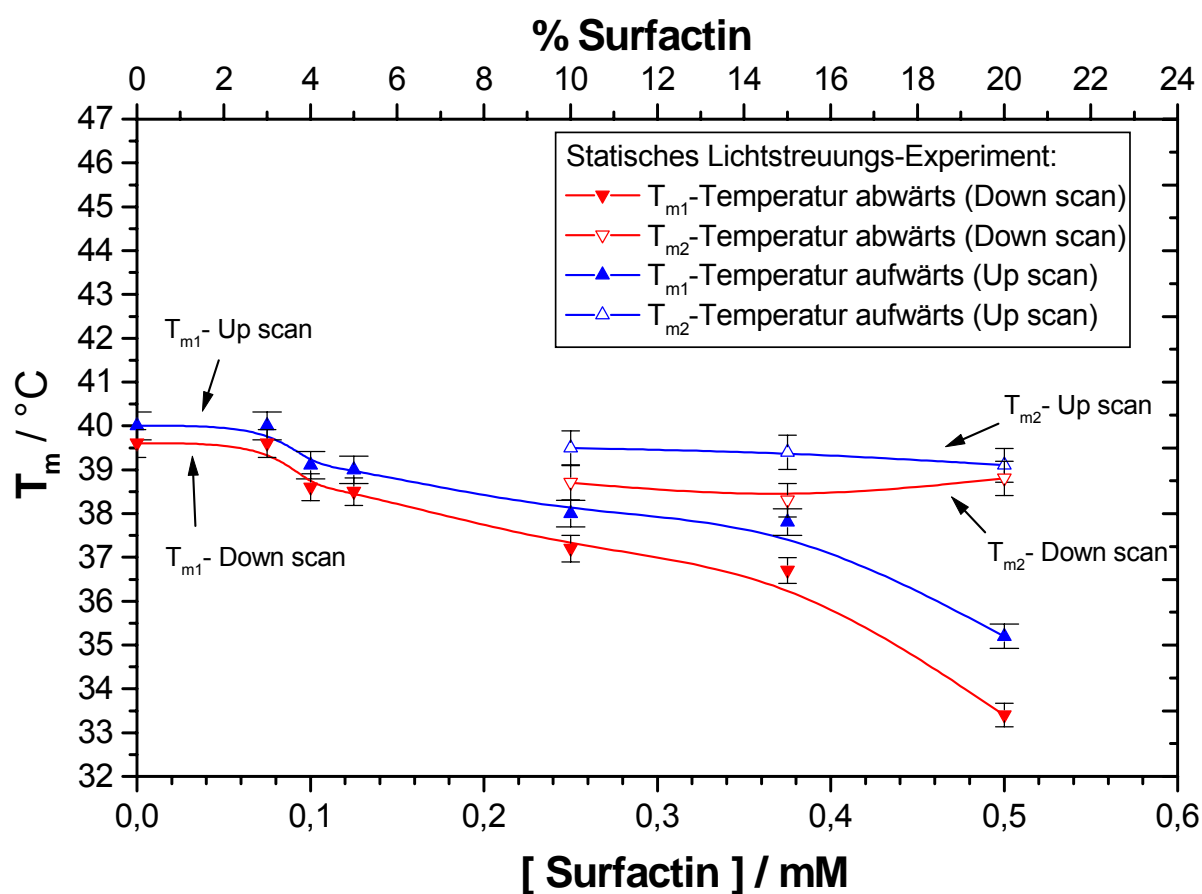


Abb. 50: Phasenübergangstemperatur  $T_m$  der DPPC-Vesikel ( $[DMPC] = 2,5 \text{ mM}$ ) als Funktion von der Surfactin-Konzentration (Lichtstreuungs-Experiment).

Tabelle 7 und Abbildung 50 verdeutlichen, dass mit zunehmender Surfactin-Konzentration eine nahezu lineare Abnahme der mittleren Phasenübergangstemperatur  $T_{m1}$  von DPPC-Surfactin erfolgt. Gleichzeitig beobachtet man zunehmende Hysterese-Effekte bis 20 Mol% Surfactin.  $T_{m2}$  ist praktisch unabhängig von der Surfactin-Konzentration. Oberhalb von 20 Mol% Surfactin sind die Phasenübergänge teilweise bzw. vollständig irreversibel, daher werden  $T_{m1}$  und  $T_{m2}$  ab dieser Surfactin-Konzentration nicht dargestellt.

## 5 Diskussion

Charakteristisch für Lipidmembranen ist ihre thermotropische Hauptphasenumwandlung, d.h. die Umwandlung der Lipiddoppelschichten von der kristallinen in die fluide Phase. Diese Wechselwirkung mit membran-aktiven Molekülen kann diesen Prozess beeinflussen und verändern.

Diese Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt, die Wechselwirkung von Surfactin mit DMPC- und DPPC-Vesikeln, die als biologische Modell-Membranen dienen, zu untersuchen. Das Biotensid Surfactin gehört zur Klasse der Lipopeptide, die hohe therapeutische und biotechnologische Bedeutung besitzen. Aufgrund seiner Struktur kann Surfactin in Membransysteme von Mikroorganismen und Viren eindringen und diese zerstören. Seine antimikrobielle und antivirale Wirksamkeit ermöglicht seine Anwendung z.B. zum Schutz gegen Infektionen durch Mykoplasmen, Chlamydien und Mycobakterien sowie Herpes- und Retro-Viren [84]. Die Kenntnis seiner membran-aktiven Eigenschaften sowie das Verständnis seiner biologischen Wirkungen ist daher von hoher wissenschaftlicher und technologischer Bedeutung. Es wurden umfangreiche physikalisch-chemische Studien der Wechselwirkung von Surfactin mit DMPC durchgeführt. Die verwendeten Methoden umfassen Differential-Scanning-Kalorimetrie (DSC), statische Lichtstreuung, Kryoelektronenmikroskopie, Neutronenkleinwinkelstreuung und Relaxationsspektroskopie (Poo-Man's-Temperatursprung). Zum Studium der DPPC-Surfactin-Wechselwirkungen wurden nur Differential-Scanning-Kalorimetrie (DSC) und statische Lichtstreuung eingesetzt. Bei allen Experimenten lag die Surfactin-Konzentration oberhalb ihrer kritischen Micellbildungskonzentration (cmc) von ca. 10  $\mu\text{M}$  [38].

