



# Die Rolle der Lipidordnung für zelluläre Funktionen

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. rer. nat.

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Universität Augsburg

von  
**Nicolas Färber**  
Augsburg, 02.11.2022

Erstgutachter: Prof. Dr. Christoph Westerhausen  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Janina Bahnemann

Termin der mündlichen Prüfung: 17.01.2023

# Inhalt

1.	Motivation.....	1
2.	Grundlagen.....	2
2.1.	Lipidordnung und Phasenübergänge .....	2
2.2.	Optische Messung der Lipidordnung .....	6
2.3.	Membrantransport.....	9
2.4.	Scherkräfte .....	11
3.	Methoden.....	12
3.1.	Zellkultur und Zellpräparation.....	12
3.1.1.	Zellkultur.....	12
3.1.2.	Membranfärbung mit Laurdan.....	12
3.1.3.	Membranfärbung mit den Farbstoffen Pro12A und NR4A .....	13
3.1.4.	Reduktion des zellulären Membrancholesterols.....	13
3.1.5.	B35-Neuroblastom-Differenzierung.....	13
3.1.6.	Adaptation an sub-physiologische Temperaturen .....	13
3.1.7.	Lipidextraktion und Synthese von Vesikeln aus zellulären Lipiden.....	14
3.1.8.	Rote Blutkörperchen .....	14
3.2.	Präparation synthetischer Lipidmembranen.....	15
3.2.1.	Synthese multilamellarer Vesikel .....	15
3.2.2.	Synthese unilamellarer Riesenvesikel .....	15
3.3.	Dynamische Differenzkalorimetrie.....	16
3.4.	Fluoreszenzspektroskopie .....	17
3.4.1.	Statische Phasenzustandsmessung .....	18
3.4.2.	Phasenzustandsmessung unter Scherflusseinwirkung.....	19
3.5.	Fluoreszenzmikroskopie .....	19
3.5.1.	Phasenzustandsmessung an Zellen .....	20
3.5.2.	Transportmessung an Zellen .....	22
3.5.3.	Permeabilitätsmessungen an Vesikeln nach Schereinwirkung .....	24
4.	Ergebnisse und Diskussion .....	26
4.1.	Optische Detektion von Phasenübergängen in Vesikel- und Zellsuspensionen .....	27
4.1.1.	Kalorimetrische und optische Vermessung von Phasenübergängen in Vesikeln .....	27
4.1.2.	Messtechnische Einflussfaktoren auf die optische Analyse von Zellsuspensionen .....	29
4.1.3.	Vergleich von Phasenübergängen in Vesikeln und Zellmembranen .....	31
4.1.4.	Sensitivität gegenüber Adaptation und Cholesterolgehalt .....	32
4.1.5.	Sensitivität gegenüber Anästhetika und morphologischen Änderungen .....	35
4.1.6.	Sensitivität gegenüber dem pH-Wert.....	38
4.1.7.	Fazit .....	40
4.2.	Untersuchung der Lipidordnung auf Einzelzellniveau.....	41

4.2.1.	Vergleich adhärenter und suspendierter Zellen.....	41
4.2.2.	Messtechnische Einflussfaktoren auf die optische Analyse adhärenter Zellen .....	43
4.2.3.	Interzelluläre Variation der Lipidordnung .....	44
4.2.4.	Intrazelluläre Variation der Lipidordnung .....	46
4.2.5.	Fazit .....	49
4.3.	Poröser Membrantransport in Zellen.....	50
4.3.1.	Messtechnische Einflussfaktoren der Permeabilitätsmessung mit Rhodamin B.....	50
4.3.2.	Membrantransportmessungen mit Rhodamin B .....	54
4.3.3.	Membrantransportmessungen mit Hoechst 33342.....	60
4.3.4.	Einfluss der Zelldichte auf den Membranzustand und den Membrantransport .....	62
4.3.5.	Physiologische Relevanz des phasenzustandsabhängigen Membrantransports.....	64
4.3.6.	Fazit .....	66
4.4.	Membranzustand und Nanopartikeltransport.....	67
4.4.1.	Phasenzustandsänderungen induziert durch Nanopartikel in synthetischen Vesikeln	67
4.4.2.	Phasenzustandsänderungen induziert durch Nanopartikel in Zellsuspensionen .....	69
4.4.3.	Phasenzustandsänderungen und Transportmessungen an adhärennten Zellen.....	70
4.4.4.	Fazit .....	73
4.5.	Phasenzustand und Membrantransport unter Scherfluss .....	74
4.5.1.	Permeabilität unter Scherfluss nahe eines Phasenübergangs .....	75
4.5.2.	Phasenzustandsänderungen unter Scherfluss .....	79
4.5.3.	Permeabilität unter Scherfluss abseits des Phasenübergangs.....	82
4.5.4.	Fazit .....	84
4.6.	Alternative polaritätssensitive membrangebundene Fluoreszenzfarbstoffe .....	85
4.6.1.	Sensitivität gegenüber der Lipidordnung synthetischer Membranen .....	86
4.6.2.	Phasenübergänge in zellulären Plasmamembranen .....	88
4.6.3.	Fazit .....	91
5.	Schlussfolgerung und Ausblick .....	92
6.	Literaturverzeichnis.....	93
7.	Anhang .....	98
7.1.	Python Skript zur Analyse spektraler Daten.....	98
7.2.	Fiji-Skript zum Zusammenfügen einzelner Bilddateien und zur Vesikelanalyse .....	102
7.3.	Python-Skript zur Zellanalyse .....	107
7.4.	Python-Skript zur Zellverfolgung und zur thermodynamischen Analyse.....	117
7.5.	Publikationen.....	121
7.6.	Betreute Abschlussarbeiten .....	122

# 1. Motivation

Mit der Entdeckung der Zellmembran durch Carl Wilhelm von Nägeli 1855 wurde ihr die erste Funktion zugeschrieben: Die Separierung des Zellinneren vom Zelläußeren [1]. 1877 ergänzte Wilhelm Pfeffer das Aufgabenrepertoire um die Kompartimentierung des Zellinneren in Zellorganellen [2]. Evert Gorter und François Grendel identifizierten 1925 Lipide als die Moleküle, die diese Zellfunktionen erfüllen [3]. Das Modell der Zellmembran wurde 1935 durch Jim Danielli und Hugh Davson um den zweiten Hauptbestandteil erweitert: die Proteine [4]. Lipide spielten in der weiteren Entwicklung von Membranmodellen wie dem Flüssig-Mosaik-Modell 1972 und dem Matratzen-Modell 1984 lediglich die Rolle der Trägermoleküle, zwischen welchen Proteine eingebettet waren [5,6]. Letztere waren nach damaliger Auffassung für alle übrigen interessanten Zellfunktionen wie Migration, Adhäsion und Signaltransduktion zuständig.

Aktuellere Studien weisen jedoch darauf hin, dass Lipide bzw. die Anordnung der Lipide, ebenfalls komplexe Membranfunktionen beeinflussen und steuern können: Beispielsweise wurde an der immunologischen Synapse von aktivierten T-Zellen eine lokal erhöhte Ordnung der Lipidmoleküle gemessen [7,8]. Die Wahrscheinlichkeit der Aufnahme eines Virus in eine Zelle, also die Infektiosität, ist von der Lipidordnung der Virusmembran abhängig und ebenfalls das Austreten aus der Wirtszelle durch Virusknospung findet vor allem an Membranregionen mit hoher Lipidordnung statt [9–11]. Während sich die Adhäsionspunkte von Zellmembranen ebenfalls durch eine erhöhte Ordnung der Membranlipide auszeichnen, wurde eine erhöhte Migration an Zellen mit geringerer Membranbiegesteifigkeit gemessen, welche wiederum durch eine reduzierte Lipidordnung hervorgerufen wird [12–14]. Ein prominentes Beispiel einer Zellfunktion, die auf Basis des Modells von Alan Hodgkin und Andrew Huxley klassischerweise mit Membranproteinen assoziiert wird, ist die Reizweiterleitung in Nervenzellen [15]. Hinweise wie die Absenz von Verlustwärme durch Ionenströme, Änderungen der Membrandicke während des Aktionspotentials und die unspezifische Wirkung von Anästhetika deuten jedoch darauf hin, dass anstelle elektrischer Spannungen die dynamische Änderung der Membranlipidordnung der Informationsträger sein könnte [16,17].

Diese Arbeit ist durch die Fragestellung motiviert, ob lipidassoziierte Zellfunktionen auf Basis bestehender thermodynamischer Beschreibungen einfacher Modellsysteme erklärt, vorhergesagt und perspektivisch manipuliert werden können. Im Fokus stand daher die experimentelle Bestimmung der Lipidordnung sowohl in lebenden Zellkulturen als auch in synthetischen Lipidvesikeln als Modellsystem. Die Analyse der Lipidordnung in biologischen Membranen wurde mit einem optischen Verfahren vollzogen, welches auf der spektroskopischen Vermessung von membrangebundenen, polaritätssensitiven Fluoreszenzfarbstoffen beruht. Die optischen Daten wurden durch Vergleich mit der etablierten Methodik der Dynamischen Differenzkalorimetrie an synthetischen Modellsystemen validiert. Des Weiteren wurde der Transport von Substanzen über die Zellmembran hinweg als Beispiel für eine Zellfunktionalität, an beiden Systemen abhängig von der Lipidordnung, untersucht. Hierfür wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die Aufnahme von Fluorophoren ins Zellinnere quantifiziert.

Konkret standen zwei Hypothesen im Fokus der Studie. Erstens: Zellmembranen zeigen analog zu synthetischen Lipidvesikeln kooperative Übergänge des Ordnungszustands. Zweitens: Der Stofftransport über die Zellmembran hinweg steht in Abhängigkeit zur Ordnung der Lipide.

Im Folgend werden zunächst die physikalischen Grundlagen der thermodynamischen Beschreibung von Lipidsystemen behandelt. Konkret beinhaltet dies die Beschreibung von Phasenübergängen, deren optische und kalorimetrische Charakterisierung sowie den phasenzustandsabhängigen Membrantransport. Nach der Beschreibung der experimentellen Methoden folgt die Präsentation und Diskussion der Ergebnisse.

## 2. Grundlagen

### 2.1. Lipidordnung und Phasenübergänge

Lipide organisieren sich aufgrund ihres amphiphilen Charakters in wässrigen Lösungen zu Doppellagen, wobei sich die Moleküle so orientieren, dass die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten von den umgebenden Wassermolekülen abgeschirmt werden. Eine solche Lipidbilage bildet das Grundgerüst biologischer Membranen und kann synthetisch mittels verschiedener Herstellungsverfahren nachgebildet werden. Im Rahmen dieser Studie wurden als Modellsystem für tierische Zellmembranen zum einen multilamellare Vesikel untersucht. Diese sind zwar kleiner als Tierzellen und bestehen aus mehreren Bilagen, wie in Abbildung 1 illustriert ist, können jedoch mit geringem Aufwand synthetisiert werden. Des Weiteren wurden unilamellare Riesenvesikel verwendet, welche aufgrund der mit Zellen vergleichbaren Größe ein beliebtes Modellsystem für die äußere Zellmembran sind. Sie unterscheiden sich dennoch signifikant von biologischen Membranen, welche aus komplexen Lipid- und Proteinkompositionen bestehen. Es folgt eine thermodynamische Beschreibung einfacher Lipidsysteme, welche sich an den in [18] beschriebenen Ausführungen orientiert.

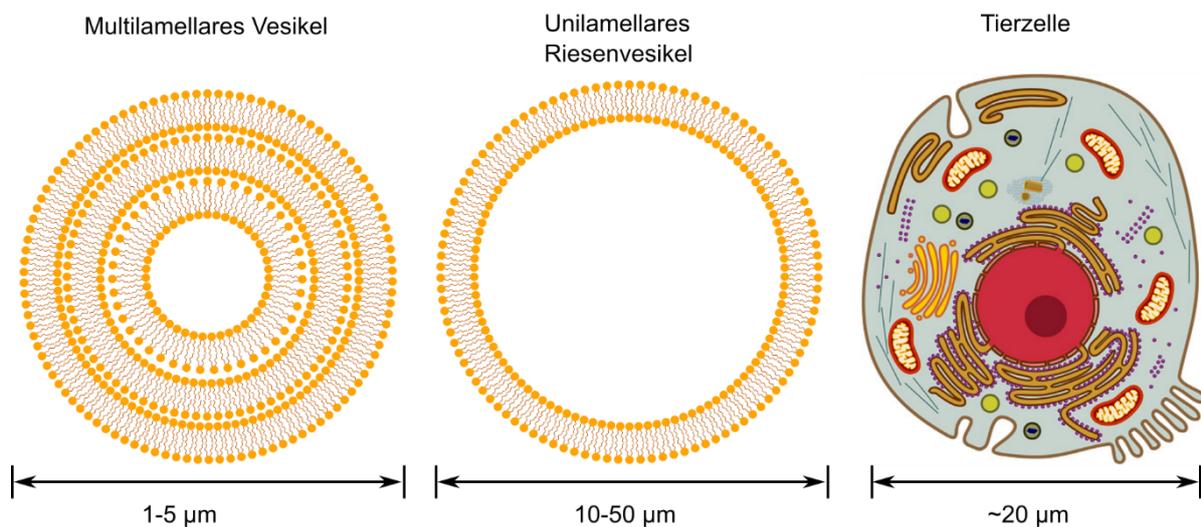


Abbildung 1 Zwei synthetische Lipidsysteme, welche sich durch Größe und Anzahl der Lipiddoppellagen unterscheiden, wurden als Modell für tierische Zellmembranen verwendet. Die Illustration der Tierzelle entstammt [19].

Aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung der Lipidmoleküle innerhalb einer Membran kann das Lipidsystem abhängig von äußeren Variablen wie Temperatur, Druck oder pH-Wert verschiedene Phasenzustände annehmen. Exemplarisch hierfür ist in Abbildung 2 die isobare Wärmekapazität

$$c_p = \left. \frac{\partial Q}{\partial T} \right|_p$$

von multilamellaren Vesikeln synthetisiert aus Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC oder 14:0 PC) über ein Temperaturintervall aufgetragen, in welchem sich die Membran der Lipidvesikel bei niedrigen Temperaturen in der sog. Gelphase und bei höheren Temperaturen in der fluiden Phase befindet. Während die Lipidmoleküle in der Gelphase lateral in einem Dreiecksgitter angeordnet und alle Kohlenwasserstoffketten in der gleichen Konformation vorliegen, zeichnet sich die fluide Phase durch die Absenz der Ordnung von Kopfgruppen und Ketten aus [18]. Man spricht daher auch von der geordneten und ungeordneten Phase. Zwischen diesen beiden Regimen indiziert das Wärmekapazitätsmaximum in

Abbildung 2 einen Phasenübergang erster Ordnung, der sich nach der Ehrenfest-Klassifikation durch eine Unstetigkeit der ersten Ableitung der freien Enthalpie  $G$  nach der Temperatur  $T$  bei der Schmelztemperatur  $T_m$  auszeichnet:

$$\left. \frac{\partial G_{\text{Gelphase}}}{\partial T} \right|_{T_m} \neq \left. \frac{\partial G_{\text{Fluide Phase}}}{\partial T} \right|_{T_m}.$$

Demnach ändert sich die Entropie  $S$ , welche für konstanten Druck  $p$  der negativen Ableitung der freien Enthalpie  $G$  nach der Temperatur entspricht,

$$S = - \left. \frac{\partial G}{\partial T} \right|_p$$

am Phasenübergang sprunghaft von  $S_{\text{Gelphase}}$  nach  $S_{\text{Fluide Phase}}$  um die Schmelzentropie  $\Delta S$ . Zusammen mit dem enthalpischen Beitrag  $H$  der freien Enthalpie  $G$  ergibt sich die Änderung der freien Enthalpie  $\Delta G$  aus

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S,$$

wobei  $\Delta H$  als Schmelzenthalpie bezeichnet wird. Beide Größen  $\Delta H$  und  $\Delta S$  können experimentell aus der isobaren Wärmekapazität  $c_p$  bestimmt werden. Bei konstantem Druck  $p$  gilt

$$dH = T dS = dQ,$$

sodass die Schmelzenthalpie  $\Delta H$  durch Integration der Wärmekapazität  $c_p$  berechnet werden kann:

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} \frac{\partial H}{\partial T} dT = \int_{T_1}^{T_2} \frac{\partial Q}{\partial T} dT = \int_{T_1}^{T_2} c_p dT.$$

Hierbei liegt  $T_1$  unter- und  $T_2$  oberhalb der Schmelztemperatur  $T_m$ . Für die Schmelzentropie  $\Delta S$  gilt:

$$\Delta S = \int_{T_1}^{T_2} \frac{\partial S}{\partial T} dT = \int_{T_1}^{T_2} \frac{1}{T} \frac{\partial Q}{\partial T} dT = \int_{T_1}^{T_2} \frac{c_p}{T} dT \approx \frac{\Delta H}{T_m},$$

wobei die Approximation aus dem Quotienten von  $\Delta H$  und  $T_m$  nur für scharfe Phasenübergänge anwendbar ist.

Wird das Lipidsystem als ideales Gas aus der Anzahl  $N_G$  von Lipiden in der Gelphase und  $N_F$  Lipiden in der fluiden Phase approximiert, so bewirkt eine Änderung der Teilchenzahl  $dN_G$  bzw.  $dN_F$  in der jeweiligen Phase eine Änderung des Partialdrucks  $dp_G$  bzw.  $dp_F$ . Die Änderung der freien Enthalpie entspricht dabei

$$dG_G = V dp_G \quad \text{und} \quad dG_F = V dp_F,$$

sodass mithilfe des Gesetzes des idealen Gases

$$PV = Nk_B T$$

der Übergang vom ursprünglichen Zustand  $G_0$  zum Zustand  $G$  nach dem Wechsel von Lipiden zwischen Gelphase und fluiden Phase beschrieben werden kann durch

$$G_G = G_G^0 + \int_{p_0}^p V dp_G = G_G^0 + RT \ln \left( \frac{p_G}{p_G^0} \right) = G_G^0 + RT \ln \left( \frac{N_G}{N_G^0} \right) \quad \text{und} \quad G_F = G_F^0 + RT \ln \left( \frac{N_F}{N_F^0} \right).$$

Im thermodynamischen Gleichgewicht entsprechen sich  $G_G$  und  $G_F$ , sodass obiger Zusammenhang umgeformt werden kann zu:

$$\frac{N_F}{N_G} = \exp\left(-\frac{G_F^0 - G_G^0}{RT}\right) = \exp\left(-\frac{\Delta G^0}{RT}\right).$$

Durch weitere Umformung und dem Zusammenhang

$$\Delta G_0 = \Delta H_0 - T\Delta S_0$$

ergibt sich die sogenannte Van't Hoff Gleichung

$$\frac{\partial \ln\left(\frac{N_F}{N_G}\right)}{\partial T} = \frac{\Delta H_0}{RT^2}.$$

Die Van't Hoff Gleichung beschreibt in diesem Beispiel die Zahl von Lipiden in der Gelphase und der fluiden Phase in Abhängigkeit der Temperatur und der Schmelzenthalpie  $\Delta H^0$ . Sie spiegelt das Verhalten von scharfen Phasenübergängen mit einer Halbwertsbreite von weniger als einem Kelvin, wie er in Abbildung 2 dargestellt ist, jedoch nicht korrekt wider, weil sie auf der Annahme basiert, dass die einzelnen Lipide unabhängig voneinander schmelzen. Gerade unimolekulare synthetische Lipidvesikel zeichnen sich jedoch durch eine hohe Kooperativität, also einer gegenseitigen Beeinflussung der einzelnen Lipide hinsichtlich des Phasenzustands, aus. Die Van't Hoff Enthalpie  $\Delta H_{vH}$

$$\Delta H_{vH} = n \Delta H_0$$

berücksichtigt Domänen der Größe  $n$ , innerhalb derer Lipide kooperativ schmelzen und führt bei der Verwendung in der Van't Hoff Gleichung anstelle von  $\Delta H_0$  zu einem schärferen Phasenübergangprofil.

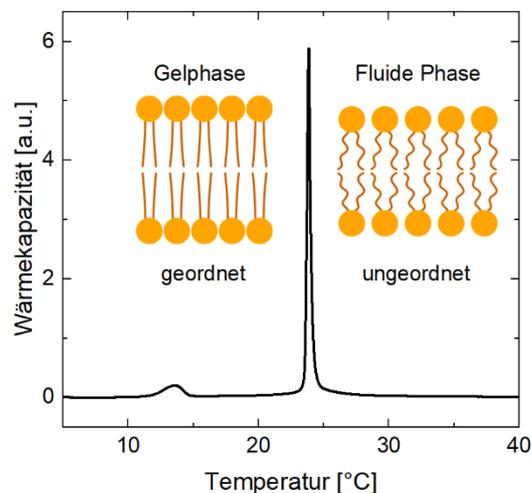


Abbildung 2 Wärmekapazitätsprofil von multilamellaren Vesikeln aus DMPC. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur ist die Membran in der Gelphase, welche sich durch hohe Ordnung der Lipidmoleküle auszeichnet. In der fluiden Phase ist die Lipidordnung dagegen reduziert.

An der Phasenübergangstemperatur  $T_m$  ändern sich neben der Lipidordnung auch die mechanischen Eigenschaften von Lipidmembranen sprunghaft: Während beim Übergang von der geordneten in die ungeordnete Phase die Membranfläche, deren Volumen und die Kompressibilität zunehmen, nehmen die Membrandicke und die Biegesteifigkeit ab [20]. Direkt am Phasenübergang, also bei der Schmelztemperatur, sind sowohl die Membrankompressibilität als auch deren Biegesteifigkeit etwa zehnfach erhöht, woraus unter anderem eine maximale Membranpermeabilität resultiert, was im Kapitel Membrantransport thematisiert wird [18].

Neben der Temperatur ist der Phasenzustand eine Funktion weiterer Variablen, wie zum Beispiel des Drucks: Die Schmelztemperatur von DMPC Vesikeln wird unter einem Druck von  $\Delta P = 168$  bar von

$T_m = 23,6\text{ °C}$  zu  $T_m = 27,4\text{ °C}$  verschoben [20]. Druck bewirkt daher eine Expansion der Gelphase bzw. Erhöhung der Lipidordnung. Dagegen wird die Schmelztemperatur im Falle geladener Lipide mit steigendem pH Wert reduziert, die Lipidordnung also verringert [21]. Weitere Zustandsvariablen sind beispielsweise die Salzkonzentration oder elektrische Felder [22,23].

Während, wie in Abbildung 2 gezeigt, Membranen, die ausschließlich aus einem Lipid bestehen, scharfe Phasenübergänge aufweisen, nimmt die Kooperativität in Lipidmischungen mit steigender Zahl von Lipidsorten ab [24]. Die daraus resultierende Übergangsbreiterung wird ebenfalls bei der Beimischung von Proteinen zu Lipidmembranen beobachtet [25]. Es ist daher nicht selbstverständlich, dass kooperative Phasenübergänge in biologischen Membranen auftreten, welche aus hunderten verschiedenen Lipidsorten und in etwa zu gleichen Anteilen aus Proteinen bestehen. Heimburg et al. konnten jedoch breite Übergänge in Membranen von *Escherichia Coli* Bakterien nachweisen, wie in Abbildung 3 dargestellt ist.