Die Resultate der DSC- und Lichtstreuungsexperimente an DMPC- bzw. DPPC-Vesikeln zeigen eine ausgezeichnete Übereinstimmung (s. Tab. 3, 6 und 7). Die DSC-Thermogramme weisen für beide Phospholipide zwei Peaks auf. Die Lichtstreuungsexperimente zeigen dementsprechend zwei Hysterese-Effekte. Bereits ab 2 bzw. 4 Mol% Surfactin findet eine Verschiebung der Phasenübergangstemperatur  $T_{m1}$  von DMPC- bzw. DPPC-Vesikeln zu niedrigeren Temperaturen statt (s. Abb. 10 u. 38). Gleichzeitig erfolgt eine Verbreiterung

des 1. DSC-Peaks ( $\Delta T_{1/2}$ ) und eine Zunahme der Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{cal1}$  (s. Tab. 3 u. 6). Bei den Lichtstreuungsexperimenten beobachtet man zunehmende Hysterese-Effekte in der Streukurve. Die Streuintensität der DMPC- bzw. DPPC-Surfactin-Aggregate nimmt bei niedrigen Surfactin-Konzentrationen mit steigender Temperatur zunächst ab (s. Abb. 16 u. 43). Dieses Streuverhalten entspricht dem der reinen DMPC- bzw. DPPC-Vesikel und ist auf die Abnahme der Dicke der Lipiddoppelschichten infolge der Umwandlung von der kristallinen in die fluide Phase zurückzuführen [12,27]. Es ist bereits bekannt, dass durch das Eindringen von Surfactin in unilamellare Vesikeln Poren entstehen können [14,22,78]. Die genannten Beobachtungen können durch die Wechselwirkung zwischen Surfactin mit der polaren Kopfgruppe (C=O Bindung) und der Fettsäurenkette (C-H Bindung) der Phospholipide erklärt werden. Die Einlagerung von Surfactin-Micellen in DMPC bzw. DPPC-Vesikeln verursacht eine starke Dehydratation an der C=O Gruppe und dadurch eine Abnahme der Wasserstoffbrückenbindung mit den umgebenden Wassermolekülen [11,25,55]. Die van-der-Waals Bindungen in den Lipiddoppelschichten werden dadurch geschwächt. Dies führt zu Veränderungen der Membranpermeabilität. Weiterhin wird die Fluidität der Fettsäurenketten von DMPC- bzw. DPPC-Doppelschichten in der Membran verringert und die Kooperativität der Übergänge vermindert [15,23]. Diese Prozesse äußern sich in der Abnahme der Phasenübergangstemperatur  $T_m$ , der Verbreiterung des ersten DSC-Peaks ( $\Delta T_{1/2}$ ), bzw. in zunehmenden Hysterese-Effekten in der Streukurve.

Ab 4 bzw. 10 Mol% Surfactin nehmen die Veränderungen in den DMPC- bzw. DPPC-Surfactin-Aggregaten weiter zu. Die DSC-Kurven zeigen nun jeweils einen zweiten Peak, der im Vergleich zum ersten DSC-Peak bei DMPC zu höheren (s. Abb. 11) bzw. bei DPPC zu niedrigeren Temperaturen (s. Abb. 39) verschoben ist. Dieser Unterschied zwischen den beiden Phospholipiden kann durch die Wechselwirkung zwischen Surfactin mit der Vorphase und nicht mit der Hauptphase von DPPC-Vesikeln erklärt werden [77]. Die Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{cal1}$  der DMPC- bzw. DPPC-Surfactin-Aggregate erreicht bei dieser Surfactin-Konzentration ihr Maximum (s. Abb. 15 und 42). Die dem zweiten Peak zuzuordnende Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{cal2}$  ist im Konzentrationsbereich von 5 – 20 Mol% Surfactin weitgehend konstant, d.h.  $\Delta H_{cal2}$  ist von der Surfactin-Konzentration

weitgehend unabhängig. Unter diesen Bedingungen sind die Wechselwirkungen zwischen Lipiden mit Surfactin sehr schwach [15]. Dementsprechend beobachtet man bei den Lichtstreuungsexperimenten das Entstehen einer zweiten Hysterese in der Streukurve. Im Gegensatz zu der Lichtstreuung bei niedrigen Surfactin-Konzentrationen nimmt hierbei die Streuintensität mit steigender Temperatur zu (s. Abb. 17 und 45), was auf eine zweite Form der DMPC bzw. DPPC-Surfactin-Aggregate hinweist.

Kryoelektronenmikroskopie-Aufnahmen veranschaulichen die Resultate dieser beiden Experimente. Sie zeigen zwei unterschiedliche DMPC-Surfactin-Aggregationsformen. Die Aufnahmen von DMPC-Vesikeln in Gegenwart von 2 Mol% Surfactin weisen im Gegensatz zu der völlig gleichmäßigen runden Form reiner DMPC-Vesikel [33] bereits eine Gliederung in Segmente auf (s. Abb. 26 u. 27). Diese haben eine Länge von 25 – 50 nm und eine Dicke von ca. 5 – 6 nm. Die segmentierten Vesikel haben einen Durchmesser von 50 – 100 nm, der dem reiner DMPC-Vesikel entspricht. Die Einlagerung von Surfactin-Micellen in DMPC-Doppelschichten verursacht strukturelle Veränderungen in den DMPC-Vesikeln, die zur deren Labilisierung führen. Hierfür wird Energie benötigt. Dieser Prozess äußert sich in der Zunahme der Umwandlungsenthalpie  $\Delta H_{cal}$ , die bei einer Surfactin-Konzentration von 2 Mol% beginnt [69]. Oberhalb dieser Konzentration nimmt die Zahl der Surfactin-Cluster in den Vesikeln zu. Dadurch wird die hexagonale Anordnung der Phospholipide destabilisiert [25]. Die Wechselwirkung zwischen den Molekülen ist an der Kopfgruppe der Phospholipide so groß [32,33], dass diese Vesikel in Segmente zerfallen [58,78]. Diese sind stäbchenförmig mit einer Länge von 50 – 100 nm und einer Breite von ca. 5 – 7 nm, wie aus Kryoelektronenmikroskopie-Aufnahmen bei 4 Mol% Surfactin hervorgeht (s. Abb. 28 u. 29). Bei dieser Aggregationsform wurde eine Zunahme der Dicke der Lipiddoppelschichten beobachtet, die sich durch die Einlagerung von Surfactin-Domänen in die DMPC-Doppelschichten erklären lässt [17,25]. Bei dieser Surfactin-Konzentration beobachtet man noch beide Aggregationsformen, die vesikuläre und die stäbchenförmige. Die vesikulären Aggregate enthalten sehr wahrscheinlich vorwiegend die Lipid-reichen Domänen, während bei den stäbchenförmigen Aggregaten Surfactin-reiche Domänen dominieren [1]. Diese Darstellung entspricht



den Arbeiten von Deleu et al. bei der Monoschicht [15,16] und Grau et al. bei der Doppelschicht [25]. Mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie zeigen Deleu, dass bei Surfactin/DPPC-Monoschichten mit einem Mischungsverhältnis von 0,25 zu 0,75 zwei unterschiedliche molekulare Anordnungen von Lipid- und Surfactin-Domänen vorliegen. Diese Ergebnisse (Deleu et al.) sowie das Auftreten eines zweiten Peaks im DSC-Thermogramm von DMPC-Surfactin-Aggregaten (Grau et al.) wurden auf eine laterale Phasentrennung von Lipopeptid/Phospholipid-Mischungen unter Bildung von Surfactin-reichen Domänen zurückgeführt. Deren Bildung lässt sich durch stärkere Wechselwirkung zwischen Surfactin-Molekülen im Vergleich zu Surfactin-Lipid-Molekülen in den Membranen erklären. Unter diesen Bedingungen sind Surfactin und Phospholipide vollständig unmischbar.

Oberhalb von 4 Mol% Surfactin nimmt die Zahl der segmentierten DMPC-Vesikel stark ab unter Umwandlung in linear lamellare Aggregate mit einer Länge von 50 – 150 nm und einer Breite von 5 – 7 nm. Bei einer Surfactin-Konzentration von 8 Mol% liegen nur noch stäbchenförmige DMPC-Surfactin-Aggregate vor (s. Abb. 30). Oberhalb von 10 bzw. 20 Mol% Surfactin kommt es zur Sättigung der lamellaren DMPC-Membranen mit Surfactin, deren Dimensionen unter diesen Bedingungen ihr Maximum erreicht. Diese Prozesse äußern sich durch eine starke Zunahme der Streuintensität (s. Abb. 23 und 47). Die Wechselwirkungen zwischen Surfactin mit DMPC bzw. DPPC sind bis zu 15 bzw. 20 Mol% Surfactin reversibel. Oberhalb dieser Konzentrationen beobachtet man zunehmend irreversible Prozesse (s. Abb. 24, 48a und 48b), bei denen die lamellaren Aggregate in DMPC- bzw. DPPC-Surfactin-Mischmicellen umgewandelt werden [26,56,57]. Hierbei handelt es sich um eine dritte Aggregationsform dieser Phospholipide mit Surfactin. Die lamellare und die micellare Form stehen hier im Gleichgewicht [1]. Bei 30 Mol% Surfactin zeigt die Streukurve kein Hystereseverhalten mehr (s. Abb. 24 und 49). Dies deutet auf eine komplette Zerstörung der Lipiddoppelschichten hin, wobei sich alle lamellaren Aggregate in Mischmicellen umgewandelt haben [1,8,22]. Mit Hilfe der Neutronenkleinwinkelstreuung lässt sich die Konformation der DMPC/Surfactin-Mischmicellen durch zwei bisher nicht unterscheidbare Modelle beschreiben und zwar entweder durch oblate Ellipsoide mit den Radien  $R_1$  von 5,1 nm und  $R_3$  von etwa 1,6 nm oder durch prolate Ellipsoide mit den Radien  $R_1$  von 2,9 nm und  $R_3$  von

7 nm (s. Abb. 31). Die elektronenmikroskopischen Arbeiten von Vollenbroich et al. [85,86] zeigen einen ähnlichen Wirkungsmechanismus von Surfactin bei der Inaktivierung von Mykoplasmen und Viren. Auch hier liegen die Wirkstoffkonzentrationen von Surfactin oberhalb seiner kritische Micellkonzentration. Es ist daher anzunehmen, dass der Wirkstoff in aggregierter Form in die Lipoproteinmembranen von Mikroorganismen und Viren aufgenommen wird. Die Wechselwirkungen von Surfactin mit Hüllmembranen von Mykoplasmen führen zuerst zur Veränderung der Membranpermeabilität. Hierbei wurde bei  $12,5 \mu\text{M}$  Surfactin zunächst eine Schwellung dieser Membranen beobachtet. Bei höheren Konzentrationen erfolgte eine völlige Zerstörung dieses Membransystems, was die Inaktivierung der Mykoplasmen zur Folge hatte. Ebenso wurde bei höheren Surfactin-Konzentrationen die Virionenhülle zerstört und das Kapsid geschädigt. Im Unterschied zum Biotensid Surfactin erstreckt sich die bakterizide Wirkung herkömmlicher Antibiotika, wie z.B. Penicillin, auf wachsende Bakterien. Nichtwachsende, "ruhende" Zellen bleiben unbeeinflusst. Penicillin greift spezifisch in die Bildung der Zellwand ein, die aus einem Mureinnetz besteht. Da Mykoplasmen keine Zellwände besitzen, sind hier die meisten herkömmlichen Antibiotika wirkungslos. Im Gegensatz hierzu inaktiviert Surfactin Viren, Mykoplasmen und Bakterien nach einem rein physikochemischen Mechanismus, indem es in das Biomembransystem eindringt und auf diese Weise zerstört.

Die in dieser Arbeit ausgeführter Experimente zeigen eine Umwandlung der DMPC- bzw. DPPC-Lipidmembranen bei höheren Surfactin-Konzentrationen unter Bildung von Mischmicellen. Diese ist sowohl von der Lipidart als auch vom Lipid-Surfactin-Konzentrationsverhältnis abhängig [13,25]. Im Vergleich zur den DMPC-Vesikeln wird die doppelte molare Surfactin-Konzentration gebraucht, um thermotropische Veränderungen von DPPC-Vesikeln zu erreichen, während die Umwandlung in Mischmicellen für beide Phospholipide bei etwa gleicher Surfactin-Konzentration erfolgt. Dieses Phänomen kann durch eine günstigere Wechselwirkung der Kohlenwasserstoffketten von Surfactin ( $C_{13} - C_{15}$ ) mit DMPC-Vesikeln ( $C_{14}$ ) als mit DPPC-Vesikeln ( $C_{16}$ ) erklärt werden [26].

Die kinetischen Prozesse der Hauptphasenumwandlung kristallin – fluid reiner DMPC-Vesikel wurden mit Hilfe des Iod-Laser-Temperatursprung-Verfahrens von Holzwarth et al. untersucht [30]. In Kombination mit der Kryoelektronenmikroskopie wurde ein Modell für die bei der Phasenumwandlung stattfindenden dynamischen Prozesse entwickelt [33]. Mit diesen Verfahren wurden 5 zeitlich aufeinanderfolgende Vorgänge in einem Zeitbereich von Nanosekunden bis zu Millisekunden ermittelt (s. Kapitel 1.2 und Abb. 5). Die Relaxationsprozesse im Zeitbereich von Nanosekunden bis Mikrosekunden entsprechen der Bildung von Rotationsisomeren sowie Rotationsbewegungen in der Kopfgruppe, wobei die Fettsäurenketten der Lipidmoleküle sich aus ihrer all-trans- in die cis-trans-Konformation umwandeln. Dadurch nimmt die laterale Beweglichkeit der Fettsäurenketten zu. Sie führt zur Bildung von Lipid-Clustern mit verschiedener Ordnung in den Membranen. Die Relaxationsprozesse im Zeitbereich von Mikrosekunden bis Sekunden beziehen sich sehr wahrscheinlich auf die Umwandlung von Lipid-Clustern über intermediäre Formen in den fluiden Zustand. Hierbei handelt es sich um einen langsamen Relaxationsprozess, der bis jetzt noch nicht untersucht wurde. Zu dieser Fragestellung sollte in dieser Arbeit ein Beitrag geleistet werden. Hierfür eignet sich vor allem das Poor-Man's-Temperatursprung-Verfahren, mit dem langsame Konformationsänderungen im Zeitbereich von Sekunden sehr effizient untersucht werden können. Solche Relaxationsprozesse wurden nur an reinen DMPC-Vesikeln sowie an vesikulären DMPC-Surfactin-Aggregaten in Gegenwart von 1 bis 4 Mol% Surfactin beobachtet. Bei höherer Surfactin-Konzentration wandeln sich die kugelförmigen Vesikel in stäbchenförmige Aggregate um. Hierbei verschwindet dieser langsame Relaxationsprozess. Die Relaxationszeit  $\tau$  der reinen DMPC-Vesikel liegt bei 29,8 s (s. Abb. 32). Mit wachsender Surfactin-Konzentration bis zu 4 Mol% wurde eine Verkürzung dieser Relaxationszeit bis auf ca. 18,5 s ermittelt (s. Tab 5). Die Resultate zeigen, dass Surfactin den Umwandlungsprozess von intermediären zu fluiden Lipiden beschleunigt. Diese Interpretation entspricht den Arbeiten von Maget-Dana et al. an Surfactin/DMPC-Monoschichten mit Hilfe der Circular dichroismus (CD)-Methode [13,61]. Die Isotherm-Kurven von Surfactin/DMPC-Monoschichten bei unterschiedlichen Surfactin-Konzentrationen zeigen, dass bei niedrigerer Konzentration eine Mischbarkeit zwischen Surfactin mit Phospholipiden vorliegt.