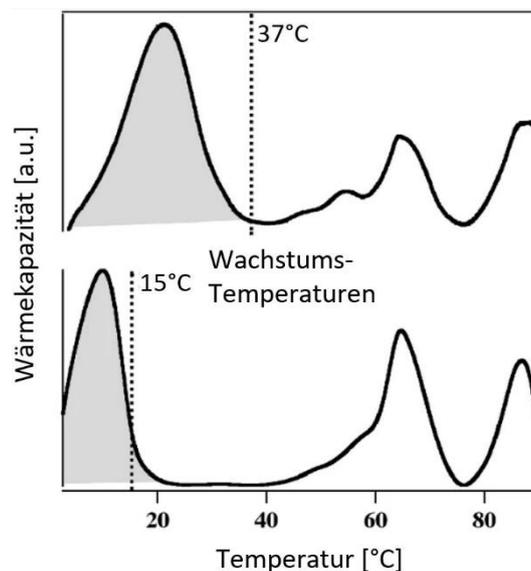


Abbildung 3 Wärmekapazitätsprofil von *Escherichia Coli* Membranen [26]. Oben: Messung an Bakterien, deren Wachstumstemperatur  $T = 37\text{ °C}$  betrug. Unten: Messung an einer Kultur bei  $T = 15\text{ °C}$ .

Darüber hinaus verschob sich der Übergang zu niedrigeren Temperaturen, nachdem die Wachstumstemperatur von  $37\text{ °C}$  auf  $15\text{ °C}$  reduziert wurde. In beiden Fällen liegt der Übergangsbereich knapp unterhalb der Wachstumstemperatur, sodass die Vermutung nahe liegt, dass die untersuchten Bakterien aktiv ihre Membraneigenschaften so geändert haben, dass ihre Membran in der fluiden Phase liegt. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass Organismen auf von außen induzierte Zustandsänderungen mit der Anpassung der Membranlipidkomposition reagieren [27]. Dies stützt die Überlegung, dass eine Korrelation von Zellmembranzustand und Zellfunktionen gegeben ist.

## 2.2. Optische Messung der Lipidordnung

Der Phasenzustand von Vesikeln und Zellmembranen wurde im Rahmen dieser Arbeit optisch über die spektrale Analyse des membrangebundenen Farbstoffs Laurdan vermessen. Dies bietet zum einen den Vorteil, dass Phasenzustandsmessungen *in situ* auch unter dynamischen Bedingungen, wie unter Fluss, durchgeführt werden konnten, wohingegen kalorimetrische Messungen nur statisch möglich sind. Zum anderen sind Phasenübergänge in biologischen Membranen in der Regel weniger kooperativ als in synthetischen Membranen, weshalb sie mittels Kalorimetrie oftmals nicht erfasst werden können.

Innerhalb von Lipidmembranen befindet sich die Naphthalengruppe des Laurdanmoleküls am Übergang des apolaren Bereichs der Kohlenwasserstoffketten zur polaren Region der Kopfgruppen. Die apolare Laurinsäure ist dagegen in hydrophoben Bereichen der Membran lokalisiert, wie in Abbildung 4 am Beispiel einer Dipalmitoylphosphatidylcholin (DOPC) Membran abgebildet [28]. Aufgrund dieser Orientierung befindet sich der optisch aktive Teil von Laurdan nahe an der wässrigen Umgebung von Lipidbilagen, wo die Membranhydratisierung stark abhängig vom Membranphasenzustand ist.

In der fluiden Phase sind die Hydratisierung der Membran und die Mobilität der Wassermoleküle aufgrund der geringen Lipidordnung hoch [29,30]. Infolgedessen ist der Energieverlust nach optischer An-

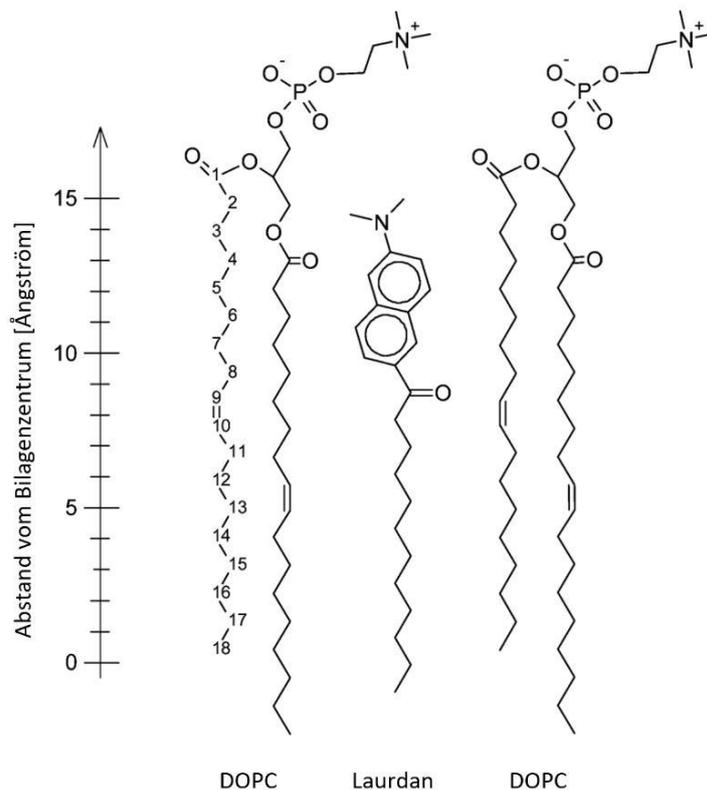


Abbildung 4 Die Lage des Fluorophors Laurdan innerhalb einer Dipalmitoylphosphatidylcholin (DOPC) Membran [28].

regung des Laurdanmoleküls aufgrund von Reorientierung der umliegenden Wassermoleküle ebenfalls hoch. In diesem Fall erfolgt auf eine Anregung mit Licht der Wellenlänge  $\lambda = 360$  nm eine Emission bei  $\lambda = 490$  nm, wie im Jabłoński-Diagramm in Abbildung 5 skizziert ist. Der beschriebene Effekt, welcher als Lösungsmittelrelaxation bezeichnet wird, ist in der Gelphase stark reduziert, da aufgrund erhöhter Membranordnung die Zahl der Wassermoleküle und deren Relaxationsdynamik geringer sind. Dadurch fällt die Lösungsmittelrelaxation schwächer aus und nach Anregung erfolgt Emission von Licht der Wellenlänge  $\lambda = 440$  nm. Somit kann durch spektrale Analyse des Emissionslichts von Laurdan der Phasenzustand von Lipidmembranen analysiert werden.

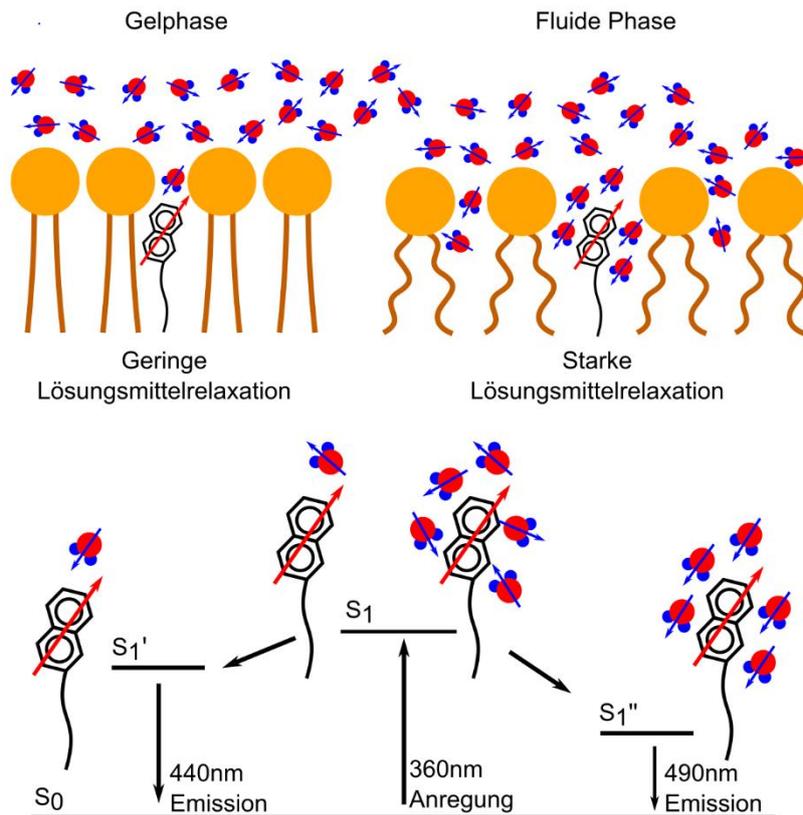


Abbildung 5 Oben: Optisch angeregtes Laurdanmolekül in einer geordneten und ungeordneten Lipidmembran. In der Gelphase ist die Hydratisierung der Membran gering, sodass wenig Anregungsenergie vom Laurdanmolekül auf benachbarte Wasser-Moleküle übertragen wird. In der fluiden Phase sind die Hydratisierung der Membran und die Mobilität der Wasser-Moleküle dagegen hoch, sodass eine starke Lösungsmittelrelaxation stattfindet. Unten: Jablonski-Diagramm der optischen Übergänge von Laurdan. Abhängig vom Phasenzustand der Lipidmembran folgt auf eine Anregung bei einer Wellenlänge von 360nm eine Emission zwischen 440 nm (Membranordnung hoch) und 490 nm (Membranordnung gering).

Ein Maß für den Ordnungszustand von Lipidmembranen ist die generalisierte Polarisation (GP) [31]:

$$GP = \frac{I_{440 \text{ nm}} - I_{490 \text{ nm}}}{I_{440 \text{ nm}} + I_{490 \text{ nm}}}$$

Hierbei bezeichnen  $I_{440}$  und  $I_{490}$  die Fluoreszenzintensitäten bei den entsprechenden Wellenlängen  $\lambda = 440 \text{ nm}$  und  $\lambda = 490 \text{ nm}$ .

Der Parameter GP nimmt den Wert 1 für eine vollkommen geordnete und den Wert -1 für eine maximal ungeordnete Membran an und ändert sich proportional zur Ordnung der Kohlenwasserstoffketten [32]. Abbildung 6 a) zeigt GP als Maß für den Phasenzustand von DMPC Vesikeln als Funktion der Temperatur. An der Schmelztemperatur von  $T_m = 23,5 \text{ C}$  nimmt GP stark ab und indiziert damit im Einklang mit dem Wärmekapazitätsprofil den Übergang von der geordneten Gelphase in die ungeordnete fluide Phase. Die emissionsstärkste Wellenlänge verschiebt sich dabei von  $\lambda = 440 \text{ nm}$  bei  $T = 15 \text{ °C}$  nach  $\lambda = 490 \text{ nm}$  bei  $T = 35 \text{ °C}$ . Die negative Ableitung von GP nach der Temperatur  $-dGP/dT$  ist in Abbildung 6 b) dargestellt. Sie weist am Phasenübergang ein ausgeprägtes Maximum auf und verhält sich daher wie die Wärmekapazität in Abbildung 2.

Abgesehen von Laurdan wurden zwei weitere polaritätssensitive Farbstoffe, Pro12A und NR4A, zur Untersuchung von synthetischen und zellulären Membranen verwendet. Deren spektrale Sensitivität gegenüber der Lipidordnung basiert auf dem selbigen in Abbildung 5 dargestellten Prinzip der phasen-zustandsabhängigen Lösungsmittelrelaxation.

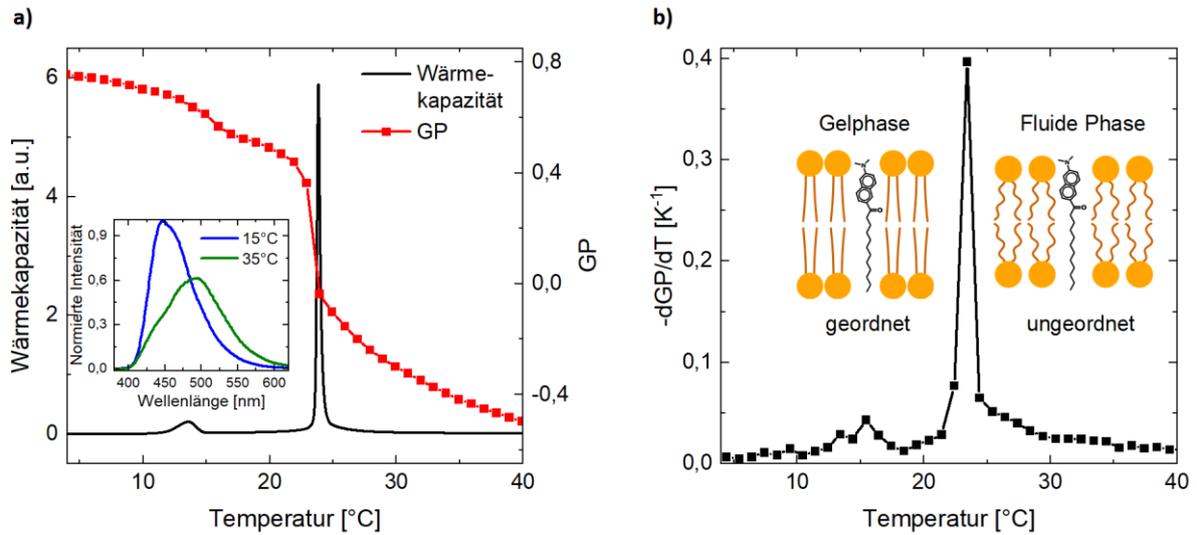


Abbildung 6 Kalorimetrische und optische Messung der Lipidordnung an synthetischen Lipidvesikeln. **a)** Die generalisierte Polarisierung (GP) von multilamellaren DMPC Vesikeln als Funktion der Temperatur. Am Phasenübergang, indiziert durch das Maximum im Wärmekapazitätsprofil, nimmt GP stark ab. Im eingesetzten Graph sind zwei Laurdanspektren unter und oberhalb des Phasenübergangs abgebildet. **b)** Die negative Ableitung der generalisierten Polarisierung nach der Temperatur ( $-dGP/dT$ ) der Vesikel aus a) als Funktion der Temperatur. Analog zur kalorimetrischen Messung indiziert ein Peak den Phasenübergang von der Gelphase in die fluide Phase.

### 2.3. Membrantransport

Für polare und geladene, aber auch allgemein für große Moleküle stellt die Lipidmembran eine Barriere dar. Es kann aber dennoch Stoffaustausch zwischen der extrazellulären Umgebung und dem Zellinneren über verschiedene Transportmechanismen stattfinden. Im Fokus dieser Arbeit standen der endozytotische und der poröse Stofftransport. Letzterer beschreibt den Austausch von membranimpermeablen Stoffen über Membranporen. Der Energiebedarf zur Bildung einer Pore des Durchmessers  $a$  in einer Membran der Größe  $A_0$  beträgt:

$$\Delta W(a) = \frac{1}{2\kappa_T^A} \left(\frac{a}{A_0}\right)^2 A_0 + \pi a \gamma,$$

wobei  $\gamma$  für die Linienspannung der Pore steht und  $\kappa_T^A$  die isotherme Flächenkompressibilität beschreibt, welche über die durch den lateralen Druck  $\Pi$  bedingte Flächenänderung  $A$  definiert ist:

$$\kappa_T^A = - \frac{1}{A} \frac{\partial A}{\partial \Pi} \Big|_T.$$

Nach Heimburg et al. [18] besteht eine direkte Proportionalität zwischen der Wärmekapazität  $c_p$  einer Lipidmembran und der isothermen Flächenkompressibilität  $\kappa_T^A$ :

$$\kappa_T^A \propto c_p,$$

woraus folgt, dass am Phasenübergang neben der Wärmekapazität auch die Flächenkompressibilität maximal ist. Infolgedessen ist die notwendige Energie zur Porenbildung am Schmelzpunkt der Membran minimal und die Permeabilität am größten, wie experimentell durch Messung der Permeationsrate an Phospholipidvesikeln gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 7) [33].

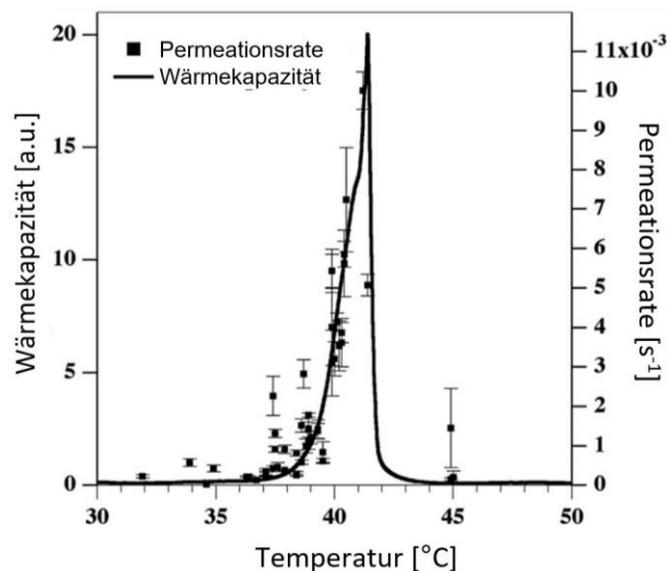


Abbildung 7 Messung der Wärmekapazität und Permeationsrate der Membran von Phospholipidvesikeln, übernommen und angepasst aus [33]. Am Phasenübergang ist die Membranpermeabilität stark erhöht.

Neben dem porösen Membrantransport kann Stoffaustausch durch Endozytose-ähnliche Einstülpung erfolgen. Dieser Prozess ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt und beinhaltet die Adhäsion eines Objekts an die Membran, die daraufhin folgende Einstülpung der Membran und zuletzt die Ablösung des membranumschlossenen Objekts. Die treibende Kraft ist dabei die Änderung der Adhäsionsenergie  $E_{Ad}$  bei Umhüllung des Objekts. Ihr entgegen stehen die Biegeenergie  $E_B$ , welche aufgewandt

werden muss, um das Objekt zu umschließen und die Spannenergie  $E_S$ , welche aufgrund des Membranverbrauchs anfällt. Das Objekt wird nur aufgenommen, wenn:

$$E_{Ad} > E_B + E_S.$$

Während sich die Spannenergie wie die bereits beschriebene Energie zur Porenbildung berechnet und damit ebenfalls von der isothermen Flächenkompressibilität  $\kappa_T^A$  abhängt, gilt für die Biegeenergie:

$$E_B = \frac{K_B}{2} \left( \frac{1}{R^2} \right)^2.$$

Auch der Biegemodul  $K_B$  steht in direktem Zusammenhang mit  $\kappa_T^A$ :

$$K_B = \frac{1}{\kappa_T^A} \frac{D^2}{16}$$

und ist daher minimal am Phasenübergang.  $D$  bezeichnet dabei die Dicke der Membran. Weil die Adhäsionsenergie auch von der Fläche abhängt, die jedes Lipidmolekül einnimmt, sind alle Energiebeiträge phasenzustandsabhängig und damit auch der Endozytose-ähnliche Membrantransport *per se*.

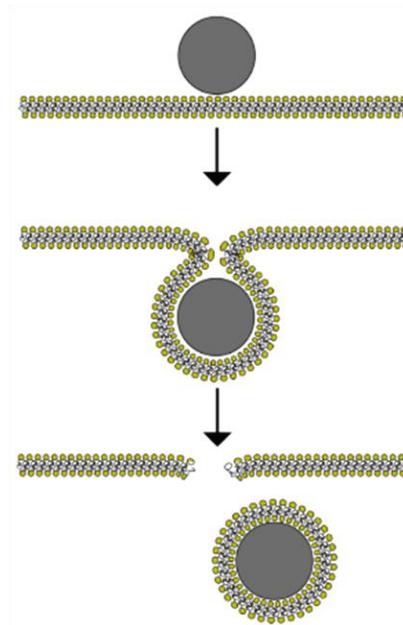


Abbildung 8 Schematische Darstellung der Endozytose-ähnlichen Aufnahme eines kugelförmigen Objekts [34]. Auf die Adhäsion der Kugel folgt die Einhüllung in die Lipidmembran. Der Prozess endet mit der Abschnürung und Loslösung des membranumhüllten Objekts.

## 2.4. Scherkräfte

Neben den Experimenten unter statischen Bedingungen werden in Kapitel 4.5 die Größen Lipidordnung und Membranpermeabilität an unilamellaren Riesenvesikeln unter Fluss gemessen. Dabei strömt eine Vesikelsuspension durch einen zylindrischen Leiter mit Radius  $R$ , wie er in Abbildung 9 in zwei Dimensionen vereinfacht dargestellt ist. Durch Wechselwirkung mit der stationären Leiterwand ergibt sich ein parabolisches Flussprofil mit zur Zylindermitte zunehmender Fließgeschwindigkeit  $v$ :

$$v(r) = v_{max} \left(1 - \frac{r^2}{R^2}\right) = 2 \frac{\dot{V}}{R^2 \pi} \left(1 - \frac{r^2}{R^2}\right).$$

Aus der räumlichen Variation der Flussgeschwindigkeit resultiert eine Schergeschwindigkeit

$$|\dot{\gamma}| = \left| \frac{dv(r)}{dr} \right| = 4 \frac{\dot{V} r}{R^4 \pi},$$

welche linear vom Zylinderzentrum  $r = 0$  zur Leiterwand zunimmt (siehe Abbildung 9) und für  $r = R$  maximal wird:

$$\dot{\gamma}_{max} = \dot{\gamma}(r = R) = 4 \frac{\dot{V}}{R^3 \pi}.$$

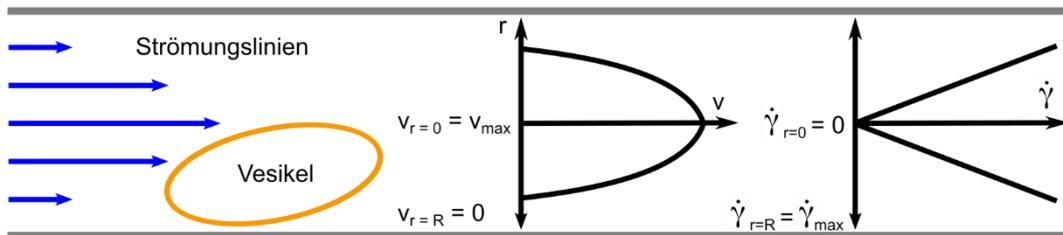


Abbildung 9 Zweidimensionale Darstellung des parabolischen Flussprofils in einem Zylinder. Während die Fließgeschwindigkeit  $v$  zum Rand hin abnimmt, ist die Schergeschwindigkeit dort maximal. Vesikel werden durch die wirkenden Scherkräfte deformiert.

Die Exposition von unilamellaren Riesenvesikeln zu einem solchen Strömungsprofil führt einerseits zu einer Verformung des gesamten Vesikels, wie in Abbildung 9 dargestellt [35]. Außerdem ergaben Simulationen, dass auch auf mikroskopischer Ebene Undulationen in Lipidmembranen durch Scherkräfte induziert werden [36]. In beiden Fällen vergrößert sich die Membranfläche  $A_0$  eines Vesikels um  $\Delta A$ . Dies bewirkt eine Änderung der freien Enthalpiedichte  $\Delta g$ , welche abhängig von der isothermen Flächenkompressibilität unterschiedlich hoch für Lipidmoleküle in der Gelphase und in der fluiden Phase ausfällt:

$$\Delta g_G = \frac{\Delta G_G}{A} = \frac{1}{2 \kappa_{T,G}^A} \left(\frac{\Delta A}{A_0}\right)^2 \quad \text{und} \quad \Delta g_F = \frac{\Delta G_F}{A} = \frac{1}{2 \kappa_{T,F}^A} \left(\frac{\Delta A}{A_0}\right)^2.$$

Die isothermen Flächenkompressibilitäten von DPPC-Lipidmembranen betragen beispielsweise  $\kappa_{T,G}^A = 1 \text{ m}^2/\text{J}$  und  $\kappa_{T,F}^A = 6,9 \text{ m}^2/\text{J}$ , weshalb die freie Enthalpie der Gelphase  $\Delta G_G$  deutlich stärker durch die Vergrößerung der Membranfläche erhöht wird [18]. Demnach würde die freie Enthalpie eines durch Scherkraft deformierten Vesikels reduziert, wenn Lipide von der Gelphase in die fluide Phase übergehen. Scherfluss könnte also eine Reduktion der Schmelztemperatur  $T_m$  von Vesikelmembranen bewirken.