Diese Prozesse können durch eine starke hydrophobe Wechselwirkung von Surfactin mit Phospholipiden hervorgerufen werden. Dies führt zur Verminderung der Phasenübergangstemperatur  $T_{m1}$  von DMPC-Vesikeln und einer Verbreiterung des DSC-Peaks, wie aus DSC- und Lichtstreuungsexperimenten ermittelt wurden (s. Tab 3 u. Tab 4). Kryoelektronenmikroskopie-Aufnahmen zeigen nur die vesikulären Aggregate. Bis zu 4 Mol% Surfactin ist offensichtlich mit DMPC mischbar. Unter diesen Bedingungen tritt seine Detergenswirkung noch nicht auf. Damit wird die Reorganisation von Teilen der DMPC-Membranen beeinflusst aber noch nicht der Auflösungsprozess der DMPC-Vesikel. Die langsamen Relaxationsprozesse bei der Phasenumwandlung von DMPC-Vesikeln in Gegenwart von Surfactin sind im Detail noch nicht geklärt.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bilden die Grundlage, den Einfluss von Surfactin auf biologische Membranen bzw. auf ganze Zellen zu untersuchen, um die vielfältigen biologischen Aktivitäten von Surfactin auf molekularer Ebene zu verstehen.

## 6 Zusammenfassung

Das zyklische Lipoheptapeptid Surfactin wurde aus dem gentechnisch hergestellten *Bacillus subtilis* Stamm OKB105 isoliert. Seine Struktur gliedert sich in eine Heptapeptid-Kopfgruppe und eine hydrophobe  $\beta$ -Hydroxy-Fettsäure. Natürliches Surfactin ist ein Komplex verschiedener Isoformen mit Fettsäurekomponenten, deren Seitenketten zwischen  $C_{13}$  bis  $C_{15}$  variieren. Die Kopfgruppe besteht aus einem Peptidring mit zwei sauren Aminosäuren, Glutaminsäure und Asparaginsäure, und fünf hydrophoben Aminosäureresten (4 Leucin und ein Valin). Surfactin besitzt daher eine Struktur mit ausgeprägten oberflächen-, grenzflächen-, und membranaktiven Eigenschaften. Aufgrund der Inaktivierung von umhüllten Viren, Mykoplasmen und der Zerstörung von Zellwänden grampositiver Bakterien hat Surfactin eine große therapeutische und biotechnologische Bedeutung. In dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung von Surfactin mit DMPC und DPPC-Vesikeln, die als Modellsysteme für biologische Membran dienen können, mit Hilfe von Mikrokalorimetrie, statischer Lichtstreuung, Kryoelektronenmikroskopie, Neutronenkleinwinkelstreuung und durch die Temperatursprung-Methode untersucht.

Mit Hilfe dieser Methoden wurden für beide Phospholipide insgesamt drei verschiedene Aggregationsformen ermittelt. Die DSC-Diagramme und Lichtstreuungsprofile von DMPC-Vesikeln zeigen in Abhängigkeit von der Surfactin-Konzentration eine ausgeprägte Zweiphasigkeit, die auf zwei Umwandlungsprozesse schließen lässt, denen die Umwandlungstemperaturen  $T_{m1}$  und  $T_{m2}$  bzw. die Umwandlungsenthalpien  $\Delta H_{cal1}$  und  $\Delta H_{cal2}$  zugeordnet sind. Unterhalb von 2 Mol% Surfactin erfolgt keine strukturelle Veränderung der Vesikel. Aus den DSC- und Lichtstreuungsexperimenten ergibt sich eine Phasenübergangstemperatur  $T_{m1}$  von 23 °C für die reinen Vesikel. Bis zu 4 Mol% Surfactin beobachtet man mit der Kryoelektronenmikroskopie eine Segmentierung der kugelförmigen Teilchen. Bei diesem Prozess nimmt  $\Delta H_{cal1}$  zu. Mit Hilfe des Poor-Man's-Temperatursprung-Verfahrens wurden bei diesen Surfactin-Konzentrationen langsame Konformationsänderungen im Zeitbereich von 18 – 30 s ermittelt. Surfactin beschleunigt diese Relaxationsprozesse. Diese Ergebnisse deuten auf eine teilweise Mischbarkeit von

Surfactin mit Lipidmolekülen in der DMPC-Doppelschicht hin, die zu einer relativ starken Lipid-Biotensid-Wechselwirkung führt. Kryoelektronenmikroskopie-Aufnahmen zeigen, zwischen 4 – 15 Mol% Surfactin wandelt sich die vesikuläre Form zunehmend in linear lamellare Aggregate mit einer Länge von 50 – 150 nm um. In diesem Konzentrationsbereich wurde  $T_{m1}$  auf 16,8 °C reduziert. Im Gegensatz hierzu vermindert sich  $T_{m2}$  nur geringfügig. Ebenso ist die Umwandlungsenthalpie des zweiten Umwandlungsprozesses  $\Delta H_{cal2}$  weitgehend konstant. In dieser Aggregationsform wechseln sich wahrscheinlich Lipid-reiche und Surfactin-reiche Domänen innerhalb der Lipidmembranen ab. Unter diesen Bedingungen ist Surfactin mit Phospholipiden nicht mischbar bzw. die Wechselwirkungen zwischen Lipiden und Surfactin sind schwach, was durch einen niedrigen Wert von  $\Delta H_{cal2}$  und das Verschwinden der langsamen Konformationsänderung im Poor-Man's-Temperatursprung-Experiment angezeigt wurde.

Oberhalb von 15 Mol% Surfactin kommt es zur Sättigung der DMPC-Doppelschichten mit Surfactin. Dies hat eine irreversible Umwandlung der lamellaren Aggregate unter Bildung von DMPC/Surfactin-Mischmicellen als dritte Aggregationsform zur Folge. Die Struktur und die Größe dieser Mischmicellen wurden mit Hilfe der Neutronenkleinwinkelstreuung untersucht. Die Messergebnisse können durch zwei Modelle angenähert werden, entweder durch oblate Ellipsoide mit den Radien  $R1$  und  $R3$  von 5,1 nm bzw. 1,6 nm oder durch prolate Mischmicellen mit den Radien  $R1$  und  $R3$  von 2,9 nm bzw. 7 nm.

Für DPPC-Vesikel wurden ähnliche Phänome wie bei DMPC-Vesikeln beobachtet. Auch hier sind die DSC-Thermogramme und Lichtstreuungsprofile zweiphasig. Im Bereich der zweiten Phase kommt es zur Bildung einer weiteren Form von lamellaren DPPC-Surfactin-Aggregaten, die sich oberhalb einer Surfactin-Konzentration von 25 Mol% in einem irreversiblen Prozess zunehmend in Surfactin-DPPC-Mischmicellen umwandeln. Dieser Prozess ist wie bei DMPC-Vesikeln bei 30 Mol% Surfactin abgeschlossen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Almgren (2000) Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants, *Biochim. Biophys. Acta* 1508, 146 – 163
2. K. Arima, A. Kakinuma, und G. Tamura (1968) Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31, 488 – 494
3. P. W. Atkins, (1996) *Physikalische Chemie*, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, VCH
4. P. Balgavý, M. Dubničková, N. Kučerka, M. A. Kiselev, S. P. Yaradaikin, D. Uhríková (2001) Bilayer thickness and lipid interface area in unilamellar extruded 1,2-diacylphosphatidylcholine liposomes: a small-angle neutron scattering study, *Biochim. Biophys. Acta* 1512, 40 – 52
5. F. Baumgart, B. Kluge, C. Ullrich, J. Vater, D. Ziessow (1991) Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 998 – 1005
6. I. M. Banat (1995) Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal-state of the art (Review), *Acta Biotechnol.* 15, 251 – 267
7. H. Bisswanger (1979) *Theorie und Methoden der Enzymkinetik, eine Einführung für Biochemiker, Biologen und Mediziner*, Weinheim, Deefield Beach (Florida), Basel: Verlag Chemie
8. A. Blume (1999) Lipid model membranes and biomembranes, *Handbook of thermal analysis and calorimetry*, R. B. Kemp (ed.), Elsevier Science

9. J. M. Brewer, A. J. Pesce, R. B. Ashworth (1977) Experimentelle Methoden in der Biochemie, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York
10. C. Boettcher, B. Schade, J.H. Fuhrhop (2001) Comparative Cryo-electron microscopy of noncovalent N-dodecanoyl- (D- and L-) serine assemblies in vitreous toluene and water, *Langmuir* 17, 873 – 877
11. C. Carillo, J. A. Teruel, F. J. Aranda, A. Ortiz (2003) Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin, *Biochim. Biophys. Acta* 1611, 91 – 97
12. C. S. Chong, K. Colbow (1976) Light scattering and turbidity measurement on lipid vesicles, *Biochim. Biophys. Acta* 436, 260 – 282
13. R. Maget-Dana, M. Ptak (1995) Interactions of surfactin with membrane models, *Biophys. J.* 68, 1937 – 1943.
14. M. Deleu, H. Razafindralambo, Y. Popineau, P. Jacques, P. Thonart, M. Paquot (1999) Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 152, 3 – 10
15. M. Deleu, K. Nott, R. Brasseur, P. Jacques, P. Thonart, Y. F. Dufrêne (2001) Imaging mixed lipid monolayers by dynamic atomic force microscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1513, 55 – 62
16. M. Deleu, M. Paquot, P. Jacques, P. Thonart, Y. Adriaensen, Y.F. Dufrêne (1999) Nanometer scale organization of mixed surfactin/phosphatidylcholine monolayers, *Biophys. J.* 77, 2303 – 2310
17. M. Deleu, O. Bouffieux, H. Razafindralambo, M. Paquot, C. Hbid, P. Thonart, P. Jacques, R. Brasseur (2003) Interaction of surfactin with membranes: A Computational Approach, *Langmuir*, 19, 3377 – 3385



18. J. D. Desai (1987) Microbial surfactants: evaluation, types, production and future application, *J. Sci. Ind. Res.* 46, 440 – 449
19. J. D. Desai, I. M. Banat (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 47– 64
20. E. J. Dufourc, C. Mayer, J. Stohrer, G. Althoff, G. Kothe (1992) Dynamic of phosphate head groups in biomembranes, *Biophys. J.* 61, 42 – 57
21. C. Dupuy, X. Auvray, C. Petipas, R. Anthore (1996) Small angle X-ray and neutron scattering study of the micellization of (N-alkylamino)-1-deoxylactitols in water, *Langmuir* 12, 3162 – 3172
22. K. Edwards, M. Almgren (1992) Surfactant-induced leakage and structural change of lecithin vesicles: effect of surfactant headgroup size, *Langmuir* 8, 24 – 832
23. M. Fresta, M. Ricci, C. Rossi, M. Furieri, G. Pugliesi (2000) Antimicrobial nonapeptide leucinostatin A-dependent effects on the physical properties of phospholipid model membranes, *J. Colloid Interface Sci.* 26, 222 – 230
24. I. Grangemard, F. Peypoux, J. Wallach, B. C. Das, H. Labbe, A. Caille, M. Genest, R. Maget-Dana, M. Ptak, J. M. Bonmatin (1997) Lipopeptides with improved properties: structure-activity relationships of new isoleucyl-rich surfactins, *J. Peptide Sci.* 3, 45 – 154
25. A. Grau, J. C. Gómez Fernández, F. Peypoux, A. Ortiz (1999) A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles, *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes* 1418, 307 – 319
26. A. Grau, A. Ortiz, A. de Godos, J.C. Gómez Fernández (2000) A biophysical study of the interaction of the lipopeptide antibiotic iturin A with aqueous phospholipid bilayers, *Arch. Biochem. Biophys.* 377, 315 – 323