## 3. Methoden

Die Untersuchung der Lipidordnung und des Membrantransports erforderte die Kultur und Präparation verschiedener Zelllinien, die Synthese von Vesikeln und die Anwendung diverser Messtechniken wie Kalorimetrie, Spektrometrie und Mikroskopie. Die erhobenen Daten wurden abhängig vom Experiment und der untersuchten Größe auf verschiedene Weisen aufbereitet und ausgewertet. Vor der Präsentation und Diskussion der Resultate werden in diesem Abschnitt die eingesetzten Methoden detailliert erläutert.

### 3.1. Zellkultur und Zellpräparation

Zentraler Bestandteil dieser Studie war die Charakterisierung von Zellmembranen hinsichtlich derer Membraneigenschaften. Die verwendeten zellulären Proben wurden durch eigene Zellkulturen bereitgestellt. Zur Analyse der Lipidordnung war die Färbung mit verschiedenen polaritätssensitiven Farbstoffen sowie die Manipulation der Membraneigenschaften durch unterschiedliche Zellpräparation wie Cholesterolreduktion oder Adaptation erforderlich.

#### 3.1.1. Zellkultur

Die Vermessung biologischer Membranen erfolgte sowohl an Gebärmutterhalskrebs-Zellen ATCC® CCL-2™ (im Weiteren HeLa-Zellen genannt) als auch an Neuroblastom-Zellen ATCC® CRL-2754™ (im Weiteren B35-Zellen genannt). Beide Zelllinien wurden in 25 cm<sup>2</sup> Nunc™ Zellkulturflaschen (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) bei  $T = 37\text{ °C}$  in Wasserdampf-saturierter Atmosphäre und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Als Kulturmedium dienten für HeLa-Zellen DMEM und für B35-Zellen DMEM mit hohem Glucose-Anteil (Bio&SELL GmbH, Nürnberg, Deutschland). Beide Kulturmedien wurden zu 10% mit fetalem Kälberserum und zu einem Prozent mit Penicillin/Streptomycin versetzt (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland).

#### 3.1.2. Membranfärbung mit Laurdan

Zur Phasenzustandsbestimmung wurde 1 mg Laurdan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in einem Volumenverhältnis von 1:100 zum Kulturmedium hinzugefügt. Die jeweiligen Konzentrationen von Laurdan und DMSO betragen damit im Zellmedium 28  $\mu\text{M}$  (Laurdan) und 141 mM (DMSO). Die jeweilige Zelllinie wurde für zwei Stunden bei  $T = 37\text{ °C}$  in der Farbstofflösung inkubiert und anschließend nach Entfernen des Kulturmediums mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-Puffer) (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) gespült, um Farbstoffreste zu entfernen. Zur mikroskopischen Auswertung adhärenter Zellen wurde die Kulturflasche erneut mit PBS-Puffer befüllt. Um Phasenzustandsmessungen an Zellsuspensionen durchzuführen, folgte dagegen die Ablösung der Zellen durch Zugabe von 1ml einer 0,05% Trypsin/EDTA-Lösung und darauffolgender 5-minütiger Inkubation.

### 3.1.3. Membranfärbung mit den Farbstoffen Pro12A und NR4A

Wie Laurdan wurden auch die Farbstoffe Pro12A (Centre national de la recherche scientifique, Nanochemistry and Bioimaging group of Dr. Andrey Klymchenko, Straßburg, Frankreich) und NR4A (Cytoskeleton Inc., CO, USA) in DMSO gelöst. Die jeweiligen Konzentrationen betragen 25  $\mu\text{M}$  (Pro12A), 20  $\mu\text{M}$  (NR4A) und 2,8 mM (Laurdan). Die Zellfärbung mit Pro12A und NR4A erfolgte durch Zugabe der jeweiligen DMSO-Lösung im Volumenverhältnis von 1:50 zu suspendierten Zellen direkt vor der Messung. Es war keine Einwirkzeit wie bei Laurdan notwendig. Die finalen Farbstoffkonzentrationen betragen 0,25  $\mu\text{M}$  (Pro12A) und 0,20  $\mu\text{M}$  (NR4A).

Beim Vergleich von Pro12A und NR4A zu Laurdan in Kapitel 4.6.2 wurden adhärente Zellen für zwei Stunden abweichend von den Messungen in den anderen Kapiteln durch Zugabe von Laurdan im Volumenverhältnis von 1:50 gefärbt. Die finale Farbstoffkonzentration lag damit bei 56  $\mu\text{M}$ .

Die finale DMSO Konzentration beim Vergleich von Pro12A, NR4A und Laurdan in Kapitel 4.6.2 betrug für alle Farbstoffe 282 mM (22 mg/l).

### 3.1.4. Reduktion des zellulären Membrancholesterols

Die Reduktion des Membrancholesterolgehalts erfolgte durch Zugabe von 10 mM Methyl-beta-Cyclodextrin (M $\beta$ CD) gelöst in PBS-Puffer. Die Lösung wurde direkt nach der Anfärbung mit Laurdan zu den bereits trypsinisierten Zellen im Volumenverhältnis 1:1 hinzugefügt und für eine Stunde bei  $T = 37\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert (finale M $\beta$ CD-Konzentration: 5 mM). Anschließend wurde die M $\beta$ CD-Lösung nach 3-minütiger Zentrifugation bei 300 G entfernt und für die spektrale Analyse durch PBS-Puffer ersetzt.

### 3.1.5. B35-Neuroblastom-Differenzierung

Die Differenzierung von B35-Zellen wurde durch Zugabe von Dibutyryl-Adenosin-3',5'-cycl.-Monophosphat-Natriumsalz (DcAMP) zum Kulturmedium induziert (finale DcAMP-Konzentration: 2 mM). Nach 24-stündiger Inkubation bei  $T = 37\text{ }^\circ\text{C}$  und deutlicher morphologischer Veränderungen in Form von ausgeprägtem Neuriten-Wachstum folgte das bereits beschriebene Laurdan-Färbungsprotokoll.

### 3.1.6. Adaptation an sub-physiologische Temperaturen

Zur Adaption von HeLa-Zellen an sub-physiologische Wachstumstemperaturen wurde die Inkubator-Temperatur sukzessive in Schritten von einem Kelvin pro Woche auf  $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$  reduziert. Die Proliferationsrate sank dabei anfänglich auf eine Teilung pro Monat und steigerte sich im Laufe von etwa drei Monaten auf eine Teilung pro Woche.

### 3.1.7. Lipidextraktion und Synthese von Vesikeln aus zellulären Lipiden

Die Extraktion der Membranlipide wurde nach dem Verfahren von Folch et al. vollzogen [37]: Nach Trypsinierung von etwa 2 Mio. Zellen und anschließender Zentrifugation bei 300 G für drei Minuten wurde der Überstand entfernt und das Präzipitat in ein Glasfläschchen mit 2 ml einer Chloroform/Methanol-Mischung (Volumenverhältnis 2:1) transferiert. Die Zell-Lyse erfolgte durch eine Ultraschallbehandlung bei  $T = 70\text{ °C}$ . Nach Zugabe von 0,4 ml Reinstwasser und Vermischung mittels Rüttelplatte wurde durch Zentrifugation bei 100 G für 15 Minuten eine Entmischung des Systems in zwei Phasen induziert: Während die obere Phase hauptsächlich wasserlösliche Bestandteile wie Proteine enthielt, waren in der unteren Chloroform-haltigen Phase der Großteil der Zelllipide gelöst.

Die Chloroform-Phase wurde mittels Spritzenkanüle entnommen und nach Zugabe von Laurdan unter Stickstoffstrom in einem Glasfläschchen eingetrocknet. Nach 60-minütiger Vakuumexposition zur Reduktion des Restchloroformgehalts erfolgte die Hydrierung der Lipide in 1 ml PBS-Puffer. Die Bildung von multilamellaren Vesikeln wurde durch Ultraschallbehandlung bei  $T = 70\text{ °C}$  für 30 Minuten induziert. Während die Laurdan-Konzentration in der Vesikelsuspension  $10\text{ }\mu\text{M}$  betrug, muss der Lipidanteil geschätzt werden: Delgado et al. bestimmten einen Lipidgehalt von 13 % bei embryonischen Maus-Fibroblasten, wobei die Masse einer Zelle ca. 500 pg betrug [38]. Unter Annahme ähnlicher Verhältnisse für HeLa-Zellen kann die Lipidmasse auf etwa 130 pg pro Probe geschätzt werden. Mit einem geschätzten mittleren Molekulargewicht von 500 g/mol betrug die Lipidkonzentration demnach in etwa  $260\text{ }\mu\text{M}$ .

Das vorgestellte Verfahren wurde ebenfalls unter Ausschluss von Sauerstoff durch Verwendung entgaster Lösemittel und einer Glovebox mit Stickstoffatmosphäre durchgeführt, um die Auswirkungen der Peroxidierung von Lipiden, wie sie in der Literatur diskutiert werden, zu verringern [39,40]. Es konnte jedoch kein Unterschied zu Messungen mit Sauerstoffexposition festgestellt werden.

### 3.1.8. Rote Blutkörperchen

Neben den genannten Zelllinien HeLa und B35 standen auch rote Blutkörperchen im Fokus der Phasenzustandsuntersuchung biologischer Membranen. Eine direkte Messung der Lipidordnung nach Entnahme war jedoch nicht möglich, da das Absorptionsspektrum von Hämoglobin mit dem Emissionsspektrum von Laurdan interferiert. Um den intrazellulären Hämoglobingehalt zu reduzieren, erfolgte zunächst eine Behandlung, die das Entfernen des Zellinneren durch osmotisches Schwellen beinhaltete. Die daraus resultierenden leeren Zellen werden im Englischen auch „Ghosts“ genannt.

Die Präparation der roten Blutkörperchen orientierte sich am Protokoll von Himbert et al. [41]: Zunächst wurden  $300\text{ }\mu\text{l}$  venösen Blutes (zur Verfügung gestellt durch das Universitätsklinikum Augsburg) durch Zugabe von 1,7 ml PBS-Puffer verdünnt und für 3 min bei 300 G zentrifugiert. Durch Entfernen des Überstands und erneuter Verdünnung mit PBS-Puffer mit anschließender Zentrifugierung wurden die Erythrozyten sukzessive aufgereinigt. Nach dreimaliger Wiederholung und erneutem Entfernen des Überstands folgte die Zugabe eines hypotonischen Puffers (1,6 ml PBS-Puffer verdünnt mit 48,4 ml Reinstwasser, durch Zugabe von Natriumhydroxid eingestellt auf pH 8), um das osmotische Schwellen und Bersten der Zellen zu induzieren. Um das erneute Verschließen der Zellmembranen zu verlangsamen und damit die Ausdiffusion der intrazellulären Bestandteile zu begünstigen, wurde die Prozedur durch Eiskühlung nahe einer Temperatur von  $T = 0\text{ °C}$  vollzogen.

Nach 30 Minuten folgte die Separation der Zellmembranen von der umgebenden Pufferlösung durch 30-minütige Zentrifugation bei 18.000 G und  $T = 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Anschließend wurde der Puffer entfernt und das Präzipitat erneut mit hypotonischem Puffer verdünnt. Das Resultat nach viermaliger Wiederholung war eine farblose Suspension mit stark reduziertem Hämoglobingehalt.

Die so präparierten Erythrozyten-Membranen wurden durch Zugabe von Laurdan/DMSO-Lösung (1 mg/ml) im Volumenverhältnis 1:100 für 2 Stunden bei  $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefärbt. Zuletzt folgte die Reduktion des ungebundenen Laurdans durch erneute Zentrifugation bei 18.000 G für 15 min und Entfernen des Überstands. Zur Vermessung wurden die Membranen in Pufferlösungen mit pH 5, 6 oder 7 resuspendiert.

## 3.2. Präparation synthetischer Lipidmembranen

Abhängig von den Anforderungen des jeweiligen Experiments wurden entweder multilamellare Vesikel, welche sich durch ihre unkomplizierte Synthese auszeichnen, oder unilamellare Riesenvesikel verwendet, die aufgrund ihrer ähnlichen Größe gerne als synthetische Modellzellen verwendet werden.

### 3.2.1. Synthese multilamellarer Vesikel

Die Synthese multilamellarer Vesikel beginnt mit der Trocknung in Glasfläschchen von in Chloroform gelösten Lipiden unter Stickstoffstrom und darauffolgender 30-minütiger Vakuumexposition. Anschließend folgt die Hydrierung mit hochreinem Wasser. Für kalorimetrische Messungen oder zur optischen Analyse mittels Laurdan wurde eine Lipidkonzentration von 1 mM verwendet. Für die optische Analyse mit Pro12A oder NR4A betrug die Konzentration 20 mM.

Für die optischen Phasenzustandsmessungen in Kapitel 4.1.1 wurde bereits bei der Synthese der Vesikel Laurdan in einem Verhältnis 1:100 zu den in Chloroform gelösten Lipiden gemischt. Die Laurdan Konzentration betrug daher nach Hydrierung  $10\text{ }\mu\text{M}$ .

Im Rahmen der vergleichenden Phasenzustandsmessungen mittels der Farbstoffe Laurdan, Pro12A und NR4A in Kapitel 4.6.1 wurde der jeweilige Farbstoff in einer Konzentration von  $20\text{ }\mu\text{M}$  in DMSO gelöst und nach der Vesikelsynthese zur Suspension im Volumenverhältnis 1:50 hinzugemischt, sodass die finale Konzentration aller Farbstoffe  $0,4\text{ }\mu\text{M}$  betrug. Die DMSO-Konzentration belief sich jeweils auf 282 mM (22 mg/l).

### 3.2.2. Synthese unilamellarer Riesenvesikel

Unilamellare Riesenvesikeln wurden durch Elektroformation hergestellt [42]. Dafür wurden die jeweiligen in Chloroform gelösten Lipide auf Fluorzinnoxid beschichteten Glasplättchen im Vakuum für 60 Minuten getrocknet. Anschließend wurde mithilfe zweier so präparierter Glasplättchen und einem Teflon-Distanzhalter eine Kammer geformt, in welche eine wässrige Saccharose-Lösung (100 mM) gefüllt wurde. Durch Anlegen einer Rechteckspannung der Frequenz 10 Hz wurde ein elektrisches Feld von  $0,6\text{ V/mm}$  generiert, welches nach 15 Minuten auf  $2,4\text{ V/mm}$  für zwei Stunden erhöht wurde. Während

dieser Prozedur wurde die Temperatur durch ein Wärmebad auf mindestens 15 K oberhalb der Schmelztemperatur des jeweiligen Lipids gehalten.

Für die Detektion der Zellmembranen bei der Permeabilitätsmessung in Kapitel 4.5 wurde den in Chloroform gelösten Lipiden der Farbstoff Texas Red™ 1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phospho-ethanolamin, Triethylammonium Salz (Texas Red) zugemischt (1 : 100, Farbstoff : Lipid). Zur Messung der Permeabilität wurde der Saccharose-Lösung zusätzlich 5 µM Fluoresceinisothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran) mit einem Molekulargewicht von 10.000 g/mol zugefügt. Vor der Permeabilitätsmessung wurde extravasikuläres FITC-Dextran zunächst durch Zugabe einer äquimolaren Glucose Lösung 20-fach verdünnt und dann bei 100 G für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 5 % des Gesamtvolumens durch frische Glucose Lösung ersetzt und nach Resuspendieren mittels eines Rüttlers erneut zentrifugiert. Der Gehalt an extravasikulärem FITC-Dextran wurde so durch dreimalige Wiederholung etwa 8000-fach reduziert.

Im Rahmen der Analyse der Lipidordnung unter Scherfluss in Kapitel 4.5.2 wurde zu den in Chloroform gelösten Lipiden Laurdan hinzugefügt (1 : 7, Farbstoff : Lipid) und keine FITC-Dextran Füllung verwendet.

### 3.3. Dynamische Differenzkalorimetrie

Als orthogonale Methode zur Phasenzustandsmessung an Vesikeln mittels Fluoreszenzspektroskopie wurde die Dynamische Differenzkalorimetrie verwendet, welche die Wärmekapazität einer Probe als Funktion der Temperatur misst. Dabei werden die Wärmeströme beim Erwärmen oder Kühlen  $dT/dt$  in eine Kammer mit der Probe  $dQ_{\text{Probe}}/dt$  und in eine Referenzkammer  $dQ_{\text{Referenz}}/dt$  gemessen, welche notwendig sind, um beide Kammern auf der gleichen Temperatur zu halten  $T_{\text{Ref}} = T_{\text{Probe}}$  [43]. Das Messsignal ist dabei die Differenz beider Wärmeströme, welche im Fall von in Wasser suspendierten Vesikeln als Probe und Wasser als Referenz den Wärmestrom zu bzw. von den Vesikeln darstellt  $d(Q_{\text{Probe}} - Q_{\text{Referenz}})/dt = dQ_{\text{Vesikel}}/dt$ . Die räumliche Nähe der Proben (siehe Abbildung 10) bewirkt, dass sich Störeinflüsse auf beide Kammern gleich auswirken und im Differenzsignal nicht gemessen werden. Beide Kammern sind während der Messung dem gleichen konstanten Druck  $p = \text{const.}$  ausgesetzt, sodass mit der Stoffmenge  $n$  die isobare Überschuss-Wärmekapazität  $c_p$ , im Folgenden nur als Wärmekapazität  $c_p$  bezeichnet, bestimmt werden kann:

$$c_{p,\text{Vesikel}} = \frac{1}{n} \left( \frac{dQ_{\text{Vesikel}}/dt}{dT/dt} \right)_p = \frac{1}{n} \left( \frac{dQ_{\text{Vesikel}}}{dT} \right)_p.$$

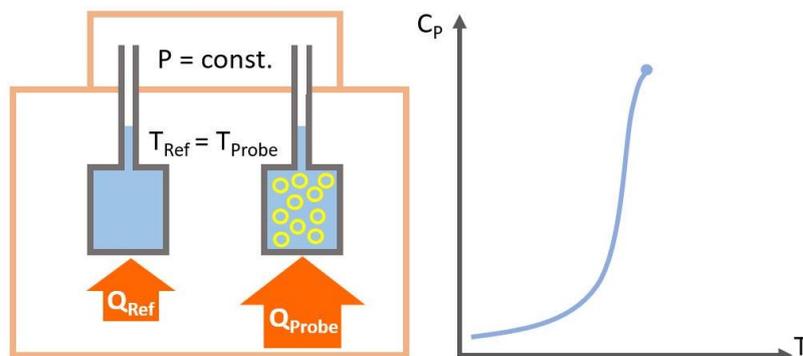


Abbildung 10 Schematischer Aufbau eines Geräts zur Messung der Wärmekapazität als Funktion der Temperatur mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie.

### 3.4. Fluoreszenzspektroskopie

Zur Messung der Lipidordnung wurde die Intensität des Emissionslichts des Fluoreszenzfarbstoffs Laurdan mithilfe eines Spektrometers aufgelöst nach der Wellenlänge analysiert. Der dafür verwendete Versuchsaufbau ist in Abbildung 11 schematisch dargestellt. Laurdan wurde in den Versuchsaufbauten, welche in Kapitel 3.4.1 und 3.4.2 beschrieben sind, mithilfe einer UV-LED der Wellenlänge  $\lambda = 360$  nm angeregt, wobei Licht abseits der Anregungswellenlänge mittels eines UV-Bandpassfilters abgeschirmt wurde. Die Probe bestand aus suspendierten Zellen oder Vesikeln, welche abhängig vom Versuchsaufbau entweder statisch in einer Glaskapillare bzw. in einem Eppendorf-Gefäß oder dynamisch während des Strömens durch eine Kapillare charakterisiert werden konnten.

Das durch die jeweilige Probe emittierte Fluoreszenzlicht wurde nach Passieren eines UV-Sperrfilters über eine optische Faser zu einem Spektrometer (Ocean Optics, QEPro) geleitet. In einem solchen Gerät wird die spektrale Information von Licht über ein dispersives Element wie einem optischen Gitter räumlich aufgelöst und mittels eines ladungsgekoppelten Sensors als Detektor gemessen.

Messungen mittels des Farbstoffs Pro12A in Kapitel 4.6 wurden nach selbigem Prinzip gemessen. Zur Charakterisierung von NR4A wurde eine LED der Wellenlänge  $\lambda = 490$  nm mit entsprechend angepassten Bandpass- und Sperrfiltern verwendet.

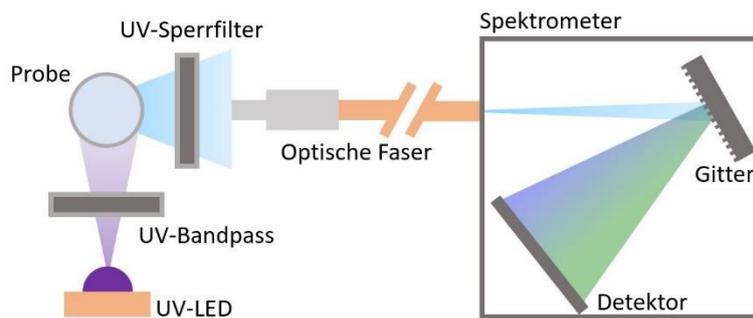


Abbildung 11 Schematische Darstellung der experimentellen Anordnung zur spektralen Analyse des Emissionsspektrums von Laurdan in suspendierten Vesikeln oder Zellen.

Das Resultat einer solchen spektralen Analyse ist die Fluoreszenzintensität von Laurdan als Funktion der Wellenlänge, welche in Abbildung 12 a) durch schwarze Datenpunkte dargestellt ist. Als Maß für die Lipidordnung wurde der Parameter GP bestimmt, welcher, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, mithilfe der Intensitäten bei  $\lambda = 440$  nm und  $\lambda = 490$  nm berechnet werden kann, wobei jeweils ein Bereich von  $\Delta\lambda = 40$  nm zentriert um die entsprechende Wellenlänge ausgewertet wurde.

Alternativ wurden die spektralen Daten mittels zweier Lognormal-Funktionen nach [44] approximiert und die jeweilige Funktionsfläche zur Berechnung von GP verwendet (siehe Abbildung 12 a)). Letztere Variante der spektralen Analyse bietet gegenüber der Intensitätsmessung eine höhere Sensitivität gegenüber Änderungen der Lipidordnung, was durch Gegenüberstellung beider Methodiken angewendet auf denselben Datensatz in Abbildung 12 b) erkennbar ist.

Beide Arten der Auswertung wurden automatisiert mithilfe eines Python-Skripts vollzogen, welches im Anhang 7.1 und unter <https://github.com/nicolasfaerberaux/PhD-Thesis> aufgeführt ist.

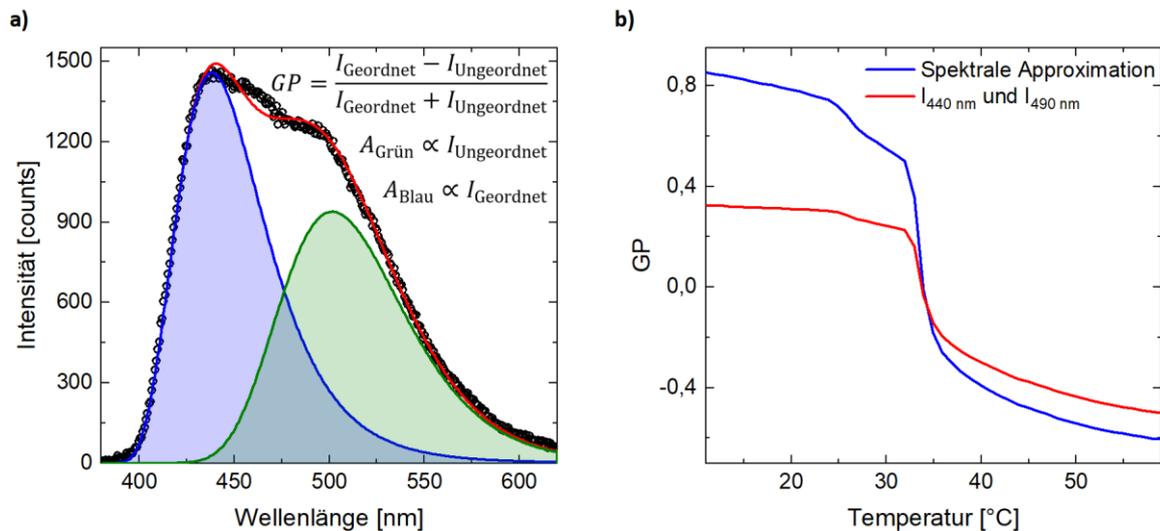


Abbildung 12 Auswertung der mittels Fluoreszenzspektroskopie erhobenen Daten **a)** Fluoreszenzintensität von Laurdan als Funktion der Wellenlänge (schwarze Kreise). Die Daten wurden mittels zweier Lognormal-Funktionen approximiert, welche in blau und grün dargestellt sind. Die Summe beider Funktionen ist als rote Linie abgebildet. **b)** GP berechnet durch spektrale Approximation wie in a) und durch Auswertung der Intensitäten bei  $\lambda = 440 \text{ nm}$  und  $\lambda = 490 \text{ nm}$  von 15:0 PC Vesikeln als Funktion der Temperatur.

### 3.4.1. Statische Phasenzustandsmessung

Die spektrale Analyse von suspendierten Zellen und Vesikeln bei verschiedenen Temperaturen erfolgte in einem eigens dafür gefertigten Versuchsaufbau, welcher schematisch in Abbildung 13 dargestellt ist. Die Probensuspension befindet sich in einer Glaskapillare, welche in Aluminium eingepasst ist. Im Zuge weiterer Entwicklungen des experimentellen Aufbaus wurde die Glaskapillare durch ein Eppendorf-Gefäß ersetzt. In der Probe befindet sich ein wasserdicht verkapselter PT100-Sensor zur *in-situ* Temperaturmessung. Aussparungen im Aluminium ermöglichen die Anregung mittels LED und die Detektion des Emissionslichts mittels einer optischen Faser. Zur besseren Übersicht sind die optischen Filter nicht abgebildet. Der Aluminiumblock kann mittels eines Peltier-Elements auf Temperaturen von etwa  $T = -40 \text{ °C}$  bis  $T = 95 \text{ °C}$  gekühlt bzw. geheizt werden. Die entsprechende Wärmemenge wurde über einen wassergekühlten Kupferblock auf der Rückseite des Peltier-Elements zu- bzw. abgeführt.

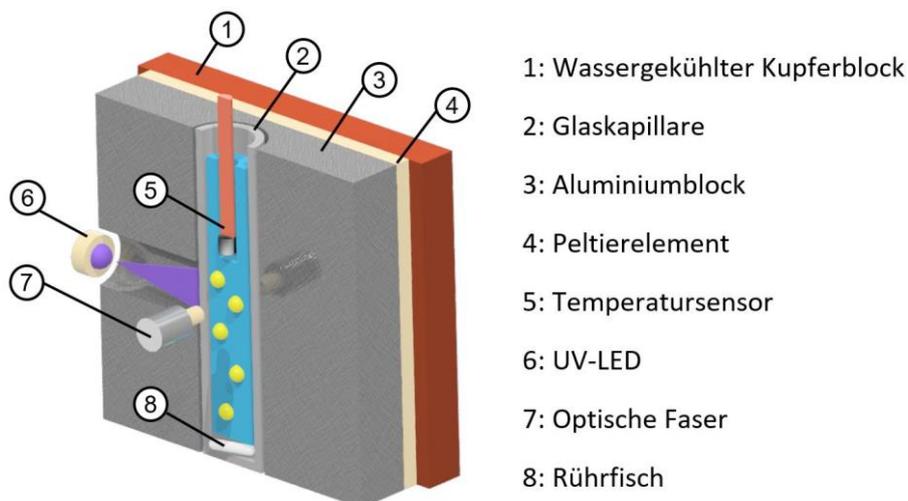


Abbildung 13 Vereinfachte Darstellung eines Versuchsaufbaus zur temperaturabhängigen spektralen Analyse.

Zur Prozesssteuerung, welche die Temperaturmessung, die Temperaturregelung mittels PID-Regler, die Ansteuerung der LED und die Kommunikation mit dem Spektrometer umfasste, wurde ein entsprechendes Programm auf Grundlage des Programmiersystems LabVIEW entwickelt.

### 3.4.2. Phasenzustandsmessung unter Scherflusseinwirkung

Um die Lipidordnung von unilamellaren Riesenvesikeln während der Exposition zu strömungsinduzierten Scherkräften messen zu können, wurde ein Versuchsaufbau entwickelt, welcher es erlaubt, strömende Suspensionen optisch bei variabler Temperatur zu charakterisieren (siehe Abbildung 14). Zentraler Bestandteil ist eine Glaskapillare, in welche über mikrofluidische Schläuche flüssige Proben gepumpt werden können. Die Kapillare ist in einem Aluminiumblock eingebettet, welcher zusätzlich eine UV-LED und einen Anschluss für eine optische Faser enthält. Alle Übergänge sind wasserdicht ausgeführt, sodass das Aluminium von einer Kühlflüssigkeit umströmt werden kann, welche die Temperatur der experimentellen Anordnung ermöglicht.

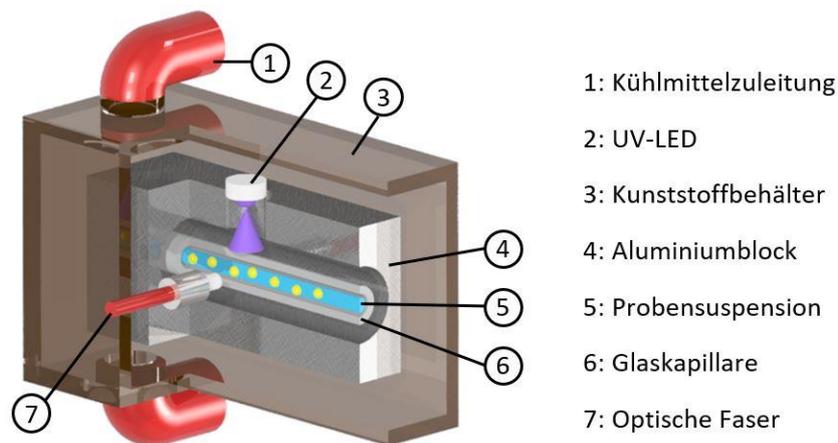
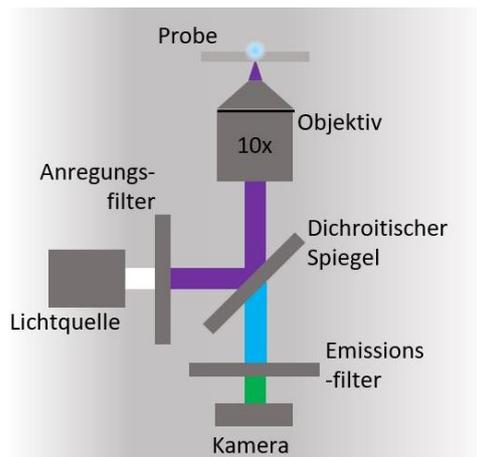


Abbildung 14 Vereinfachte Darstellung eines Versuchsaufbaus zur temperaturabhängigen spektralen Analyse strömender Vesikelsuspensionen

### 3.5. Fluoreszenzmikroskopie

Um die Lipidordnung biologischer Membranen räumlich aufzulösen, wurden adhärenente Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Das Prinzip der Messtechnik ist in Abbildung 15 dargestellt. Aus einer Weißlichtquelle wird mit einem geeigneten Bandpassfilter, der zur Anregung benötigte Wellenlängenbereich gefiltert. Dieses Licht wird durch einen dichroitischen Spiegel, welcher die Funktion eines optischen Langpassfilters erfüllt, zu einem Objektiv reflektiert. Dieses bündelt das Licht auf die fluoreszent markierte Probe, deren Emissionslicht von selbigem Objektiv erfasst wird und dann aufgrund seiner größeren Wellenlänge den dichroitischen Spiegel passieren kann. Nach Ausfilterung von gestreutem Anregungslicht über einen weiteren Bandpassfilter wird das Licht von einem ladungsgekoppelten Sensor erfasst. Der Anregungs- und Emissionsfilter sowie der dichroitische Spiegel sind zu einer Einheit zusammengefasst, welche automatisiert gewechselt werden kann. Eine Auflistung der verwendeten Filter und Fluorophore ist in Abbildung 15 gezeigt.



Verwendete Filterkombinationen:

Fluorophor	Anregung [nm]	Emission [nm]
Laurdan	357 ± 22 nm	440/490 ± 20 nm
Hoechst 33342	357 ± 22 nm	447 ± 30 nm
FITC	470 ± 11 nm	510 ± 21 nm
Texas Red / Rhodamin B	585 ± 15 nm	624 ± 10 nm

Abbildung 15 Vereinfachte Darstellung des Funktionsprinzips eines Epifluoreszenzmikroskops. Rechts sind die verwendeten Filterkombinationen für die jeweiligen untersuchten Fluorophore aufgelistet.

Die Verwendung verschiedener Filterkombinationen ermöglicht es, innerhalb einer Probe verschiedene Fluorophore sequentiell zu vermessen, was am Beispiel der Messung der Lipidordnung mittels Laurdan und der Bestimmung der Membranpermeabilität mittels Rhodamin B in Abbildung 16 dargestellt ist. Aufgrund des großen spektralen Unterschieds beider Fluorophore können deren Intensitäten durch Verwendung verschiedener Emissionsfilter unabhängig voneinander gemessen werden.

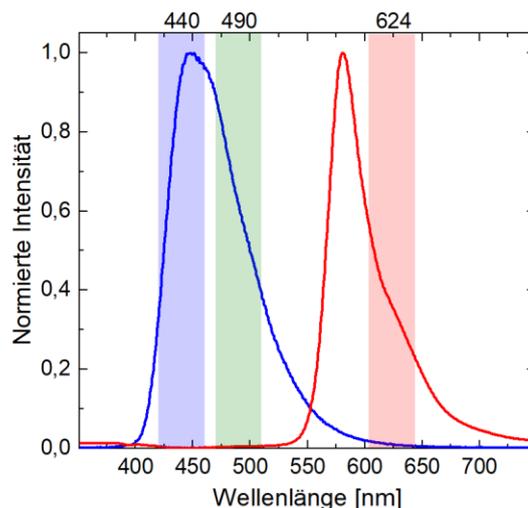


Abbildung 16 Emissionsspektren von Laurdan (blau) und Rhodamin B (rot). Zusätzlich sind die im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Emissionsfilterbänder abgebildet.

Durch Verwendung zweier Emissionsfilter mit zentralen Wellenlängen bei  $\lambda = 440$  nm und  $\lambda = 490$  nm und einer jeweiligen Breite von  $\Delta\lambda = 40$  nm wurde die phasenzustandsabhängige Emission von Laurdan analysiert, sodass für jeden Bildpixel ein GP-Wert berechnet werden konnte.

### 3.5.1. Phasenzustandsmessung an Zellen

Eine beispielhafte mikroskopische Aufnahme von Laurdan-gefärbten HeLa Zellen mittels der beschriebenen  $\lambda = 440/490$  nm Filterkombination ist in Abbildung 17 a) und b) dargestellt. Vor der weiteren Prozessierung müssen die Aufnahmen um die Hintergrundintensität korrigiert werden. Diese wurde innerhalb von zellfreien Flächen bestimmt und der entsprechende Wert von allen Pixeln subtrahiert. Mithilfe der so bearbeiteten Bilder können dann pixelweise GP-Werte berechnet werden, welche

farblich kodiert in Abbildung 17 c) dargestellt sind. Rote Pixel entsprechen dabei hohen GP-Werten, blaue Pixel indizieren niedrige Werte.

Die Zuordnung einzelner Pixel zu einer Zelle, die sogenannte Bildsegmentierung, erfolgte unter Zuhilfenahme des Python Pakets *cellpose* [45]. Es beinhaltet ein neuronales Netz, welches bereits auf einer Vielzahl verschiedener mikroskopischer Aufnahmen von Zellmembranen trainiert ist und es ermöglicht, einzelne Zellen voneinander und vom Hintergrund zu unterscheiden (siehe Abbildung 17 d)). Für den interzellulären Vergleich der Lipidordnung (siehe Kapitel 4.2.3) aber auch im Rahmen der phasen-zustandsabhängigen Transportmessungen (siehe Kapitel 4.3 und 4.4) wurde für jede Zelle ein mittlerer Zell-GP-Wert berechnet, indem der Mittelwert aller durch Bildsegmentierung als zusammengehörig identifizierten Pixel berechnet wurde.

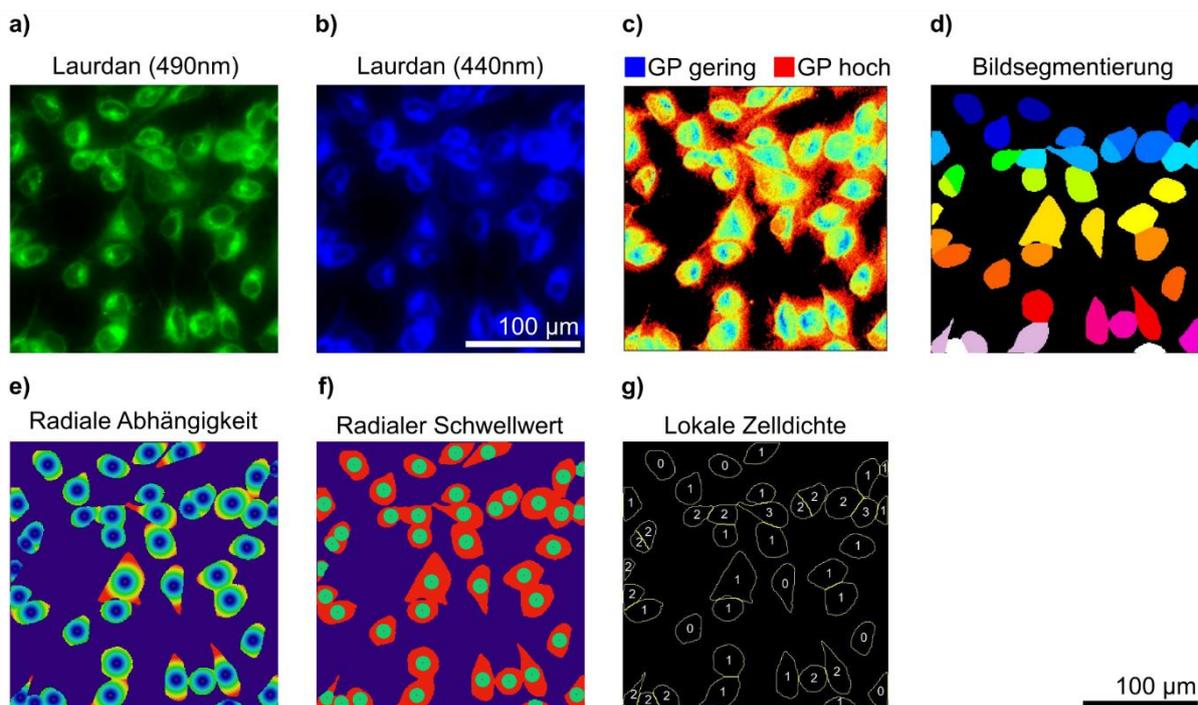


Abbildung 17 Prozessierung fluoreszenzmikroskopischer Bilddaten zur Analyse der Lipidordnung einzelner Zellen. **a)** und **b)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mithilfe der  $\lambda = 440/490$  nm Emissionsfilterkombination zur Messung der Lipidordnung an Laurdan-gefärbten HeLa Zellmembranen. **c)** GP-Bild berechnet aus den Aufnahmen in **a)** und **b)**. Rote Pixel repräsentieren einen hohen GP-Wert, blaue Pixel einen geringen. **d)** Zuordnung einzelner Pixel zum Hintergrund (schwarz) oder zu unterschiedlichen Zellmembranen (farbig) **e)** Farbliche Codierung des Abstands einzelner Zellpixel zum zugehörigen Zellzentrum, welches als Schwerpunkt aller Zellpixel definiert wurde. Rote Pixel sind weit vom Mittelpunkt entfernt, blaue liegen nahe am Zentrum. **f)** Geänderte Darstellung der Bilddaten aus **e)**. Pixel, deren Abstand kleiner als 15 Pixel zum Zellzentrum ist, sind grün dargestellt. Alle anderen Zellpixel sind rot. **g)** Resultat der Analyse der lokalen Zelldichte. Die Zahl im jeweiligen Zellzentrum gibt die Anzahl benachbarter Zellen an. Als benachbart gelten zwei Zellen deren Zentren nicht weiter als  $31 \mu\text{m}$  voneinander entfernt sind.

Mithilfe der segmentierten Bilddaten konnte die Lipidordnung auch innerhalb einzelner Zellmembranen analysiert werden (siehe Kapitel 4.2.4). Dazu wurde zunächst der Zellmittelpunkt als Schwerpunkt aller Zellpixel berechnet und anschließend für jeden Pixel die Distanz zum Zellzentrum ermittelt, welche farbcodiert in Abbildung 17 e) dargestellt ist. Blaue Pixel sind nahe am Zellmittelpunkt positioniert, rote liegen dagegen am Rand der Zelle. Für die radiale Auswertung der Lipidordnung in Abbildung 28 und Abbildung 30 wurden die GP-Werte aller Zellpixel mit gleicher Distanz vom jeweiligen Zellzentrum zu einem Mittelwert zusammengefasst.

Durch Festlegung eines radialen Schwellwerts (siehe Abbildung 17 f)) kann innerhalb einzelner Zellen zwischen verschiedenen Membrankompartimenten differenziert werden. Dies ermöglicht

beispielsweise in Abbildung 35 c) zu überprüfen, ob der Stofftransport von Rhodamin stärker mit der Lipidordnung der „äußeren“ oder der „inneren“ Membran korreliert.

Aus den Bilddaten kann außerdem durch Berechnung des Abstands der Zellzentren ein Maß für die lokale Zelldichte abgeleitet werden. Liegen zwei Zellen näher beieinander als ein zu definierender Schwellwert, können diese als benachbart klassifiziert werden. Die Zahl der nächsten Nachbarn jeder Zelle ist anhand eines beispielhaften Bildausschnitts in Abbildung 17 g) dargestellt. In Abhängigkeit der Zahl nächster Nachbarn wurden in Kapitel 4.3.4 Zell-GP-Werte zu Mittelwerten zusammengefasst, um den Zusammenhang zwischen der lokalen Zelldichte und der Lipidordnung zu untersuchen.

Die Bildauswertung wurde mittels des Programms *ImageJ* (National Institutes of Health, MD, USA) und der Python-Entwicklungsumgebung *Spyder* automatisiert durchgeführt. Zunächst wurden die Einzelbilder, welche mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen wurden, mithilfe des *ImageJ*-Plugins von Preibisch et al. zusammengesetzt (siehe Skript im Anhang 7.2) [46]. Anschließend wurde die in Abbildung 17 dargestellte Auswertung mithilfe des Python-Skripts im Anhang 7.3 vollzogen.

Zur Korrektur von Zellbewegungen zwischen einzelnen Aufnahmen bei der temperaturabhängigen Einzelzellanalyse in Kapitel 4.2 wurde das Skript im Anhang 7.4 (oder unter <https://github.com/nicolasfarberaux/PhD-Thesis>) verwendet, welches die Zellpositionen zwischen unterschiedlichen Aufnahmen vergleicht und im Falle einer geringeren Abweichung als ein zu definierender Schwellwert eine Verknüpfung zwischen den verschiedenen Bildern herstellt.

### 3.5.2. Transportmessung an Zellen

In Abhängigkeit der Lipidordnung gemessen mittels optischer Analyse von Laurdan wurde der poröse Membrantransport mit den Fluoreszenzfarbstoffen Rhodamin B und Hoechst 33342 gemessen. Der endozytotische Stofftransport wurde mithilfe fluoreszent markierter Kieselgel-Nanopartikel untersucht.

Zur Messung der phasenzustandsabhängigen Rhodamin B Aufnahme ins Zellinnere wurden zunächst adhärente HeLa Zellen wie in Kapitel 3.1.2 mit Laurdan gefärbt. 10 Minuten vor Ende der Laurdan-Färbung (also nach einer Stunde und 50 Minuten) wurde PBS-Puffer mit 2 mM Rhodamin B in einem Volumenverhältnis von 1:1 zum Kulturmedium hinzugegeben. Dieser Schritt wurde in einem temperierten Mikroskop Einsatz durchgeführt, sodass die Rhodamin B Exposition und die anschließende Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie bei den Temperaturen  $T = 10\text{ °C}$ ,  $22\text{ °C}$  und  $37\text{ °C}$  vollzogen werden konnte. Nach 10-minütigem Kontakt wurde das mit Laurdan und Rhodamin B versetzte PBS-Puffer/Zellmedium-Gemisch entfernt und Farbstoffreste durch mehrmaliges Spülen mit PBS-Puffer entfernt, um die extrazelluläre Fluoreszenzintensität zu verringern (siehe Abbildung 18 a)). Anschließend wurde mikroskopiert.

Als Alternative zur Membrantransport-Messung mit Rhodamin B wurde der Farbstoff Hoechst 33342 verwendet. Während das rote Emissionslicht von Rhodamin B nicht mit dem Emissionsspektrum von Laurdan überlappt, emittiert Hoechst 33342 ebenfalls im blauen Wellenlängenbereich. Eine simultane Messung von Membranordnung und Membrantransport ist daher nicht möglich, weshalb die fluoreszente Analyse der mit Laurdan gefärbten Membranen vor der Transportmessung durchgeführt wurde. Der Vorteil von Hoechst 33342 ist, dass der Farbstoff erst nach erfolgtem Transport ins Zellinnere und anschließender Interkalation in die DNA fluoresziert. Eine Spülprozedur zur Reduktion des Hintergrundsignals ist daher nicht notwendig und es können sogar Zeitreihen der Farbstoffaufnahme durch sequentielle Bildaufnahmen gemessen werden, wie in Abbildung 18 b) dargestellt ist. Zur Messung der

Aufnahme von Hoechst 33342 wurden zunächst  $16 \mu\text{M}$  Farbstoff in PBS-Puffer gelöst und anschließend in einem Volumenverhältnis von 1:1 zu bereits mit Laurdan gefärbten, adhären Zellen gegeben. Dieser Schritt wurde direkt am Mikroskop bei einer Temperatur von  $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$  vollzogen, um die Aufnahme-Kinetik von Anfang an mitverfolgen zu können.

Die Messung des endozytotischen Stofftransports mittels fluoreszent markierter Kieselgel-Nanopartikel erfolgte wie in Abbildung 18 a) skizziert analog zum Prozedere mit Rhodamin B. Nanopartikel mit einem Durchmesser von  $d = 80 \text{ nm}$  wurden in einer Konzentration von  $1 \text{ mg/ml}$  in PBS-Puffer suspendiert und bei  $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$  zu den vorher mittels Laurdan gefärbten HeLa-Zellen gemischt. Nach 10-minütigem Kontakt wurde die Menge an nicht aufgenommenen Partikeln durch mehrmaliges Spülen mit PBS-Puffer reduziert.