27. A. Genz, J. F. Holzwarth (1985) Laser temperature jump experiments with fluorescence polarization and turbidity detection on the phase transition of single shell vesicles of dimyristoylphosphatidylcholine, *Coll. Polym. Sci.* 263, 484 – 493
28. A. Genz (Dissertation 1986) Laser-Temperatursprungmessungen an Modellsystemen für biologische Membranen, angefertigt im Fritz-Haber-Institut, Freie Universität Berlin
29. A. Genz, J. F. Holzwarth, T.Y. Tsong (1986) The influence of cholesterol on the main phase transition of unilamellar dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles, *Biophys. J.* 50, 1043 – 1051
30. A. Genz, J. F. Holzwarth (1986) Dynamic fluorescence measurements on the main phase transition of dipalmitoylphosphatidylcholine vesicles, *Eur. Biophys. J.* 13, 323 – 330
31. G. Georgiou, S. C. Lin, M. M. Sharma (1992) Surface active compounds from microorganisms, *Bio/Technol.* 10, 60 – 65
32. R. Groll (Dissertation 1986) Struktur und Dynamik von Phospholipid-Doppelschichten mit rekonstituierten biologische Einheiten, angefertigt im Fritz-Haber-Institut, Freie Universität Berlin
33. R. Groll, A. Böttcher, J. Jäger, J. F. Holzwarth (1996) Temperature dependent intermediate structures during the main phase transition of dimyristoylphosphatidylcholine vesicles a combined iodine laser temperature jump and time resolved cryo-electron microscopy study, *Biophys. Chem.* 58, 53 – 65
34. W. Hemminger und G. Höhne, (1979) Grundlagen der Kalorimetrie, Weinheim, Deefield Beach (Florida), Basel: Verlag Chemie

35. K. Hosono, H. Suzuki (1983) Acylpeptides, the inhibitors of cyclic adenosine 3',5-monophosphate phosphodiesterase I. Purification, physicochemical properties and structures of fatty acid residues, *J. Antibiotic (Tokyo)* 36, 679 – 683
  
36. J. F. Holzwarth, W. Frisch, B. Grünwald (1982) Fast dynamic process in the hydrocarbon tail region of phospholipid bilayers, *Microemulsions*, Plenum Publishing Corporation, New York, 185 – 204
  
37. J. F. Holzwarth, F. Meyer, M. Pickard, H. B. Dunford (1988) Mechanism of azide binding to chloroperoxidase and Horseradish peroxidase: Use of an iodine laser temperature-jump apparatus, *Biochemistry* 27, 6628 – 6633
  
38. Y. Ishigami, M. Osman, H. Nakahara, Y. Sano, R. Ishiguro, M. Matsumoto (1995), Significance of  $\beta$ -sheet formation for micellization and surface adsorption of surfactin, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 4, 341 – 348
  
39. A. Kakinuma, M. Hori, M. Isono, G. Tamura, K. Arima (1969) Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*, *Agr. Biol. Chem.* 33, 971 – 972
  
40. A. Kakinuma, H. Sugino, M. Isono, G. Tamura, K. Arima (1969) Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin, *Agr. Biol. Chem.* 33, 973 – 976
  
41. A. Kakinuma, M. Hori, H. Sugino, J. Yoshida, M. Isono, G. Tamura, K. Arima (1969) Determination of the location of lactone ring in surfactin, *Agr. Biol. Chem.* 33, 1523 – 1524
  
42. A. Kakinuma, A. Ouchida, T. Shima, H. Sugino, M. Isono, G. Tamura, K. Arima (1969) Confirmation of the structure of surfactin by mass spectrometry, *Agr. Biol. Chem.* 33, 1669 – 1671

43. Y. Kameda, S. Ouhira, K. Matsui, S. Kanatomo, T. Hase, T. Atsusaka (1974) Antitumor activity of *Bacillus Natto* V. Isolation and characterization of surfactin in culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311, Chem. Pharm. Bull. 22, 938 – 944
44. H-S. Kim, B-D. Yoon, C-H. Lee, H-H. Suh, H-M Oh, T. Katsuragi, Y. Tani (1997) Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9 J. Fermen. Bioengineer. 84, 41 – 46
45. J. M. Khire, M. I. Khan (1994) MEOR: importance and mechanism of MEOR, Enz. Microbiol. Technol. 16, 170 – 172
46. J. M. Khire, M. I. Khan (1994) MEOR: microbes and subsurface environment, Enz. Microbiol. Technol. 16, 258 – 259
47. A. Knoblich, M. Matsumoto, R. Ishiguro, K. Murata, Y. Fujiyoshi, Y. Ishigami, M. Osman (1995) Electron cryo-microscopic studies on micellar shape and size of surfactin, an anionic lipopeptide, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 5, 43 – 48
48. A. Kotyk, K. Janàček, J. Koryta (1988) Biophysical chemistry of membrane functions, John Wiley & Sons, Chichester-NewYork-Brisbane-Toronto Singapore
49. M. Kowall, J. Vater, B. Kluge, T. Stein, P. Franke, D. Ziessow (1998) Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus substilis* OKB 105, J. Coll. Interface Sci. 204, 1 – 8
50. M. Kracht, H. Rokos, M. Özel, M. Kowall, G. Pauli, J. Vater (1999) Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methylester derivatives, J. Antibiotic (Tokyo), 52, 613 – 619

51. J. M. H. Kremer, M. W. Esker, C. Pathmamanoharan, P. H. Wiersema (1977) Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method, *Biochemistry* 16, 3932 – 3935
52. A. Kretschmer, H. Bock, F. Wagner (1982) Chemical physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus-erythropolis* grown on normal alkanes, *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 864 – 870
53. M. Landy, G. H. Warren, S. B. Rosenman, L. G. Colio (1948) Bacillomycin: An antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 67, 539 – 541
54. A. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox (1994) *Prinzipien der Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford
55. J. K. Lee, B. Lenz (1997) Outer leaflet-packing defects promote poly(ethylene glycol)-mediated fusion of large unilamellar vesicles, *Biochemistry*, 36, 421 – 431
56. D. Lichtenberg, R. J. Robson, E. A. Dennis (1983) Solubilization of phospholipids by detergents, structural and kinetic aspects, *Biochim. Biophys. Acta*, 737, 285 – 304
57. D. Lichtenberg (1985) Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants, *Biochim. Biophys. Acta*, 821, 470 – 478
58. O. López, M. Cócera, R. Pons, N. Azemar, A. de la Maza (1998) Kinetic studies of liposome solubilization by dodecyl sulfate based on a dynamic light scattering technique, *Langmuir* 14, 4671 – 4674

59. S. Fernandez-López, H. S. Kim, E. C. Choi, M. Delgado, J. R. Granja, A. Khasanov, A. Kraehenbuehl, G. Long, D. A. Weinberger, K.M. Wilcoxon, M.R. Ghadiri (2001) Antibacterial agents based on the cyclic D, L- $\alpha$ -peptide architecture, *Nature* 412, 452 – 455
60. S. Mabrey, J. M. Sturtevant (1976) Investigation of phase transitions of lipids and lipid mixtures by high sensitivity differential scanning calorimetry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3862 – 3866
61. R. Maget-Dana, M. Ptak (1992) Interfacial properties and interactions with membrane lipids in mixed monolayers, *Thin Solid Films*, 210/211, 730 -732
62. R. N. Mannanov, R. K. Sattarova (2001) Antibiotics produced by *Bacillus* bacteria, *Chem. Nat. Comp.* 37, 117 – 123
63. M. Morikawa, Y. Hirata, T. Imanaka (2000) A study on the structure function relationships of lipopeptide biosurfactants, *Biochim. Biophys. Acta* 1488, 211 – 218
64. R. N. McElhaney (1982) The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes, *Chem. Phys. Lipids* 30, 229 – 259
65. C. N. Mulligan, R. N. Yong, B. F. Gibbs, S. James, H. P. J. Bennett (1999) Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin, *Environ. Sci. Technol.* 33, 3812 – 3820
66. C. N. Mulligan, R. N. Yong, B. F. Gibbs (1999) Removal of heavy metals from contaminated soil and sediments using the biosurfactant surfactin, *J. Soil Contamin.* 8, 231 – 254