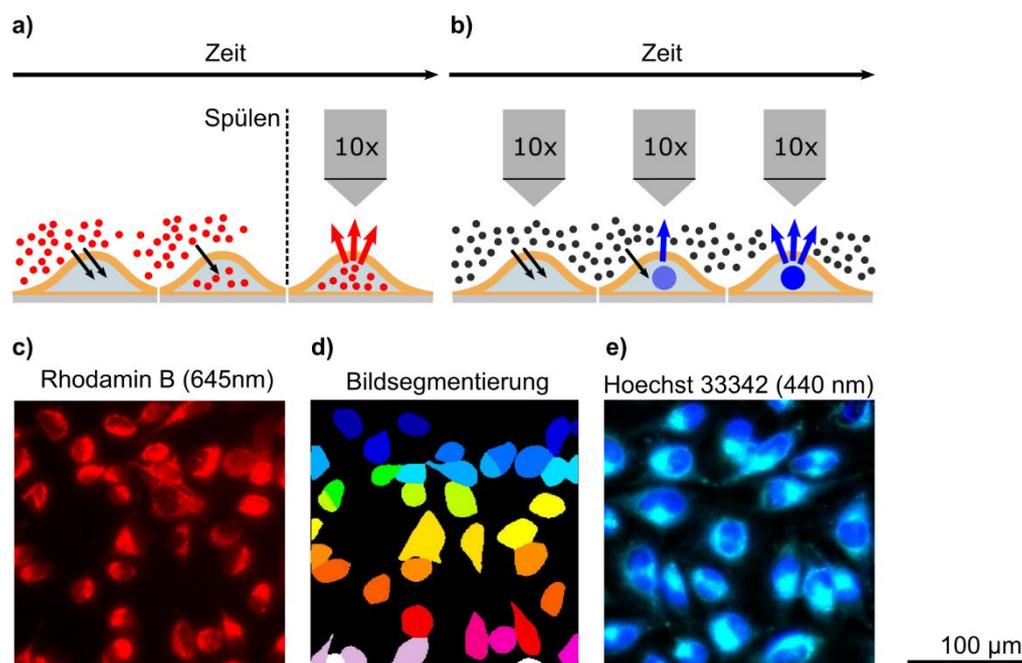


Abbildung 18 Vereinfachte Darstellung des experimentellen Ablaufs zur Messung des Stofftransports in Zellen. a) Schematische Abbildung der Messung des Transports von Rhodamin B oder fluoreszenter Nanopartikel ins Zellinnere. Während der Exposition zur jeweiligen Transportsonde findet die Aufnahme ins Zellinnere statt. Vor der fluoreszenzmikroskopischen Messung muss extrazellulärer Farbstoff bzw. Partikel durch Spülen entfernt werden. b) Schematische Abbildung der Messung des Transports von Hoechst 33342. Der Farbstoff fluoresziert erst nach Aufnahme ins Zellinnere, sodass eine zeitaufgelöste Messung der Intensitätszunahme möglich ist. c) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellen nach Rhodamin B Exposition d) Segmentiertes Bild zur Bestimmung der mittleren Farbstoffintensität pro Zelle. e) Überlagerung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Laurdan und Hoechst 33342.

Die Transportmessung mittels Rhodamin B und fluoreszenten Kieselgel-Nanopartikeln wurde simultan zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Lipidordnung mittels  $\lambda = 440/490 \text{ nm}$  Emissionsfiltern (siehe Abbildung 17 a) und b)) durch Aufnahme eines dritten Bildes mittels eines  $\lambda = 645 \text{ nm}$  Emissionsfilters (siehe Abbildung 18 a)) durchgeführt. Die Fluoreszenz von Hoechst 33342 wurde dagegen erst nach der Analyse der Lipidordnung auch mit den  $\lambda = 490 \text{ nm}$  Emissionsfiltern gemessen. Die Überlagerung der Laurdan- und der Hoechst 33342-Aufnahme ist in Abbildung 18 e) dargestellt.

Die Analyse der aufgenommenen Farbstoffe und Partikel erfolgte analog zur Auswertung der GP-Werte in Abbildung 17 c). Nach Segmentierung der Bilddaten (siehe Abbildung 18 b)) wurde für jede Zelle ein mittlerer Intensitätswert der jeweiligen Transportsonde berechnet, indem der Mittelwert aller zellulären Pixel gebildet wurde. Die Intensitäten von Hoechst 33342 wurden dabei durch die anfangs bestimmte Laurdan-Intensität korrigiert.

Die so bestimmte mittlere Stoffaufnahme einzelner Zellen wurde in Kapitel 4.3 und 4.4 als Funktion des mittleren GP-Werts analysiert. Die Auswertung der Bilddaten zur Messung des Stofftransports erfolgte automatisiert im selben Python-Skript, welches zur Auswertung der Lipidordnung verwendet wurde (siehe Anhang 7.3 oder <https://github.com/nicolasfaerberaux/PhD-Thesis>).

### 3.5.3. Permeabilitätsmessungen an Vesikeln nach Schereinwirkung

Zur Messung der Permeabilität von synthetischen Membranen unter Scherfluss wurden mit FITC-Dextran beladene unilamellare Riesenvesikel gemäß der Beschreibung in Kapitel 3.2.2 hergestellt. Nach der letzten Zentrifugierung zur Reduktion des extravasikulären FITC-Dextran-Gehalts und dem Entfernen des Überstands wurden die präzipitierten Vesikel in Saccharose-Lösung resuspendiert, um ein Sedimentieren während des Experiments zu vermeiden. Nach dem Transferieren der Vesikelsuspension in eine Spritze erfolgte der Einbau in eine Spitzenpumpe und anschließend die Verbindung mit einem Polyethylenschlauch mittels einer Kanüle. Der Schlauch mit einem Innendurchmesser von 380  $\mu\text{m}$  führte in eine mit Kühlflüssigkeit temperierte Kammer, welche schematisch in Abbildung 19 a) dargestellt ist. Abhängig von der verwendeten Flussrate (2 ml/h, 10 ml/h und 50 ml/h) ermöglichte die Verwendung verschiedener Schlauchlängen im temperierten Bereich (29 cm, 147 cm und 735 cm) eine ähnliche Expositionsdauer zu strömungsinduzierten Scherkräften.

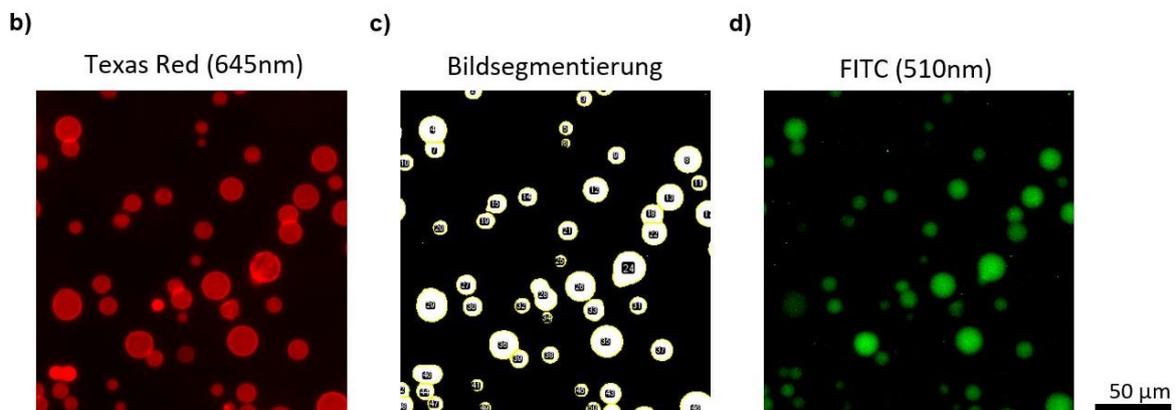
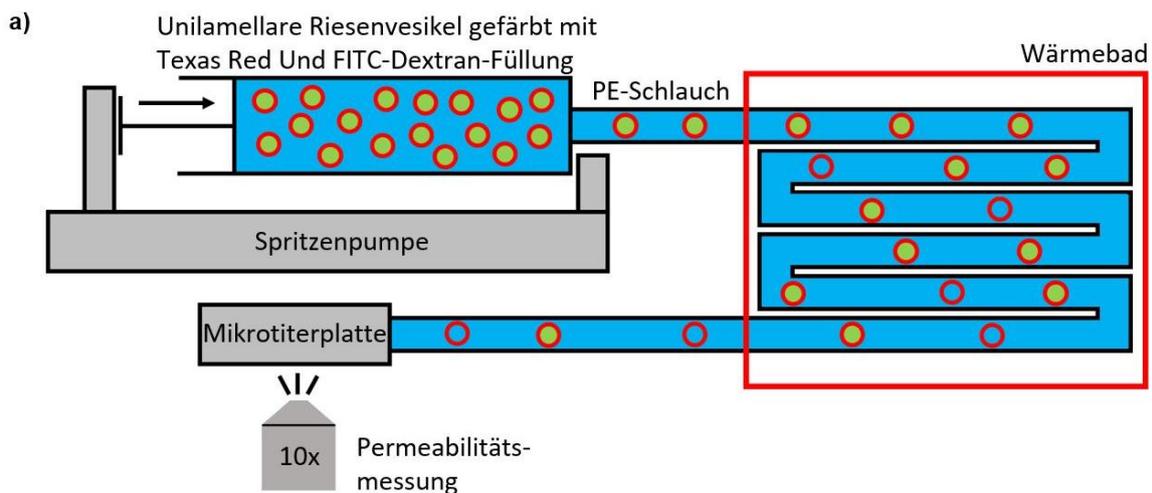


Abbildung 19 Messung der Permeabilität von unilamellaren Riesenvesikeln. **a)** Vereinfachte Darstellung der experimentellen Anordnung zur Messung der Permeabilität von unilamellaren Riesenvesikeln unter Scherfluss bei variierenden Temperaturen. **b)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Vesikelmembranen, welche mit Texas Red gefärbt wurde. **c)** Segmentierung des in **b)** gezeigten Bilds. Zur Unterscheidung zwischen Hintergrund- und Vesikelpixeln wurde ein Intensitätsschwellwert bestimmt. **d)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des intravesikulären FITC-Dextrangehalts der Vesikel aus **b)**.

Nach Durchlaufen der experimentellen Anordnung wurde die Vesikelsuspension in einer Mikrotiterplatte aufgefangen, im Verhältnis 1 : 1 mit äquimolarer Glucose-Lösung verdünnt und anschließend zur Sedimentierung im Kühlschrank bei  $T = 7\text{ °C}$  für zwei Stunden gelagert. Es folgte das Mikroskopieren in zwei verschiedenen Emissionsfiltern, um einerseits die mit Texas Red gefärbten Membranen zu lokalisieren, andererseits um an diesen Positionen die intravesikuläre FITC-Dextran Intensität als Maß für die Membranpermeabilität zu bestimmen (siehe Abbildung 19 b) und d)).

Die Bildprozessierung begann mit der Korrektur der Hintergrundintensität bedingt durch inhomogene Bildausleuchtung in beiden Kanälen unter Verwendung des *Rolling Ball* Algorithmus in ImageJ, welcher die Intensität jedes Pixels um den Mittelwert der Intensität der benachbarten Pixel in einem zu definierenden Radius (50 Pixel) reduziert. Anschließend erfolgte die Bildsegmentierung mittels Intensitätsschwellwert und die Separation von eng benachbarten Vesikeln mittels des *watershed* Algorithmus. Zuletzt wurden zusammengehörige Pixel mittels der Funktion *Analyze Particles* identifiziert (siehe Abbildung 19 c)), sodass durch Berechnung des Mittelwerts aller Vesikelpixel eine mittlere FITC-Dextran Intensität pro Vesikel ermittelt werden konnte.

Die beschriebenen Schritte der Bilddatenauswertung wurden automatisiert mittels eines ImageJ Skripts vollzogen, welches im Anhang 7.2 und unter <https://github.com/nicolasfaerberaux/PhD-Thesis> aufgeführt ist. Die Messung der Lipidordnung unter Scherfluss erfolgte mit unilamellaren Riesenvesikeln, welche mit Laurdan gefärbt wurden (siehe Kapitel 3.2.2) in einem Versuchsaufbau, welcher in Kapitel 3.4.2 beschrieben ist.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Rolle der Lipidordnung für zelluläre Funktionen aufgezeigt werden. Diese Ordnung ist eine dynamische Größe, welche sich abhängig vom Zustand der Lipidmembran sprunghaft ändern kann. Deswegen wurde zunächst der Phasenzustand zellulärer Membranen untersucht. Darauf aufbauend wurde dann die Zellfunktion, Membrantransport, in Abhängigkeit von der Lipidordnung unter verschiedenen Umwelteinflüssen analysiert. Die Diskussion der Ergebnisse gliedert sich in sechs Kapitel:

Zu Beginn der Studie wird die optische Messung der Lipidordnung mittels Fluoreszenzspektroskopie als Funktion der Temperatur zur Analyse von Phasenübergängen beschrieben. Die Methodik wird zunächst durch Vergleich mit kalorimetrischen Messungen an diversen Phospholipidvesikeln unterschiedlicher Komposition validiert. Durch die Analyse der temperaturabhängigen Lipidordnung von Zellsuspensionen wird deren Phasenübergangsverhalten bestimmt, wobei die gewonnenen Daten einen Mittelwert über eine Vielzahl von Zellmembranen darstellt.

Das darauffolgende Kapitel ist der Analyse der Lipidordnung einzelner Zellen gewidmet. Dafür wurde der Membranzustand mittels Fluoreszenzmikroskopie intrazellulär als Funktion der Temperatur vermessen. Im Rahmen einer einfachen thermodynamischen Betrachtung wird das Phasenübergangsverhalten einzelner Zellmembranen durch deren Enthalpie, Entropie und Schmelztemperatur beschrieben. Im Rahmen einer differenzierteren Auswertung werden die Lipidordnung und deren Temperaturabhängigkeit innerhalb einzelner Zellen diskutiert.

Die Relevanz der zuvor analysierten Lipidordnung für zelluläre Funktionen wird im dritten Ergebnisteil untersucht. Grundlage ist die mikroskopische Analyse des Phasenzustands und des porösen Transports von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen aus dem extrazellulären Raum in das Zellinnere auf Einzelzellniveau. Weiterhin wird die Korrelation der Größen Transport und Lipidordnung unter variierenden Umwelteinflüssen wie der lokalen Zelldichte analysiert. Die physiologische Relevanz der zuvor untersuchten Zusammenhänge wird dann im Rahmen der Wundheilung untersucht.

Anschließend steht die wechselseitige Beeinflussung des Membranzustands und des Endozytose-ähnlichen Transport von Kieselgel-Nanopartikeln im Fokus der Betrachtung. Dabei wird zunächst die Auswirkung der Nanopartikelexposition auf den Phasenübergang von Vesikel- und Zellsuspensionen mittels Fluoreszenzspektroskopie und im Falle von Vesikeln zusätzlich mittels Kalorimetrie analysiert. Danach wird die mittels Fluoreszenzmikroskopie vermessene Abhängigkeit der Nanopartikelaufnahme von der zellulären Lipidordnung diskutiert.

Der Stofftransport über eine Lipidmembran wird im fünften Kapitel unter Strömungseinfluss, wie er auch durch Blutfluss am Endothel auftritt, untersucht. In diesem Kontext wurde die Lipidordnung unilamellarer Riesenvesikel und die Diffusion eines fluoreszenten Zuckermoleküls über deren Membran hinweg unter dynamischen Bedingungen optisch analysiert. Auf Grundlage der gewonnenen Daten wird die Abhängigkeit der Membranpermeabilität und des Phasenzustands von der durch Strömung induzierten Schergeschwindigkeit diskutiert.

Zuletzt werden alternative Fluoreszenzfarbstoffe beschrieben, welche die gezielte optische Analyse der Lipidordnung einzelner Membranbestandteile ermöglichen.

In ihrer Gesamtheit erlauben die beschriebenen Ergebnisse, sowohl die Abhängigkeit der Lipidordnung von der zellulären Umgebung zu verstehen, als auch einzuschätzen, inwieweit zelluläre Funktionen durch dieselbe gesteuert werden können.

## 4.1. Optische Detektion von Phasenübergängen in Vesikel- und Zellsuspensionen

Um der Fragestellung nach der Abhängigkeit zellulärer Funktionen von der Lipidordnung der Membran zu begegnen, bedarf es einer zuverlässigen Analysemethode. Während der Zustand synthetischer Lipidmembranen mittels Kalorimetrie vermessen werden kann, ist dies bei Membranen eukaryotischer Zellen meist nicht möglich, weil sie ein komplexes System aus hunderten verschiedenen Lipiden, Proteinen sowie Cholesterol darstellen. Solche Mischungen zeichnen sich durch breite Phasenübergänge geringer Kooperativität aus, welche kalorimetrisch kaum erfasst werden können [24,25,47]. Im Gegensatz dazu können Bakterien kein Cholesterol bilden, weshalb Heimburg et al. Phasenübergänge in Membranen von *Escherichia Coli* mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie detektieren konnten [26,48].

Während die Messung des Wärmestroms im Rahmen der Kalorimetrie die Bestimmung des Phasenzustands erlaubt, aus welchem wiederum Rückschlüsse auf den Ordnungszustand erfolgen können, ist das Fluoreszenzsignal des polaritätssensitiven Farbstoffs Laurdan direkt von der Lipidordnung abhängig. Dies ermöglicht nicht nur die Detektion kleinster Phasenzustandsänderungen, sondern auch die Vermessung einzelner Zellen oder die Analyse der Lipidordnung unter dynamischen Bedingungen wie beispielsweise in einer strömenden Flüssigkeit.

Um die Zuverlässigkeit der optischen Methode zu prüfen, wurde der Phasenzustand verschiedener Lipidvesikel kalorimetrisch und mittels Laurdan vermessen (siehe 3.3 und 3.4.1). Der Vergleich beider Messungen wird im folgenden Absatz diskutiert. Der Großteil der Ergebnisse dieses Kapitels 4.1 entstammt der Publikation „Broad lipid phase transitions in mammalian cell membranes measured by Laurdan fluorescence spectroscopy“ von Nicolas Färber und Christoph Westerhausen (Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes, 2022) [49].

### 4.1.1. Kalorimetrische und optische Vermessung von Phasenübergängen in Vesikeln

Für die kalorimetrischen und optischen Phasenzustandsmessungen wurden multilamellare Vesikel aus den Lipiden 13:0 PC, 14:0 PC, 15:0 PC und DOPC sowie Cholesterol nach dem in den Methoden beschriebenen Verfahren unter Beimischung des Fluoreszenzfarbstoffs Laurdan hergestellt (siehe Kapitel 3.2.1). Die optische Analyse (siehe Kapitel 3.4) der Vesikelsuspensionen wurde im Gegensatz zur dynamischen Differenzkalorimetrie in einem eigens dafür gefertigten Versuchsaufbau durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.1).

Abbildung 20 a) zeigt die Wärmekapazität als Funktion der Temperatur verschiedener Lipidsysteme, deren scharfe Maxima die Schmelztemperatur der jeweiligen Lipidkomposition indiziert. Lediglich der Phasenübergang multilamellarer Vesikel bestehend aus DOPC konnte nicht mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie vermessen werden, da der Messbereich auf Temperaturen über  $T = 0\text{ °C}$  beschränkt ist. Der Literaturwert der Schmelztemperatur von DOPC-Vesikeln liegt in einem Bereich zwischen  $T_m = -21\text{ °C}$  und  $T_m = -16,5\text{ °C}$ . Die Generalisierte Polarisation (GP), bestimmt mittels spektroskopischer Analyse des membrangebundenen Farbstoffs Laurdan, ist in Abbildung 20 b) als Funktion der Temperatur aufgetragen. Am Phasenübergang der jeweiligen Lipidvesikel ist ein steiler Abfall des GP-Werts zu sehen. Der Messbereich der spektroskopischen Analyse erstreckt sich im Gegensatz zur kalorimetrischen Messung bis zu  $T = -40\text{ °C}$ .

Die Ableitung von GP nach der Temperatur, dargestellt in Abbildung 20 c), weist wie die Wärmekapazität am Phasenübergang ein scharfes Maximum auf. Die auf diese Weise optisch identifizierten

Schmelztemperaturen stimmen mit den kalorimetrisch gemessenen mit Abweichungen von weniger als einem Kelvin überein. Auch die relativen Höhen der Maxima am jeweiligen Phasenübergang, welche die Kooperativität des Übergangs widerspiegeln, konnten optisch reproduziert werden. Der GP-Wert der Vesikel bestehend aus DOPC, welcher in Abbildung 20 d) als Funktion der Temperatur gezeigt ist, weist ebenfalls einen steilen Abfall auf. Damit einhergehend zeigt die Ableitung ein Maximum bei  $T = -16,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , welches in Übereinstimmung mit dem Literaturwertebereich ebenfalls einen Phasenübergang indiziert.

Der Vergleich der optischen und kalorimetrischen Messergebnisse zeigt, dass sowohl die Schmelztemperatur als auch die Kooperativität des Phasenübergangs von Lipidsystemen mittels spektroskopischer Analyse des Fluoreszenzfarbstoffs Laurdan zuverlässig vermessen werden kann. Dies ist sogar in gefrorenen Suspensionen möglich, wie die Messung an DOPC-Vesikeln belegt. Letztere Eigenschaft ist insbesondere für die Vermessung von Zellmembranen wichtig, deren Phasenübergang sich bis unterhalb von  $T = -30\text{ }^{\circ}\text{C}$  erstrecken kann, was Gegenstand der nachfolgenden Kapitel sein wird.

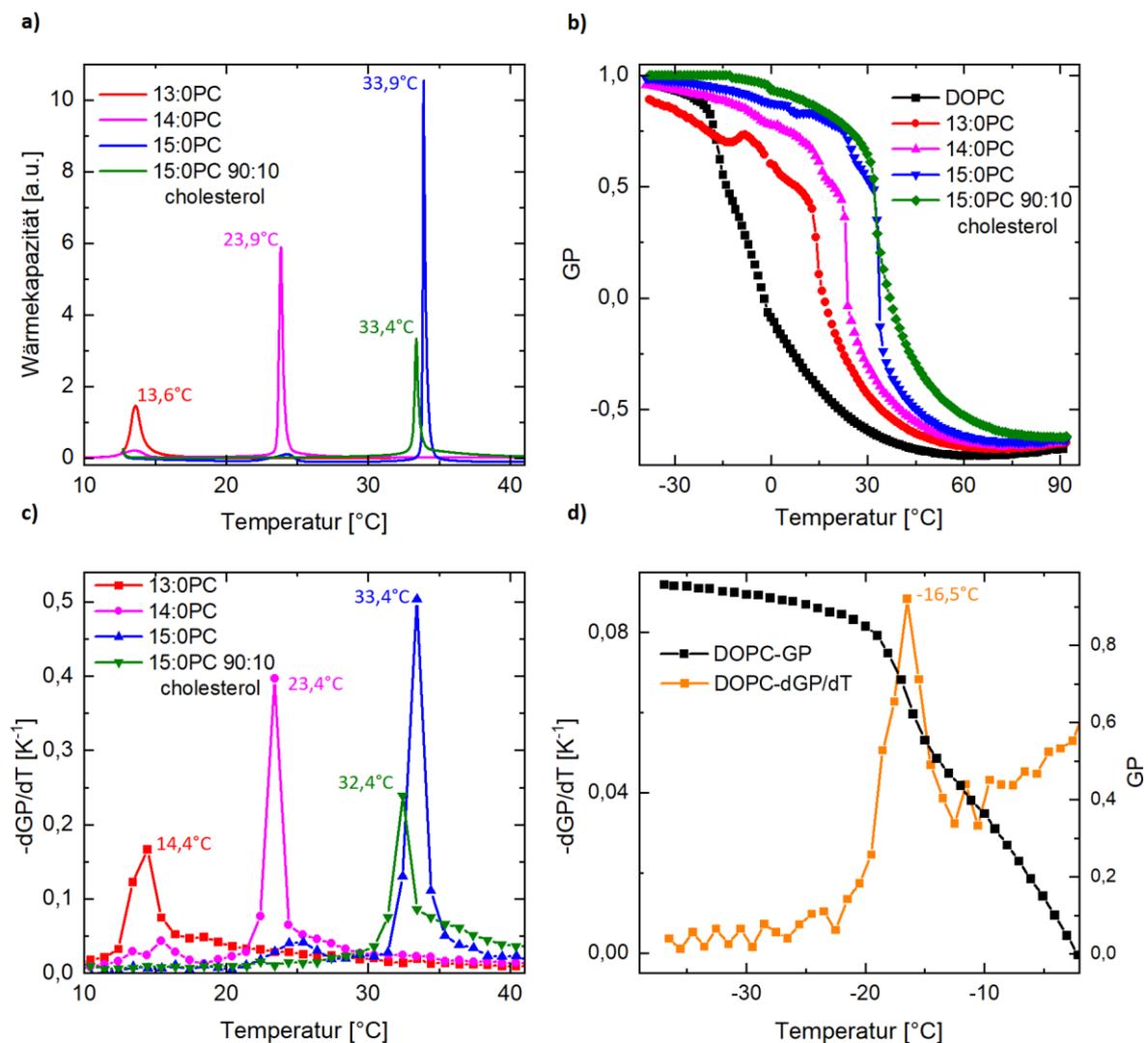


Abbildung 20 Vergleich kalorimetrischer und optischer Phasenzustandsmessungen an Vesikelsuspensionen [49]. a) Die kalorimetrisch bestimmte Wärmekapazität als Funktion der Temperatur von vier verschiedenen Lipidsystemen. Das scharfe Maximum indiziert den Phasenübergang der Vesikelmembranen. b) Die optisch gemessene Generalisierte Polarisation (GP) als Funktion der Temperatur. Ein steiler Abfall des GP-Werts indiziert die Phasenübergänge der Lipidvesikel. c) Analog zur kalorimetrischen Messung weist die Ableitung von GP nach der Temperatur bei der Schmelztemperatur ein Maximum auf. d) GP und dessen Ableitung als Funktion der Temperatur. Laurdan ist selbst in einer gefrorenen Vesikelsuspension sensitiv gegenüber Änderungen der Lipidordnung.