67. M. M. Nakano, M. A. Marahiel, P. Zuber (1988) Identification of a genetic locus required for biosynthesis of lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus-subtilis*, J. Bacteriol. 170, 5662 – 5668
68. S. Nagai, K. Okimura, N. Kaizawa, K. Ohki und S. Kanatomo (1996) Study on surfactin, a cyclic depsipeptide. II Synthesis of surfactin B2 produced by *Bacillus natto* KMD 2311, Chem. Pharm. Bull. 44, 5 – 10
69. A. Ortiz, F. J. Arande, J. C. Gomez-Fernandez (1992) Interaction of retinol and retinoic acid with phospholipid membranes – a differential scanning calorimetry study, Biochim. Biophys. Acta 1106, 282 – 290
70. M. Osman, Y. Ishigami, K. Ishikawa, Y. Ishizuka, H. Holmsen (1994) Dynamic transition of  $\alpha$ -helix to  $\beta$ -sheet structure in linear surfactin correlating to critical micelle concentration, Biotechnol. Lett. 16, 913 – 918
71. P. Overath and H. Träuble (1973) Phase transitions in cells, membranes, and lipids of *Escherichia coli*. Detection by fluorescent probes, light scattering and dilatometry, Biochemistry 12, 2625 – 2634
72. F. Peypoux, J-M. Bonmatin, H. Labbe, B. C. Das, M. Ptak, G. Michel (1991) Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the [Val7] surfactin, Eur. J. Biochem. 202, 101 – 106
73. F. Peypoux, J-M. Bonmatin, H. Labbe, I. Grangemard, B. C. Das, M. Ptak, J. Wallach, G. Michel (1994) [Ala4]Surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies, Eur. J. Biochem. 224, 89 – 96
74. F. Peypoux, J-M. Bonmatin, J. Wallach (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin, Appl. Microbiol. Biotechnol. 51, 553 – 563

75. M. J. Ruoco, G. G. Shipley, E. Oldfield (1982) Characterization of subtransition of hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: X-ray diffraction study, *Biochim. Biophys. Acta* 684, 59 – 66
76. M. J. Ruoco, G. G. Shipley, E. Oldfield (1982) Characterization of sub-transition of hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: Kinetic, hydration and structural study, *Biochim. Biophys. Acta* 691, 309 – 320
77. C. Shaw, Chen, J. M. Sturtevant (1981) Thermotropic behavior of bilayers formed from mixed-chain phosphatidylcholines, *Biochemistry* 20, 713 – 718
78. J. D. Sheppard, C. Jumarie, D. G. Cooper, Laprade (1991) Ionic channel induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1064, 13 – 23
79. J. M. Sturtevant (1974) Some applications of calorimetry in biochemistry and biology, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 3, 35 – 51
80. T. Thurn, S. Couderc, J. Sidhu, D.M. Bloor, J. Penfold, J.F. Holzwarth, E. Wyn Jones (2002) Study of mixed micelles and interaction parameters for ABA triblock copolymers of the type  $EOn-POn-EOn$  and ionic surfactants: Equilibrium and structure, *Langmuir* 18, 9267 – 9275
81. J. Vater (1986) Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants, *Progr. Coll. Polym. Sci.* 72, 12 – 18
82. J. Vater (1989) Lipopeptides, an interesting class of microbial secondary metabolites In: *Biologically Active Molecules*, U. P. Schlunegger (ed), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, S. 27 – 38
83. J. Velikonja, N. Kosaric (1993) Biosurfactant in food application, In: Kosaric N. (ed) "Biosurfactants - production, properties and applications", Dekker, New York, 419 – 446



84. D. Vollenbroich (Dissertation 1996) Biosynthese und biotechnologische Anwendungen des Lipopeptids Surfactin aus *Bacillus subtilis*, Technische Universität Berlin
85. D. Vollenbroich, M. Özel, J. Vater, R. M. Kamp und G. Pauli (1997) Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*, *Biologicals* 25, 289 – 297
86. D. Vollenbroich, G. Pauli, M. Özel, J. Vater (1997) Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*, *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 44 – 49
87. R. Winter, F. Noll (1998) Methoden der Biophysikalischen Chemie, Teubner Verlag, Stuttgart
88. P. N. Yi, R. C. MacDonald (1973) Temperature dependence of optical properties of aqueous dispersions of phosphatidylcholine, *Chem. Phys. Lipids* 11, 114 – 134
89. J. E. Zajic, H. Gignard, D. F. Gerson (1977) Properties and biodegradation of a bio-emulsifier from *Corynebacterium-hydrocarboclatus* *Biotechnol. Bioeng.* 19, 1303 – 1320
90. P. Zuber, M. M. Nakano, M. A. Marahiel (1993) Peptide antibiotics. In : A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, R. Losick (Eds). *Bacillus subtilis* and other Gram positive bacteria, American Society for Microbiology, 897 – 919
91. A. I. Zouboulis, K. A. Matis, N. K. Lazaridis, P. N. Golyshin (2003) The use of biosurfactants in flotation: application for the removal of metal ions, *Minerals Engineer.* 16, 1231 – 1236

**8 Anhang:****9 Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1	Das Fluid-Mosaik-Modell einer biologischen Membran .....	2
Abb. 2	Struktur der Lipidaggregate .....	5
Abb. 3	Strukturformeln der Phospholipide .....	7
Abb. 4	Endotherme Phasenumwandlung der Membran .....	9
Abb. 5	Modell der Hauptphasenumwandlung der Vesikel .....	10
Abb. 6	Phasendiagramm der DPPC .....	11
Abb. 7a	Struktur von Surfactin .....	13
Abb. 7b	MALDI-TOF-Massenspektrum von Surfactin .....	14
Abb. 8	DSC-Blockdiagramm .....	19
Abb. 9	Optisches System des Photometers RF-5000 .....	24

**9.1 Wechselwirkung des Lipopeptids Surfactin mit DMPC-Vesikeln****9.1.1 Differential-Scanning-Kalorimetrie (DSC)- Messungen**