#### 4.1.2. Messtechnische Einflussfaktoren auf die optische Analyse von Zellsuspensionen

Ehe der Vergleich des Phasenübergangsverhaltens von synthetischen und biologischen Membranen vollzogen wird, soll zunächst beschrieben werden, inwieweit das Messverfahren selbst die Ergebnisse beeinflusst.

Für die optische Vermessung von Vesikeln kann Laurdan bereits bei der Synthese zu den eingetrockneten Lipiden hinzugefügt werden, sodass nach der Hydrierung (siehe Kapitel 3.2) keine Lösemittel in der Membran verbleiben. Im Gegensatz dazu musste zur Färbung von Zellmembranen das in Wasser schlecht lösliche Laurdan zunächst in Dimethylsulfoxid gelöst werden, bevor es zum Nährmedium hinzugegeben werden konnte. Das Lösemittel beeinflusst jedoch die Lipidordnung von Zellmembranen wie in Abbildung 21 a) am Beispiel von HeLa-Zellen für verschiedene Lösungsmittelkonzentrationen bei gleichem Farbstoffgehalt dargestellt ist. Der GP-Wert nimmt während des Färbeprozesses kontinuierlich ab, was einer Abnahme der Lipidordnung entspricht.

Dieser Effekt fällt für eine fünffach höhere DMSO-Konzentration doppelt so stark aus. Die Intensitätszunahme während des Färbens ist proportional zur Menge der in der Membran gelösten Farbstoffmoleküle, da die Fluoreszenzintensität von Laurdan beim Übergang von der wässrigen Phase in eine Lipiddoppelschicht stark zunimmt [50]. Die Intensitätsänderung fällt für beide DMSO-Konzentrationen ähnlich aus, sodass die verschieden stark ausgeprägten Phasenzustandsänderungen während des Färbens hauptsächlich dem Unterschied in der Lösungsmittelkonzentration zugeschrieben werden können. Dass auch die Farbstoffmoleküle Einfluss auf den Membranzustand ausüben, zeigt Abbildung 21 c), in welcher der optisch vermessene Phasenübergang zweier Lipidproben mit variierendem Laurdan-gehalt abgebildet ist. Die Präsenz des Farbstoffs in der Membran führt zur Reduktion der Lipidordnung bzw. zu einer Schmelzpunktverringerung des Systems. Selbiger Effekt tritt wahrscheinlich auch in biologischen Membranen auf, ist dort jedoch schwieriger zu quantifizieren, weil die Menge des membrangebundenen Laurdans im Gegensatz zu synthetischen Membranen zunächst unbekannt ist.

Die Färbung zellulärer Membranen mit Laurdan wurde im adhärenen Zustand vollzogen. Vorbereitend für Messungen von Zellsuspensionen mussten die Zellen zunächst mithilfe des Enzyms Trypsin vom Substrat abgelöst werden. Die Zugabe bewirkt den Abbau von extrazellulären Verbindungsstellen zum Substrat, wobei sich dieser Vorgang über eine Zeitspanne von etwa 5 Minuten bis zur vollständigen Ablösung der Zelle erstreckt. Abbildung 21 b) zeigt die Ergebnisse der Phasenzustandsmessung mittels Fluoreszenzmikroskopie während des Ablöseprozesses. Jeder Datenpunkt entspricht einer Mittelung über etwa 100 Zellen im Fokus des Objektivs, wobei nach jeder Vermessung einer Probenstelle das Objektiv verfahren wurde, um Bleicheffekte zu minimieren. Die starke Streuung der Datenpunkte zeigt, dass selbst innerhalb einer Zellprobe die Lipidordnung stark variiert, was im Detail in Kapitel 4.2 behandelt wird. Nach Zugabe von Trypsin zu adhärenen Zellen nimmt der GP-Mittelwert über einen Zeitraum von etwa 5 Minuten zu, was einer Erhöhung der Lipidordnung während des morphologischen Übergangs von gespreiteten zu sphärischen Zellen entspricht.

Diese Beobachtung steht im Einklang mit Messungen an Lipidvesikeln, deren Membranspannung durch osmotisches Schwellen erhöht wurde, woraufhin eine Abnahme des GP-Werts, also eine Reduktion der Lipidordnung gemessen wurde [51]. Analog dazu bedeutet der Übergang der Zellen vom adhärenen Zustand in eine sphärische Form eine Abnahme der Membranspannung, welche von einer Zunahme der Lipidordnung begleitet wird.

Die Messung der Lipidordnung in biologischen Membranen oberhalb von  $T = 42\text{ °C}$  führt zwangsläufig zu einer Denaturierung der dort befindlichen Proteine. Da die Präsenz von Proteinen innerhalb der Membran wie bereits beschrieben deren Phasenzustand mitbestimmt, ist davon auszugehen, dass

eine durch Denaturierung induzierte Konformationsänderung ebenfalls Auswirkungen auf die Lipidordnung hat. Hinweise darauf gibt die Messung in Abbildung 21 d), welche die wiederholte Messung von GP an einer einzelnen Probe über einen Temperaturbereich von  $T = -30\text{ °C}$  bis  $T = 90\text{ °C}$  zeigt. Das GP-Profil des ersten Durchlaufs weicht beim Erhitzen von den anderen Messwerten ab. Erst nach diesem Messintervall sind die GP-Messungen reversibel. Grund dafür könnte die Denaturierung der Membranproteine beim erstmaligen Heizprozess sein. In den folgenden Kapiteln wurde lediglich die reversible Zustandsänderung, welche durch Ordnungsänderung der Lipide bedingt ist, untersucht, konkret also nur das Abkühlen nach dem ersten Aufheizen über die Denaturierung hinaus.

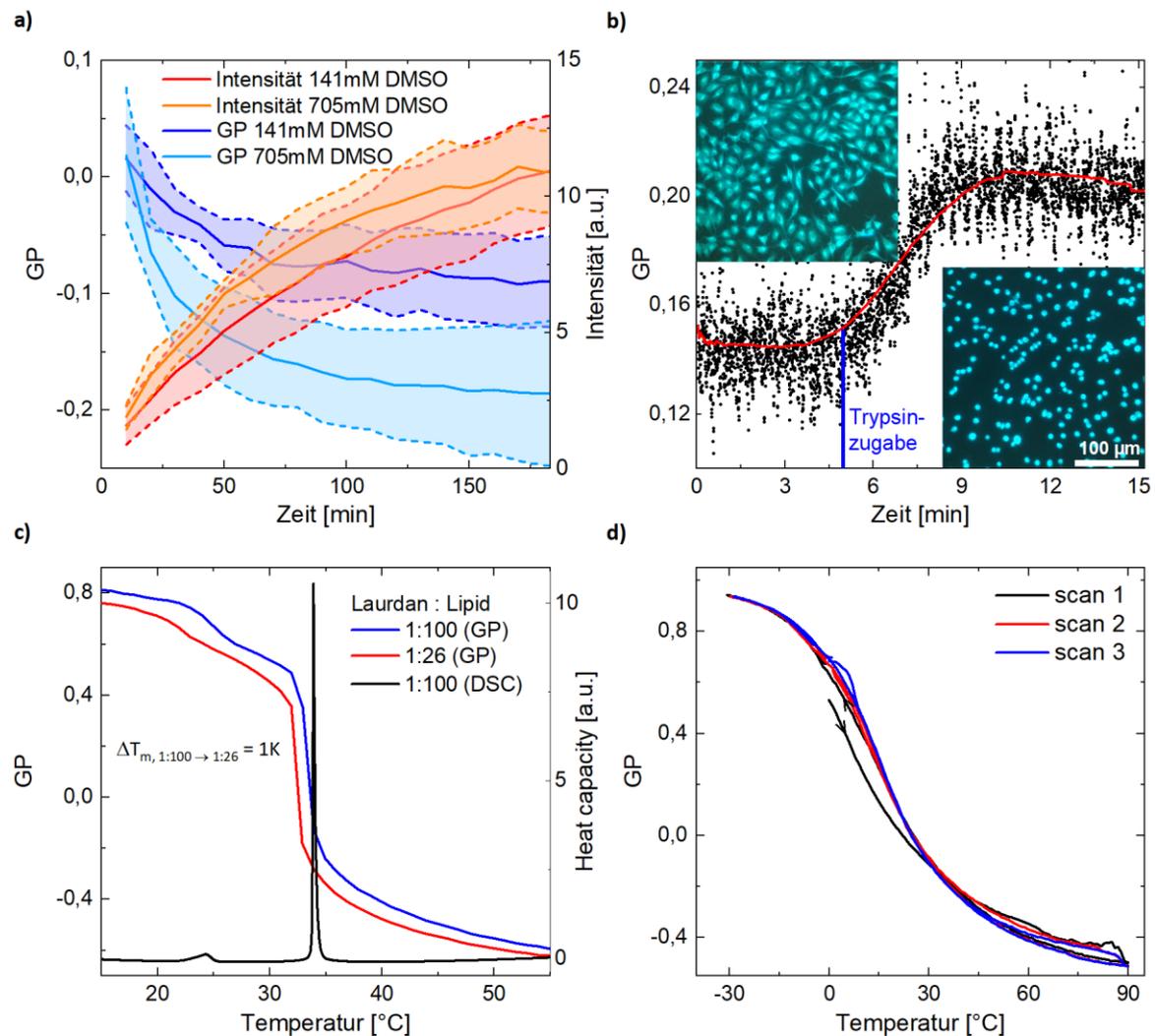


Abbildung 21 Einflussfaktoren des Messprozesses selbst auf die Lipidordnung [49]. a) GP und die Laurdan-Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit, während des Färbens von Zellmembranen mit verschiedenen Lösemittelkonzentrationen. Nach Zugabe des in DMSO gelösten Farbstoffs steigt das Fluoreszenzsignal an, während der GP-Wert, also die Lipidordnung, sinkt. Letzterer Effekt ist stärker für eine höhere DMSO-Konzentration ausgeprägt, woraus abgeleitet werden kann, dass DMSO-Exposition die Lipidordnung verringert. b) GP von HeLa-Zellen als Funktion der Zeit, welche nach Zugabe von Trypsin vom adhärennten Zustand in eine sphärische Form übergehen. Die morphologische Wandlung ist durch eine Zunahme der Lipidordnung begleitet. c) Optisch gemessene GP-Profile von 15:0 PC Vesikeln mit verschiedenen Laurdankonzentrationen. Eine Erhöhung des Farbstoffgehalts bewirkt eine Schmelzpunktverringering der Membran. d) GP als Funktion der Temperatur einer einzelnen HeLa-Zellsuspension. Nach dem ersten Aufheizen bleibt der Membranzustand über die darauffolgenden Messzyklen reversibel.

### 4.1.3. Vergleich von Phasenübergängen in Vesikeln und Zellmembranen

Wie bereits bei der Betrachtung der Reversibilität der Phasenzustandsänderung biologischer Membranen im vorigen Kapitel ersichtlich wurde, erstreckt sich das Lipidschmelzen von Zellmembranen über ein breites Temperaturintervall. Inwieweit sich dieser Vorgang von Phasenübergängen synthetischer Membranen unterscheidet, steht im Fokus dieses Kapitels.

Abbildung 22 a) und b) zeigen die Fluoreszenzintensität von Laurdan eingebettet in die Membran von 14:0 PC Vesikeln und HeLa-Zellen als Funktion der Wellenlänge und der Temperatur. Am Phasenübergang der Vesikel bei etwa  $T = 23,5\text{ °C}$  verschiebt sich das Intensitätsmaximum sprunghaft von  $\lambda = 440\text{ nm}$  zu einer Wellenlänge von  $\lambda = 490\text{ nm}$ . Ein ähnlicher Wechsel findet bei HeLa-Zellmembranen nahe einer Temperatur von  $T = 30\text{ °C}$  statt, ist jedoch wesentlich kontinuierlicher bzw. erstreckt sich über ein breiteres Temperaturintervall.

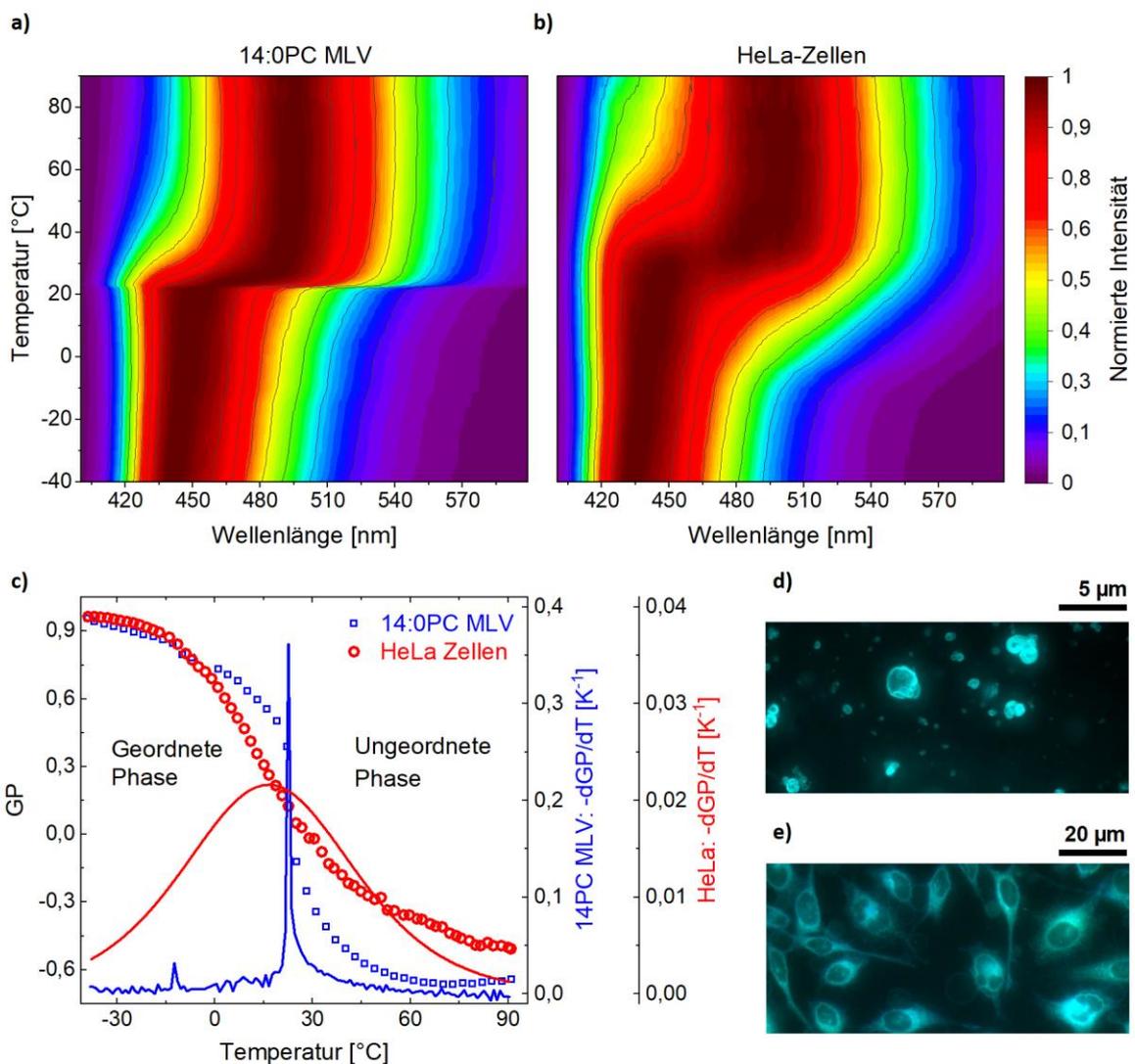


Abbildung 22 Vergleich der Phasenübergänge von Vesikel- und Zellmembranen [49]. a) und b) Normierte Fluoreszenzintensität als Funktion der Wellenlänge und der Temperatur von 14:0 PC Vesikeln und HeLa-Zellmembranen. Die Verschiebung des Emissionsmaximums von  $\lambda = 440\text{ nm}$  zu  $\lambda = 490\text{ nm}$  findet bei Vesikeln in einem wesentlich kleineren Temperaturintervall statt als bei HeLa-Zellmembranen. c) GP und dessen Ableitung nach der Temperatur als Funktion der Temperatur. Der Phasenübergang von Zellmembranen ist wesentlich breiter und flacher. d) und e) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Laurdan-gefärbten Vesikeln und HeLa-Zellmembranen.

Selbiges Verhalten spiegelt sich in den aus den Spektren berechneten temperaturabhängigen GP-Werten beider Systeme wider, welche in Abbildung 22 c) zu sehen sind. Während die Halbwertsbreite des Vesikelübergangs wenige Kelvin beträgt, erstreckt sich das Schmelzregime der Zellmembranen über etwa 60 K. Auch der Maximalwert der Ableitung von GP nach der Temperatur als Maß für die Kooperativität des Phasenübergangs ist bei HeLa-Zellmembranen etwa 20 mal kleiner als für 14:0 PC Vesikel.

Die Breite des Übergangs biologischer Membranen ist einerseits der Vielzahl an verschiedenen Lipiden und Proteinen sowie dem Cholesterolgehalt in der Membran geschuldet. Die Reduktion der Kooperativität durch Cholesterol ist in Abbildung 20 a) und c) sowohl kalorimetrisch als auch optisch deutlich zu erkennen. Ein anderer wichtiger Aspekt ist die biologische Diversität innerhalb einer Zellprobe, welche sich bereits in der Streuung der GP-Werte der adhärennten Zellen in Abbildung 21 b) abzeichnet und auch in der Literatur Erwähnung findet [52]. Diese Abweichungen der Lipidordnung von Zelle zu Zelle sind mit hoher Wahrscheinlichkeit Resultat unterschiedlicher Membranzusammensetzungen. Der breite Phasenübergang in Abbildung 22, welcher an einer Suspension von mehreren Millionen HeLa-Zellen gemessen wurde, stellt somit eine Mittelung über eine Vielzahl von Lipidsystemen mit variierendem Schmelzverhalten dar.

Nachfolgend wird die Sensitivität der kollektiven Lipidordnung solcher Zellensembles gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen untersucht.

#### 4.1.4. Sensitivität gegenüber Adaptation und Cholesterolgehalt

Abhängig von den Umweltfaktoren einer Zelle, wie dem pH-Wert oder der Wachstumstemperatur, kann es notwendig sein, zelluläre Funktionen an die Umgebungsbedingungen anzupassen. Um die Fragestellung zu untersuchen, ob eine solche Reaktion durch eine Änderung der Lipidordnung orchestriert werden könnte, wird in diesem und den zwei folgenden Kapiteln die Sensitivität des zellulären Membranzustands verschiedener Zelllinien gegenüber variierenden Umwelteinflüssen untersucht.

Inspiziert durch die Ergebnisse von Heimburg et al., welche eine Anpassung des Phasenübergangs von Bakterienmembranen an deren Kulturtemperatur beobachteten, wurde in dieser Studie die Adaptation von HeLa-Zellen an Wachstumstemperaturen unterhalb von  $T = 37\text{ °C}$  untersucht [26]. Dafür wurden die Zellen wie in Kapitel 3.1.6 beschrieben sukzessive an niedrigere Temperaturen gewöhnt und deren Phasenübergangsverhalten nach erfolgreicher Anpassung an  $T = 30\text{ °C}$  vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 a) dargestellt. Die Adaptation äußert sich in einer Reduktion des GP-Wertes gegenüber Zellen, die bei  $T = 37\text{ °C}$  kultiviert wurden, besonders bei hohen Temperaturen. Die Verringerung der Lipidordnung im physiologischen Temperaturregime von  $T = 20\text{ °C}$  bis  $T = 40\text{ °C}$  (siehe Abbildung 23 a) Vergrößerung) wurde durch Berechnung eines  $\Delta\text{GP}$ -Wertes, welcher in Abbildung 23 e) gezeigt ist, genauer analysiert. Die durch Adaptation induzierte Differenz in GP von etwa 0,05 kann mithilfe der mittleren Steigung von GP im physiologischen Temperaturbereich von etwa  $d\text{GP}/dT = -0,019\text{ K}^{-1}$  in eine äquivalente Temperaturänderung von über 2,5 K konvertiert werden. Das bedeutet, dass die Lipidordnung der adaptierten Zellen bei der gleichen Temperatur wie die Kontrollzellen vergleichsweise so reduziert ist, als ob die Temperatur um 2,5 K erhöht wäre. Der Unterschied in den Ableitungen der jeweiligen GP-Profile, dargestellt in Abbildung 23 c), ist dagegen nicht so stark ausgeprägt. Verglichen wurden dabei der Maximalwert als Maß für die Kooperativität  $C$ , die Übergangsfläche als äquivalente Größe zur Schmelzenthalpie  $\Delta H$  und die Phasenübergangstemperatur  $T_m$ . Während  $C$  und  $\Delta H$  durch Adaptation zunehmen, verringert sich die Phasenübergangstemperatur um  $\Delta T_m = 0,4\text{ K}$  von  $T_m = 16,9\text{ °C}$  auf  $T_m = 16,5\text{ °C}$ , wobei letztere Änderung im Rahmen der durchgeführten Messungen nicht statistisch signifikant ist.

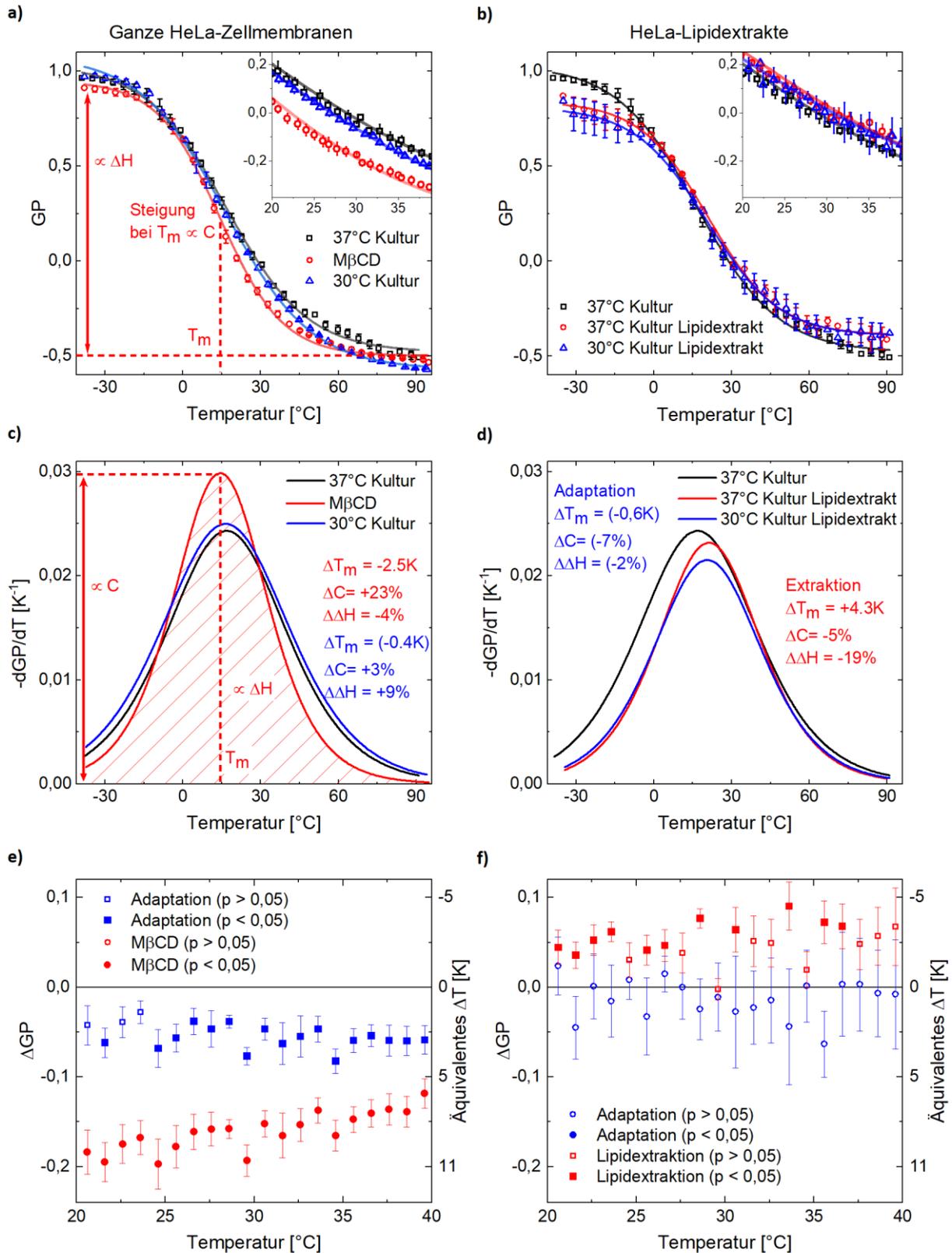


Abbildung 23 Auswirkungen von Adaptation und Cholesterolreduktion auf die Membranen von HeLa-Zellen und deren Lipidextrakte [49]. **a)** GP als Funktion der Temperatur dreier verschiedener Proben: Zellen, deren Membrancholesterolgehalt mittels Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M $\beta$ CD) verringert wurde und Zellen, welche bei  $T = 30^\circ\text{C}$  und  $T = 37^\circ\text{C}$  kultiviert wurden. Die jeweiligen Messpunkte stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Messungen dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Messungen. Die Daten wurden jeweils mit einer sigmoidalen Fit-Funktion approximiert (durchgezogene Linie). Der Wendepunkt der sigmoidalen Kurve indiziert die Phasenübergangstemperatur  $T_m$ , die Steigung bei  $T_m$  entspricht der

Kooperativität  $C$  und die Differenz der jeweiligen GP-Niveaus vor und nach dem Übergang ist der Schmelzenthalpie  $\Delta H$  proportional. **b)** GP-Profile von Vesikeln synthetisiert aus den Lipiden von adaptierten Zellen und einer bei  $T = 37^\circ\text{C}$  kultivierten Kontrolle, welche mittels der Folch-Methode extrahiert wurden. Zusätzlich abgebildet ist die Messung an ganzen HeLa-Zellen, um die Auswirkungen der Extraktion analysieren zu können. **c)** Ableitung der GP-Profile aus **a)** nach der Temperatur. Unterschiede in der Kooperativität  $C$ , der Schmelztemperatur  $T_m$  und dem Kurvenintegral als Maß für die Schmelzenthalpie  $\Delta H$  wurden mittels Zweistichproben-t-Test auf Signifikanz untersucht. Änderungen mit einem P-Wert größer als 0,05 sind in Klammern angegeben. **d)** Ableitung der GP-Profile aus **b)**. Analog zu **c)** wurden die Größen  $C$ ,  $T_m$  und  $\Delta H$  verglichen. **e)** Differenzen der GP-Werte in einem physiologischen Temperaturregime aus einer Kontrolle und adaptierten Zellen sowie einer Kontrolle und Zellen, deren Membrancholesterolgehalt reduziert wurde. Ein Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert der Messung dreier unabhängiger Proben. Die Fehlerbalken indizieren die zusammengefasste Standardabweichung der Messungen. Das jeweilige  $\Delta GP$  wurde mittels der mittleren Steigung des GP-Profiles der Kontrollmessung von 5,3 K pro GP in eine äquivalente Temperaturänderung konvertiert. Die  $\Delta GP$ -Werte wurden mittels Zweistichproben-t-Test auf Signifikanz untersucht. Gefüllte Symbole indizieren einen p-Wert kleiner 0,05. **f)** Differenzen der GP-Werte in einem physiologischen Temperaturregime aus den Lipidextrakten, einer Kontrolle und adaptierten Zellen. Außerdem Differenzen der GP-Werte ganzer HeLa-Zellen und deren Lipidextrakte. Die Darstellung der Daten, der Messfehler und der Signifikanz folgt dem Schema aus **e)**.

Zur Untersuchung, ob die Ursache der Lipidordnungsänderung während der Adaptation eine Anpassung der Lipidkomposition oder eine Änderung des Proteingehalts war, wurden die Membranlipide aus adaptierten HeLa-Zellen und Zellen, welche regulär bei  $T = 37^\circ\text{C}$  kultiviert wurden, mittels der Folch-Methode extrahiert (siehe Kapitel 3.1.7). Anschließend erfolgte die Herstellung von Vesikeln aus den Lipidextrakten, welche dann optisch mittels Laurdan vermessen wurden. Abbildung 23 b) zeigt die GP-Profile beider Lipidextrakte und die Messung ganzer HeLa-Zellmembranen der Kontrolle. Der Vergleich der Messungen beider Extrakte mit der unveränderten Membran, die einen hohen Proteingehalt aufweist, zeigt vor allem eine Reduktion von GP bei niedrigen Temperaturen und einen gegenteiligen Effekt bei hohen Temperaturen. Im vergrößerten Ausschnitt des physiologischen Temperaturbereichs ist außerdem zu erkennen, dass die GP-Profile der Lipidextrakte zu höheren GP-Werten verschoben sind.

Das durch die Extraktion bedingte  $\Delta GP$  in Abbildung 23 f) erreicht Werte bis maximal  $\Delta GP = 0,9$ , was einer äquivalenten Temperaturänderung von  $\Delta T = 4,5\text{ K}$  entspricht. Selbiger Effekt zeigt sich auch im Vergleich der Ableitungen der jeweiligen GP-Profile nach der Temperatur in Abbildung 23 d): Während die Kooperativität und die Schmelzenthalpie durch Reduktion des Proteingehalts abnehmen, verschiebt sich die Schmelztemperatur um  $\Delta T_m = 4,3\text{ K}$  zu höheren Temperaturen. Im Umkehrschluss bewirkt die Präsenz von Proteinen in biologischen Membranen eine Schmelzpunktverringerng.

Der Vergleich der beiden Lipidextrakte untereinander ermöglicht es, Änderungen der Lipidkomposition in der Membran von adaptierten HeLa-Zellen zu detektieren. Während ein leichter Unterschied in den GP-Profilen der Abbildung 23 b) bei tiefen Temperaturen zu erkennen ist, sind die  $\Delta GP$ -Werte im physiologischen Bereich (Abbildung 23 f)) nicht statistisch signifikant. Auch der Vergleich der Phasenübergangsprofile in Abbildung 23 d) offenbart keine statistisch signifikanten Änderungen. Daher scheint die Änderung der Lipidordnung während des Adaptationsprozesses hauptsächlich auf eine Anpassung der Membranproteinkomposition zurückgeführt werden zu können.

Heimburg et al. untersuchten die Adaptation von *Escherichia Coli* Membranen kalorimetrisch, was im Rahmen dieser Studie an HeLa-Zellen nicht gelang. Um die Hypothese zu testen, dass die Kooperativität des Phasenübergangs in HeLa-Zellen durch das Membrancholesterol reduziert und damit kalorimetrisch nicht detektierbar ist, wurde der Cholesterolgehalt durch Behandlung mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M $\beta$ CD) künstlich reduziert. Der Vergleich des GP-Profiles mit dem einer unbehandelten Probe in Abbildung 23 a) zeigt eine steilere Abnahme von GP mit steigender Temperatur für die Membranen mit geringerem Cholesterolgehalt. Infolgedessen ist die Kooperativität des Phasenübergangs in Abbildung 23 c) um 23% erhöht. Das durch die M $\beta$ CD-Behandlung maximal induzierte  $\Delta GP$  in Abbildung 23 e) entspricht einer Temperaturänderung von  $\Delta T \approx -11\text{ K}$ .

Die Kooperativität von Phasenübergängen ist demnach in cholesterolreichen Zellmembranen wie angenommen reduziert. Auch nach der Behandlung mit M $\beta$ CD war eine Vermessung mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie nicht möglich. Grund dafür könnte das verbliebene Cholesterol oder die Diversität der Membranlipide sein. Hier können weiterführende Arbeiten auf Basis der Lipidomik anknüpfen.

#### 4.1.5. Sensitivität gegenüber Anästhetika und morphologischen Änderungen

Die Rolle der Lipidordnung bei der Signaltransduktion in den Membranen von Nervenzellen ist Gegenstand aktueller Forschung und soll das Standardmodell von Hodgkin und Huxley ergänzen bzw. ersetzen [15,16,53,54]. Konkret sollen Informationen anstelle von elektrischen Spannungen, welche durch Ionenpumpen und -kanäle hervorgerufen werden, durch mechanische Wellen, die sich in der Zellmembran ausbreiten, transportiert werden. Voraussetzung dafür ist, dass sich die Zellmembran in der fluiden Phase nahe eines Phasenübergangs befindet. Ein temporärer, lokaler Übergang der Membran von einem ungeordneten in einen geordneten Zustand kann sich unter diesen Bedingungen mit Schallgeschwindigkeit ausbreiten.

Ein Hinweis, der für das alternative Modell der Nervenreizleitung spricht, ist die unspezifische Wirkweise von Anästhetika. Sie folgt einer einfachen Gesetzmäßigkeit, der Meyer-Overton-Regel, welche beschreibt, dass die Wirkweise von Anästhetika proportional zu deren Partitionskoeffizienten in Wasser und Öl ist [55,56]. Ein wirksames Anästhetikum löst sich daher gut im apolaren Teil einer Lipidmembran und führt zu einer Schmelzpunktverschiebung derselben, was von Heimburg und Jackson durch Wärmekapazitätsmessungen an Vesikeln und Zugabe des Anästhetikums Octanol nachgewiesen wurde. Die betäubende Wirkung solcher Substanzen kann im oben eingeführten Modell dadurch erklärt werden, dass sie den Phasenübergang einer Zellmembran so weit verschieben, dass kein spontaner Übergang in die geordnete Phase mehr möglich ist und die Informationsleitung in Form von Dichtewellen damit stark erschwert oder unterbunden ist.

Um eine solche Verschiebung der Schmelztemperatur zellulärer Membranen zu untersuchen, wurden Phasenzustandsmessungen an B35 Neuroblastom-Zellen nach Exposition zu Octanol durchgeführt, deren Ergebnis in Abbildung 24 a) dargestellt ist. Das GP-Profil der mit Octanol behandelten Probe ist deutlich zu niedrigeren Temperaturen verschoben. Die Differenz  $\Delta GP$  zur Kontrollmessung (siehe Abbildung 24 e)) beträgt über  $\Delta GP = -0,1$ , was einer Reduktion der Lipidordnung entspricht, welche durch eine Erwärmung um mehr als 5 K hervorgerufen wird. Im Einklang damit zeigt auch der Vergleich der GP-Ableitungen in Abbildung 24 c), dass neben einer Verringerung der Kooperativität die Schmelztemperatur  $T_m$  um 3 K verringert wurde. Die Hypothese, dass Anästhetika den Schmelzpunkt der Membranen von Nervenzellen verringern, scheint damit bestätigt.

Die Kultur von B35 Neuroblastom-Zellen erfolgt im undifferenzierten Zustand, da nach Ausdifferenzierung in eine Form mit neuronalen Fortsätzen keine Zellteilung mehr stattfindet. Der morphologische Übergang der Differenzierung, welcher durch Exposition zu DcAMP induziert werden kann (siehe Kapitel 3.1.5), ist in Abbildung 25 dargestellt. Erst in der differenzierten Form sind die Zellen in der Lage neuronale Aktivitäten zu vollziehen. Zur Untersuchung, ob der morphologische Übergang in einen Zustand mit potentieller neuronaler Aktivität auch mit einer Veränderung der Lipidordnung einhergeht, wurden Phasenzustandsmessungen an B35 Neuroblastom-Zellen vor und nach der Differenzierung durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 24 a) dargestellt sind.

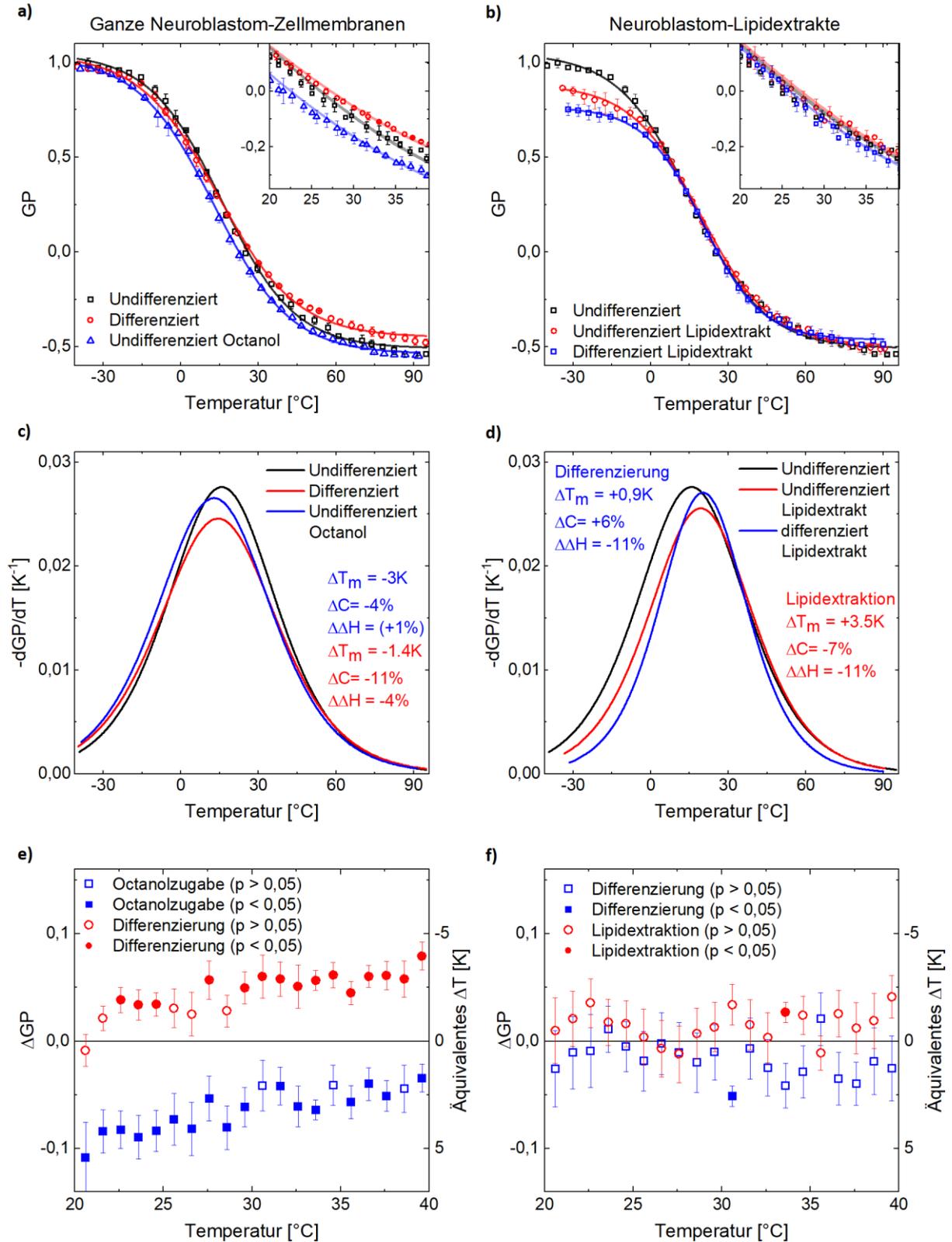


Abbildung 24 Phasenzustandsänderungen an B35 Neuroblastom-Zellen durch ein Anästhetikum und durch Differenzierung [49]. **a)** GP als Funktion der Temperatur einer Kontrolle, einer mit Octanol behandelten Probe und einer differenzierten Probe. Die jeweiligen Messpunkte stellen den Mittelwert dreier unabhängiger Messungen dar. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Messungen. Die Daten wurden jeweils mit einer sigmoidalen Fit-Funktion approximiert (durchgezogene Linie). **b)** GP-Profile von Vesikeln synthetisiert aus den Lipiden von differenzierten und undifferenzierten Zellen, welche mittels der Folch-Methode extrahiert wurden. Zusätzlich abgebildet ist die Messung an ganzen B35 Neuroblastom-Zellen, um

die Auswirkungen der Extraktion analysieren zu können. c) Ableitung der GP-Profile aus a) der Temperatur. Die Kooperativität  $C$ , die Schmelztemperatur  $T_m$  und die Schmelzenthalpie  $\Delta H$  wurden wie in Abbildung 23 c) bestimmt und deren Differenzen mittels Zweistichproben-t-Test auf Signifikanz untersucht. Änderungen mit einem P-Wert größer als 0,05 sind in Klammern angegeben. d) Ableitung der GP-Profile aus b). Analog zu c) wurden die Größen  $C$ ,  $T_m$  und  $\Delta H$  verglichen. e) Differenzen der GP-Werte in einem physiologischen Temperaturregime aus einer Kontrolle und mit Octanol behandelten Zellen sowie differenzierten und undifferenzierten Zellen. Ein Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert der Messung dreier unabhängiger Proben. Die Fehlerbalken indizieren die zusammengefasste Standardabweichung der Messungen. Das jeweilige  $\Delta GP$  wurde mithilfe der mittleren Steigung des GP-Profiles der Kontrollmessung von 5,3 K pro GP in eine äquivalente Temperaturänderung konvertiert. Die  $\Delta GP$ -Werte wurden mittels Zweistichproben-t-Test auf Signifikanz untersucht. Gefüllte Symbole indizieren einen p-Wert kleiner 0,05. f) Differenzen der GP-Werte in einem physiologischen Temperaturregime aus den Lipidextrakten von differenzierten und undifferenzierten B35 Neuroblastom-Zellen. Außerdem Differenzen der GP-Werte ganzer Zellen und deren Lipid-Extrakte. Die Darstellung der Daten, der Messfehler und der Signifikanz folgt dem Schema aus e).

Gegenüber der undifferenzierten Kontrollprobe nimmt der GP-Wert und damit die Lipidordnung insbesondere bei hohen Temperaturen zu. Die Differenz zwischen beiden Messungen, welche in Abbildung 24 e) berechnet wurde, beträgt im physiologischen Temperaturbereich maximal  $\Delta GP = 0,08$ , was einer Temperaturänderung von 4 K entspricht. Während die Lipidordnung insgesamt durch Differenzierung zunimmt, verschiebt sich der Bereich der steilsten GP-Änderung zu niedrigeren Temperaturen, weshalb sich der Schmelzpunkt  $T_m$  in Abbildung 24 c) hin zu niedrigeren Temperaturen verschiebt. Die Kooperativität  $C$  des Übergangs verringert sich außerdem um 11 %.

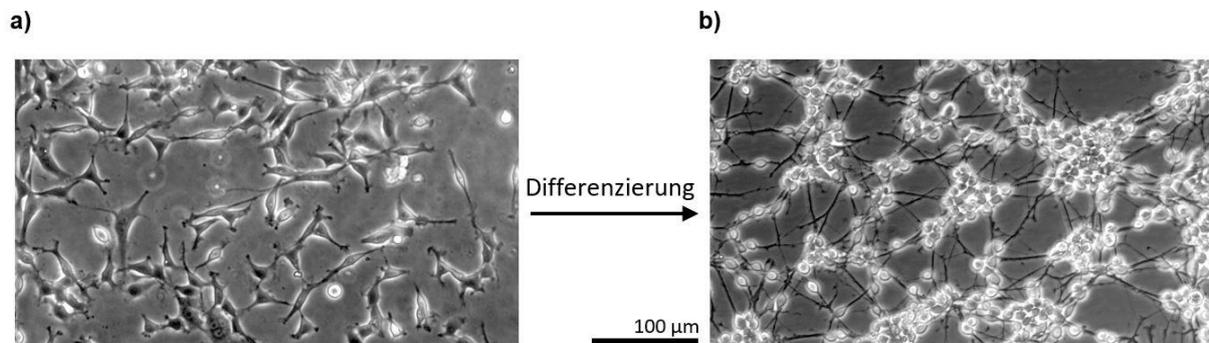


Abbildung 25 Mikroskop-Aufnahmen von B35 Neuroblastom-Zellen im Phasenkontrast vor (a) und nach (b) der Differenzierung [49]. Im Gegensatz zu den Zellen in a) sind in b) neuronale Fortsätze zu erkennen.

Der Übergang der Zelle in eine Form mit veränderter Funktionalität ist demnach von einer Anpassung des Membranzustands begleitet. Um wie schon bei der Untersuchung der Adaptation von HeLa-Zellen an andere Kulturbedingungen den Mechanismus der Lipidordnungsänderung genauer zu erforschen, wurden die Lipide von undifferenzierten und differenzierten B35 Neuroblastom-Zellen extrahiert und optisch vermessen. Der Vergleich der Ergebnisse erlaubt die Ursache der Phasenzustandsänderung auf eine Anpassung der Lipid- oder der Proteinkomposition zurückzuführen und ist in Abbildung 24 b) dargestellt.