- DMPC-Vesikel ([DMPC] = 2,5 mM) in Gegenwart von

Abb. 10	0 bis 3 Mol% Surfactin .....	33
Abb. 11	4 bis 6 Mol% Surfactin .....	33
Abb. 12	7 bis 10 Mol% Surfactin .....	34
Abb. 13	15 bis 30 Mol% Surfactin .....	34
Abb. 14	Abhängigkeit der Phasenübergangstemperatur $T_{\max}$ der DMPC-Vesikel von der Surfactin-Konzentration .....	36
Abb. 15	Abhängigkeit der Umwandlungsenthalpie $\Delta H_{\text{cal}}$ der DMPC-Vesikel von der Surfactin-Konzentration .....	37

**9.1.2 Statische Licht-Streuungs-Messungen**

- Lichtstreuungsintensität der DMPC-Vesikel ([DMPC] = 2,5 mM)  
in Gegenwart von

Abb. 16	0 bis 3 Mol% Surfactin .....	38
Abb. 17	4 Mol% Surfactin .....	39

Abb. 18	5 Mol% Surfactin .....	40
Abb. 19	6 Mol% Surfactin .....	40
Abb. 20	7 Mol% Surfactin .....	41
Abb. 21	8 Mol% Surfactin .....	41
Abb. 22	10 Mol% Surfactin .....	42
Abb. 23	15 Mol% Surfactin .....	42
Abb. 24	20 Mol% und 30 Mol% Surfactin .....	43
Abb. 25	Phasenübergangstemperatur $T_m$ der DMPC-Vesikel in Abhängigkeit von der Surfactin-Konzentration .....	45

### 9.1.3 Kryoelektronenmikroskopie-Aufnahmen

- der DMPC-Vesikel ( $[DMPC] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von

Abb. 26	0 Mol% Surfactin .....	47
Abb. 27	2 Mol% Surfactin .....	48
Abb. 28	4 Mol% Surfactin bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .....	49
Abb. 29	4 Mol% Surfactin bei $28 \text{ }^\circ\text{C}$ .....	50
Abb. 30	8 Mol% Surfactin .....	51

### 9.1.4 Neutronenkleinwinkelstreuungs-Messungen

Abb. 31	Streulichtintensität $I(Q)$ als Funktion des Streuvektors $Q$ von DMPC-Vesikeln in Gegenwart von 30 Mol% Surfactin .....	52
---------	---	----

### 9.1.5 Poor Man's Temperatursprung-Messungen

- Temperatursprung- Experiment an DMPC-Vesikeln  
( $[DMPC] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von

Abb. 32	0 Mol% Surfactin im Bereich von $14 - 32 \text{ }^\circ\text{C}$ .....	54
Abb. 33	1 Mol% Surfactin im Bereich von $14 - 32 \text{ }^\circ\text{C}$ .....	54
Abb. 34	2 Mol% Surfactin im Bereich von $14 - 32 \text{ }^\circ\text{C}$ .....	55
Abb. 35	3 Mol% Surfactin im Bereich von $14 - 32 \text{ }^\circ\text{C}$ .....	55
Abb. 36	4 Mol% Surfactin im Bereich von $24 - 35 \text{ }^\circ\text{C}$ .....	56
Abb. 37	Relaxationszeit $\tau$ für die langsame Konformationsänderung bei der Hauptphasenumwandlung von DMPC-Vesikeln als Funktion der Surfactin-Konzentration .....	57

## 9.2 Wechselwirkung des Lipopeptids Surfactin mit DPPC-Vesikeln

### 9.2.1 Differential-Scanning-Kalorimetrie ( DSC )- Messungen

- DPPC-Vesikel ( $[DPPC] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von

Abb. 38	0 bis 4 Mol% Surfactin .....	59
Abb. 39	5 bis 15 Mol% Surfactin .....	59
Abb. 40	20 bis 35 Mol% Surfactin .....	60
Abb. 41	Abhängigkeit der Phasenübergangstemperatur $T_{\max}$ der DPPC-Vesikel von der Surfactin-Konzentration .....	62
Abb. 42	Abhängigkeit der Umwandlungsenthalpie $\Delta H_{\text{cal}}$ der DPPC-Vesikel von der Surfactin-Konzentration .....	63

### 9.2.2 Statische Licht-Streuungs-Messungen

- Lichtstreuungsintensität der DPPC-Vesikel  
( $[DPPC] = 2,5 \text{ mM}$ ) in Gegenwart von

Abb. 43	0 – 4 Mol% Surfactin .....	65
Abb. 44	5 Mol% Surfactin .....	65
Abb. 45	10 Mol% Surfactin .....	66
Abb. 46	15 Mol% Surfactin .....	66
Abb. 47	20 Mol% Surfactin .....	67
Abb. 48a	25 Mol% Surfactin .....	67
Abb. 48b	25 Mol% Surfactin .....	68
Abb. 49	30 Mol% Surfactin .....	68
Abb. 50	Phasenübergangstemperatur $T_m$ der DPPC-Vesikel als Funktion von der Surfactin-Konzentration .....	70

---

**10 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1	Phasenübergangstemperatur $T_m$ der verschiedenen Lipidmembranen .....	8
Tabelle 2	Einfluss des pH-Wertes auf Form und Größe der Surfactin-Micellen .....	15
Tabelle 3	Einfluss von Surfactin auf die endotherme Phasenumwandlung von DMPC-Vesikeln .....	35
Tabelle 4	Phasenübergangstemperatur $T_m$ der DMPC-Vesikel als Funktion von der Surfactin-Konzentration .....	44
Tabelle 5	Relaxationszeit $\tau$ für die langsame Konformationsänderung bei der Hauptphasenumwandlung von DMPC-Vesikeln in Abhängigkeit von der Surfactin-Konzentration .....	56
Tabelle 6	Einfluss von Surfactin auf die endotherme Hauptphasenumwandlung der DPPC-Vesikel .....	61
Tabelle 7	Phasenübergangstemperatur $T_m$ der DPPC-Vesikel in Abhängigkeit von der Surfactin-Konzentration .....	69

**11 Abkürzungsverzeichnis**

Asp	Asparaginsäure
Ala	Alanin
Cp	Wärmekapazität bei konstantem Druck
$\Delta C_m$	Molare Wärmekapazität
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholin
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DC-Platten	Dünnschichtchromatographie-Fertigplatten
DSC	Differential-Scanning-Kalorimetrie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Glu	Glutaminsäure
$\Delta H_{cal}$	Kalorimetrisch ermittelte Umwandlungsenthalpie
Leu	Leucin
NAD-ADH	Nicotinamide adenine dinucleotide abhängige Alkohol dehydrogenase
PT-Jump	Poor Man's Temperature Jump
$T_m$	Phasenübergangstemperatur
$\Delta T_{1/2}$	Kalorimetrisch ermittelte Halbwertsbreite
TPE	Umwandlungstemperatur von Phosphatidylethanolamin-Membran
TPS	Umwandlungstemperatur von Phosphatidylserin-Membran
TPC	Umwandlungstemperatur von Phosphatidylcholin-Membran
TPG	Umwandlungstemperatur von Phosphatidylglycerol-Membran
Val	Valin