Zwischen beiden Lipidextrakten zeichnet sich lediglich bei tiefen Temperaturen ein Unterschied der GP-Werte ab. Dementsprechend klein fallen die  $\Delta GP$ -Werte in Abbildung 24 f) aus, wobei der Großteil der Datenpunkte einen p-Wert größer als 0,05 aufweist. Der Vergleich der negativen Ableitungen  $-dGP/dT$  lässt eine leichte Verschiebung der Schmelztemperatur um 0,9 K zu höheren Temperaturen erkennen, was im Gegensatz zu der Schmelzpunktverschiebung von  $\Delta T_m = -1,4$  K für die gesamten B35 Neuroblastom-Zellmembranen steht. Daraus kann geschlossen werden, dass neben einer geringfügigen Anpassung der Lipidkomposition vor allem eine Veränderung der Membranproteinzusammensetzung während der Differenzierung stattgefunden haben muss.

Analog zur Auswertung der HeLa-Lipidextraktion, kann durch Vergleich der Messung einer unbehandelten B35 Neuroblastom-Membran mit ihrem Lipidextrakt auf die Rolle der Proteine für den Membranzustand geschlossen werden. Der Vergleich der GP-Profile in Abbildung 24 b) zeigt eine starke

Reduktion der Lipidordnung bei niedrigen Temperaturen. Die Änderungen der Lipidordnung durch Lipidextraktion fällt im physiologischen Regime gering aus, wie in Abbildung 24 f) ersichtlich wird. Die Ableitung der GP-Kurven nach der Temperatur zeigt jedoch erneut wie schon bei HeLa-Zellmembranen in Abbildung 23 d) eine deutliche Schmelzpunktverschiebung von  $\Delta T_m = 3,5$  K hin zu höheren Temperaturen. Die Beobachtung, dass die Präsenz von Proteinen in der Membran eine Schmelzpunktreduktion bewirkt, scheint daher nicht nur auf eine Zelllinie beschränkt zu sein.

#### 4.1.6. Sensitivität gegenüber dem pH-Wert

Neben den bisher diskutierten Einflussgrößen auf die Lipidordnung zellulärer Membranen, wie die Temperatur oder die Zellmorphologie, ist der pH-Wert eine weitere wichtige Größe, welche Prozesse innerhalb des menschlichen Körpers steuert. Dieser kann von etwa  $\text{pH} = 7,4$  in gesundem Gewebe auf Werte bis  $\text{pH} = 6$  in entzündeten Regionen fallen [57]. Direkt betroffen davon sind unter anderem rote Blutkörperchen, deren Membraneigenschaften wie die Permeabilität empfindlich auf Änderungen des pH-Werts reagieren [58]. Um die Fragestellung zu untersuchen, ob sich zusammen mit Größen wie der Membranpermeabilität auch die Lipidordnung abhängig vom pH-Wert ändert, wurde der Phasenzustand von Membranen roter Blutkörperchen bei verschiedenen pH-Werten vermessen.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Messungen an HeLa-Zellen und B35 Neuroblastom-Zellen konnten rote Blutkörperchen aufgrund ihres Hämoglobingehalts nicht ohne weitere Behandlung vermessen werden. Hämoglobin absorbiert besonders stark und vor allem nicht-linear im Wellenlängenbereich der Laurdan-Fluoreszenzemission. Deswegen wurden die roten Blutkörperchen durch osmotisches Schwellen zum Platzen gebracht und vom freien Hämoglobin durch Zentrifugation separiert (siehe Kapitel 3.1.8). Das Ergebnis der Messungen an diesen „leeren“ Membranhüllen (engl. „Ghosts“) ist in Abbildung 26 a) dargestellt.

Mit sinkendem pH-Wert nehmen die GP-Werte besonders bei hohen Temperaturen zu. Die aus der pH-Reduktion resultierenden GP-Änderungen (Abbildung 26 c)) im physiologischen Temperaturbereich fallen für eine Absenkung auf  $\text{pH} = 6$  gering in einem Bereich von  $\Delta \text{GP} = 0,03$  aus, was einer Temperaturänderung von einem Kelvin entspricht. Bei einer weiteren Reduktion auf  $\text{pH} = 5$  kommt die maximale Änderung der Lipidordnung einer Verringerung der Temperatur um etwa  $\Delta T = 6$  K gleich. Eine statistisch signifikante Schmelzpunktverschiebung ist in Abbildung 26 b) bei einer Reduktion des pH-Werts um  $\Delta \text{pH} = 2$  um  $\Delta T = 1,5$  K zu höheren Temperaturen zu beobachten.

Analog zu Messungen, welche an Vesikeln bestehend aus geladenen Lipiden durchgeführt wurden, bewirkt eine Protonierung der Membran roter Blutkörperchen eine Reduktion der Lipidordnung bzw. eine Verringerung des GP-Werts, wie in Abbildung 26 a) links unten dargestellt ist [21]. Zusammen mit bereits in der Literatur bekannten Änderungen physikalischer Membraneigenschaften ändert sich also auch die Lipidordnung in den Membranen roter Blutkörperchen als Funktion des pH-Werts. Am deutlichsten ausgeprägt ist dieser Effekt in der ungeordneten Phase.

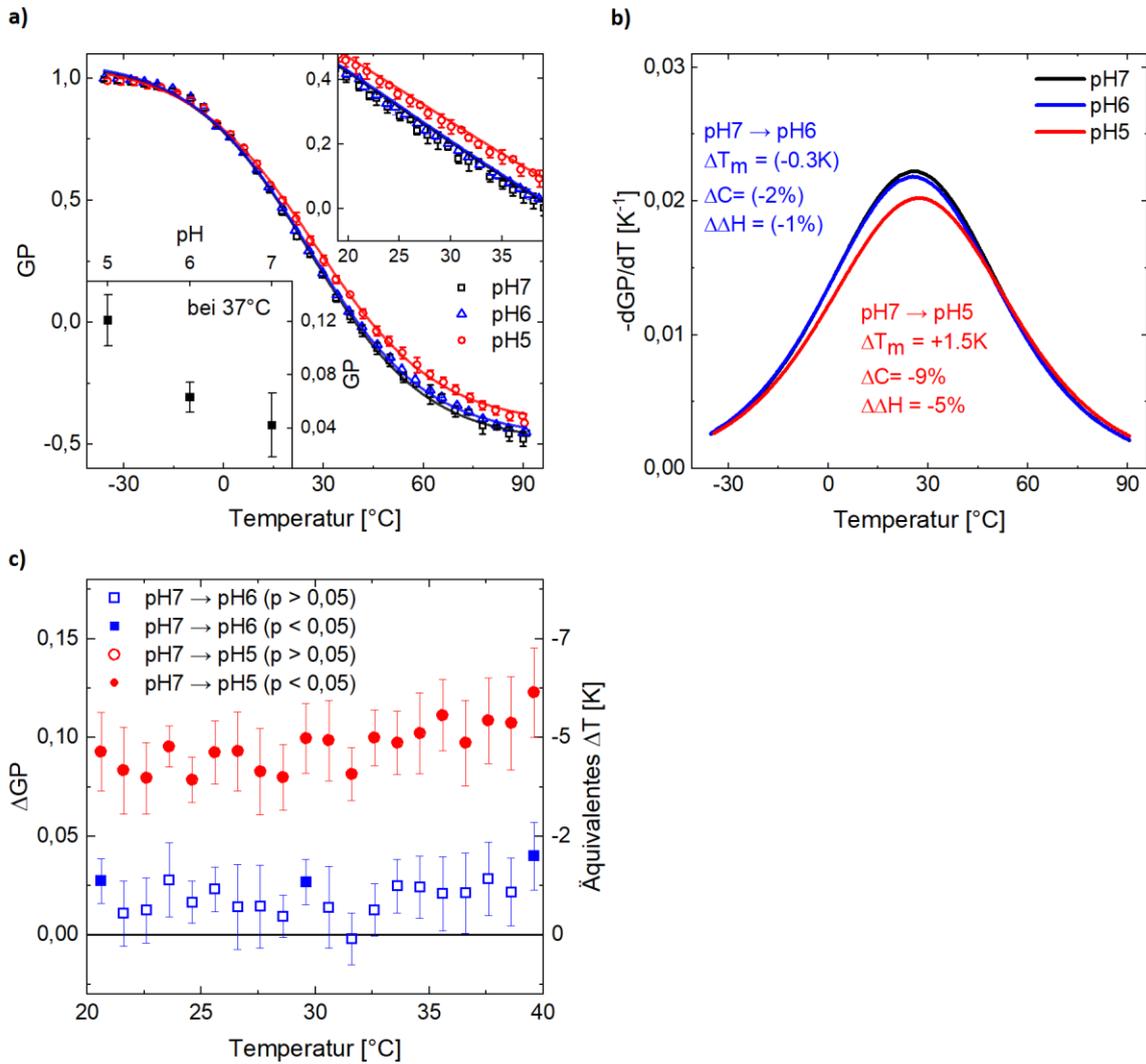


Abbildung 26 Phasenzustandsänderungen an Membranhüllen roter Blutkörperchen durch pH-Reduktion [49]. **a)** GP als Funktion der Temperatur bei drei verschiedenen pH-Werten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Messungen. Die Daten wurden jeweils mit einer sigmoidalen Fit-Funktion approximiert (durchgezogene Linie). **b)** Ableitung der GP-Profile aus a) nach der Temperatur. Die Kooperativität  $C$ , die Schmelztemperatur  $T_m$  und die Schmelzenthalpie  $\Delta H$  wurden wie in Abbildung 23 c) bestimmt und deren Differenzen mittels Zweistichproben-t-Test auf Signifikanz untersucht. Änderungen mit einem P-Wert größer als 0,05 sind in Klammern angegeben. **c)** Differenzen der GP-Werte in einem physiologischen Temperaturregime induziert durch pH-Reduktion um  $\Delta pH = 1$  und  $\Delta pH = 2$ . Ein Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert der Messung dreier unabhängiger Proben. Die Fehlerbalken indizieren die zusammengefasste Standardabweichung der Messungen. Das jeweilige  $\Delta GP$  wurde mittels der mittleren Steigung des GP-Profiles der Kontrollmessung von 5,3 K pro GP in eine äquivalente Temperaturänderung konvertiert. Die  $\Delta GP$ -Werte wurden mittels Zweistichproben-t-Test auf Signifikanz untersucht. Gefüllte Symbole indizieren einen p-Wert kleiner 0,05.

#### 4.1.7. Fazit

Die wichtigsten Schlussfolgerungen, die aus der Diskussion der optischen Detektion von Phasenübergängen in Vesikel- und Zellsuspensionen abgeleitet wurden, lauten wie folgt:

- Die negative Ableitung des GP-Werts nach der Temperatur von Vesikeln aus synthetischen Lipidmembranen ist deren Wärmekapazität sowohl hinsichtlich der Schmelztemperatur als auch der Kooperativität proportional.
- Laurdan ist selbst in gefrorenem Zustand des Lösemittels sensitiv gegenüber der Lipidordnung.
- Während des Färbens mit Laurdan reduziert das verwendete Lösungsmittel und der Farbstoff selbst die Lipidordnung des zu untersuchenden Systems.
- Eine Reduktion der Membranspannung adhärenter Zellen durch Ablösung vom Substrat erhöht deren Lipidordnung.
- Die Denaturierung von Proteinen erhöht die Membranordnung. Nach abgeschlossener Denaturierung ist der temperaturabhängige GP-Wert reversibel.
- Phasenübergänge in Zellsuspensionen sind etwa 30-mal breiter und 20-mal weniger kooperativ als die in Suspensionen multilamellarer Vesikel.
- Zellen reduzieren ihre Lipidordnung während der Adaptation an verringerte Wachstumstemperaturen durch Anpassung der Membranproteinkomposition.
- Cholesterol verringert die Kooperativität in zellulären Membranen.
- Das Anästhetikum Octanol induziert eine Schmelzpunktverringerng in den Membranen von Nervenzellen.
- Während der Differenzierung von B35 Neuroblastom-Zellen von einem sphärischen Zustand in eine Morphologie mit neuronalen Fortsätzen nimmt die absolute Lipidordnung zu und die Schmelztemperatur ab.
- Die Lipidordnung der Membranen roter Blutkörperchen ist sensitiv gegenüber dem pH-Wert und nimmt mit steigendem Grad an Protonierung ab.

Wie bereits diskutiert, könnte die große Breite und geringe Kooperativität des Phasenübergangs von Zellsuspensionen auf die Diversität deren Bestandteile aber auch auf die biologische Streuung innerhalb einer Zellpopulation zurückzuführen sein. Letzterer Aspekt ist Gegenstand des folgenden Kapitels und soll durch Analyse einzelner Zellen genauer untersucht werden.

## 4.2. Untersuchung der Lipidordnung auf Einzelzellniveau

In diesem Kapitel soll die Diversität der Lipidordnung innerhalb einer Zellpopulation, aber auch innerhalb einzelner Zellen analysiert werden, um die Ergebnisse der Messungen an Zellkollektiven des vorherigen Kapitels besser verstehen zu können. Dazu wurden fluoreszenzmikroskopische Messungen an adhärennten Zellen bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Die optische Messung der Lipidordnung mittels Laurdan erfolgte demnach nicht durch Fluoreszenz-Spektroskopie, sondern durch Verwendung zweier Filtersätze mit Emissionsfiltern mit zentralen Wellenlängen von  $\lambda = 440$  nm und  $\lambda = 490$  nm (siehe Kapitel 3.5.1).

Die Resultate des Kapitels 4.2. basieren auf Messungen, welche von Jonas Reitler im Rahmen seiner Masterarbeit und von Nicolas Färber durchgeführt wurden. Eine Veröffentlichung hierzu befindet sich in Vorbereitung [59].

### 4.2.1. Vergleich adhärennter und suspendierter Zellen

Zur besseren Vergleichbarkeit der GP-Werte, welche bei der Analyse von Zellsuspensionen im vorherigen Kapitel durch Approximation der Daten mittels zweier verschiedener Verteilungsfunktionen berechnet wurden (siehe Kapitel 3.4), erfolgte die Bestimmung der Werte für GP der suspendierten HeLa-Zellen in Abbildung 27 a) auch aus den Intensitätswerten bei den Wellenlängen  $\lambda = 440$  nm und  $\lambda = 490$  nm. Der Vergleich mit der Auswertung in Kapitel 4.1.3 zeigt, dass sich dabei der GP-Wertebereich im gleichen Temperaturintervall von  $[-0,5; 1]$  auf  $[-0,4; 0,5]$  reduziert. Die spektrale Auswertung mittels Fit-Funktionen ist demnach um einen Faktor 1,7 sensitiver gegenüber der Analyse, welche nur zwei Intensitätsbereich des Laurdan Spektrums berücksichtigt.

Zunächst wurde untersucht, ob sich die Temperaturabhängigkeit der Lipidordnung adhärennter Zellen von der suspendierter Zellen unterscheidet. Dazu wurde ein Temperaturgradient innerhalb eines mit HeLa-Zellen bewachsenen Objektträgers generiert, wofür ein eigens dafür entwickelter Versuchsaufbau (siehe Abbildung 27 b)) verwendet wurde. Die lipidordnungsabhängige Farbe der mit Laurdan gefärbten HeLa-Zellen ist in Abbildung 27 e) zu sehen. Der Temperaturgradient, welcher sich von  $T = 20$  °C bis  $T = 40$  °C erstreckt, induziert eine kontinuierliche Farbänderung von blau zu grün. Dagegen findet im gleichen Temperaturintervall der Wechsel der Emissionsfarbe bei Vesikeln, bestehend aus einer einzelnen Lipidsorte, sprunghaft statt, wie in Abbildung 27 d) erkennbar ist.

Mithilfe der mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 27 e) wurde für jede Zellmembran pixelweise der GP-Wert als Maß für die lokale Lipidordnung berechnet und zunächst zu einem Mittelwert pro Zelle zusammengefasst. Diese wurden wiederum zu einem Mittelwert für verschiedene Temperaturintervalle konzentriert, welche in Abbildung 27 c) als blaue Datenpunkte dargestellt sind. Zum Vergleich wurden die GP-Messungen an Zellsuspensionen aus Abbildung 27 a) in selbiges Diagramm eingefügt. Durch lineare Approximation wurde die Lipidordnungsänderung als Funktion der Temperatur  $dGP/dT$  für beide Systeme bestimmt. Mit  $-0,013$  K<sup>-1</sup> zeigen die Zellen eine geringfügig erhöhte Temperaturabhängigkeit gegenüber  $-0,011$  K<sup>-1</sup> der suspendierten Probe. Die starke Abweichung der absoluten GP-Werte ist vor allem auf den Umstand zurückzuführen, dass die GP-Messung der Zellsuspension während des Abkühlens von  $T = 90$  °C durchgeführt wurde. Demnach sind die Membranproteine der suspendierten Zellen bereits denaturiert gewesen, was zu einer Erhöhung der Lipidordnung im Vergleich zu einer intakten Zellmembran führt (siehe Abbildung 21 d)). Außerdem ist die Membranspannung

sphärischer Zellen gegenüber adhärennten, gespreiteten Zellen reduziert, was ebenfalls eine Erhöhung des GP-Werts bedingt (Abbildung 21 b)).

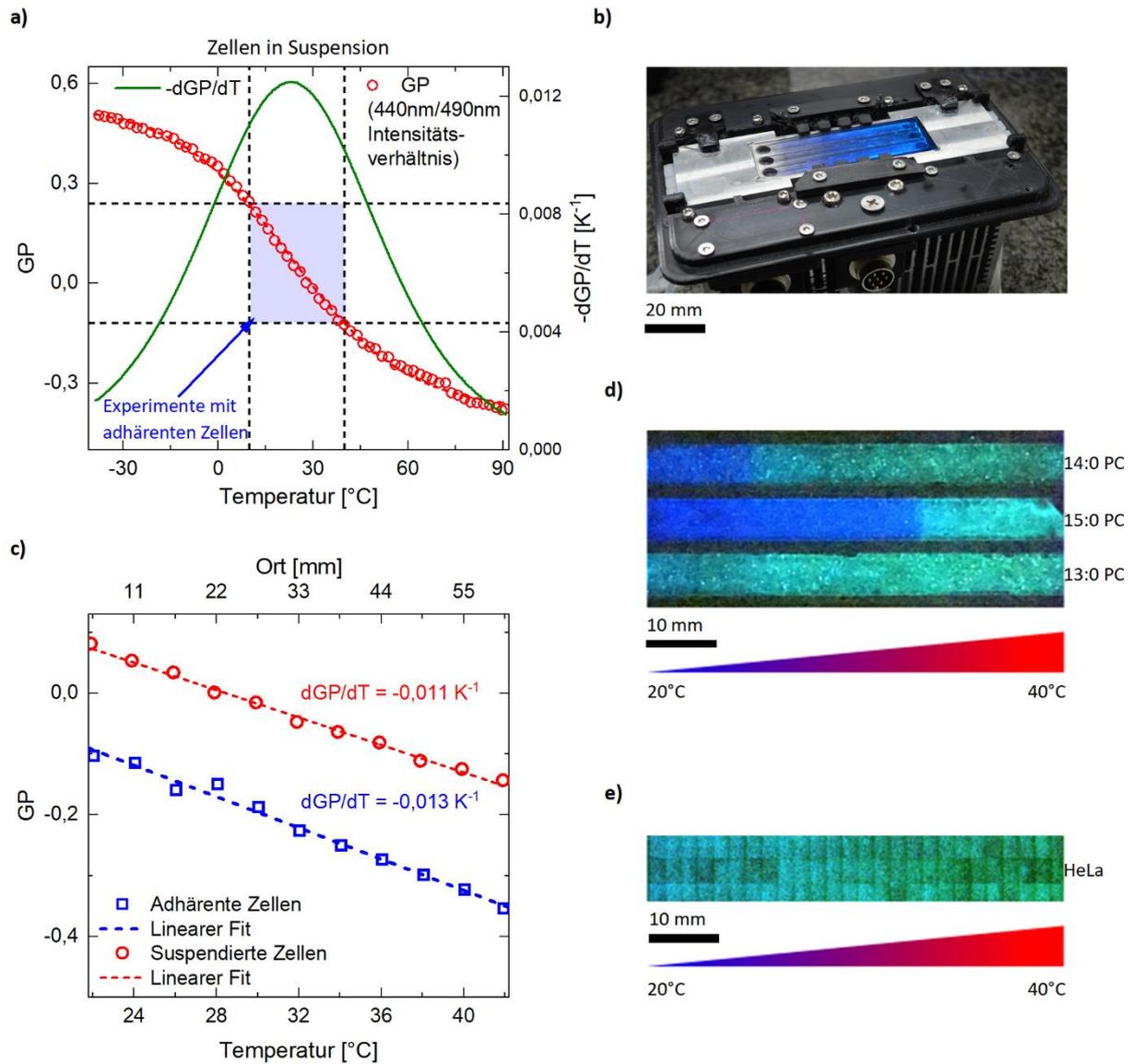


Abbildung 27 Vergleich der Temperaturabhängigkeit der Lipidordnung adhärennter und suspendierter Zellen. **a)** GP und dessen Ableitung nach der Temperatur gemessen an einer Zellsuspension als Funktion der Temperatur. Die jeweiligen GP-Werte wurden nicht durch Approximation der Laurdan-Spektren mittels zweier verschiedener Fit-Funktionen berechnet, sondern durch Auswertung der Intensitäten in den Wellenlängenbereichen um  $\lambda = 440 \text{ nm}$  und  $\lambda = 490 \text{ nm}$ . **b)** Fotografie des Versuchsaufbaus zur Erzeugung eines Temperaturgradienten über einen Objektträger hinweg. Zur Verdeutlichung, wo sich die mit Laurdan gefärbten Proben während des Experiments befinden, wurde der Fotografie eine fluoreszente Aufnahme des Probenbereichs überlagert. **c)** GP Werte adhärennter und suspendierter Zellen in einem physiologischen Temperaturbereich. Die Daten der adhärennter Zellen entstammen der Mikroskop Aufnahme aus **e)** und stellen Mittelwerte einzelner Zellen dar, welche weiter zu einem mittleren GP-Wert pro Temperaturintervall zusammengefasst wurden. **d)** Fluoreszenz Aufnahme von synthetischen Lipidvesikeln verschiedener Kompositionen. Zwei Proben zeigen im betrachteten Temperaturintervall einen scharfen Phasenübergang, welcher durch eine sprunghafte Änderung der Emissionsfarbe indiziert wird. **e)** Mit Laurdan gefärbte HeLa-Zellmembranen im gleichen Temperaturgradienten wie die Vesikel in **d)**. Im Gegensatz zu den synthetischen Membranen ist der farbliche Wechsel, welcher die Änderung der Lipidordnung mit der Temperatur widerspiegelt, kontinuierlicher.

#### 4.2.2. Messtechnische Einflussfaktoren auf die optische Analyse adhärenter Zellen

Die Untersuchung adhärenter Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht eine räumlich aufgelöste Analyse der Lipidordnung, sodass sowohl einzelne Zellen miteinander verglichen als auch Variationen innerhalb einer Zelle detektiert werden können. Um die Temperaturabhängigkeit der Lipidordnung im gleichen Detailgrad auflösen zu können, müssen ein und dieselben Zellen mehrmals bei verschiedenen Temperaturen vermessen werden. Dadurch sind die Zellmembranen einer erhöhten Exposition ultravioletter Strahlung ausgesetzt, welche für die Anregung von Laurdan notwendig ist, aber auch Einfluss auf den Phasenzustand der untersuchten Membranen nimmt.

Die mittlere Änderung der Lipidordnung pro Zelle, welche durch die Belichtung im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie bei konstanter Temperatur induziert wird, ist in Abbildung 28 a) dargestellt. Mit steigender Zahl an Belichtungen nehmen der GP-Wert und damit die Lipidordnung zu. Durch lineare Approximation der Daten wurde eine mittlere GP-Änderung von  $\Delta GP = 0,0036$  pro Belichtung bestimmt. Im Rahmen der Analyse der interzellulären Variation der Lipidordnung in nachfolgendem Kapitel 4.2.3 wurde jeder Messwert einzelner Zellen mithilfe dieses Faktors abhängig von der Zahl der Belichtungen korrigiert.

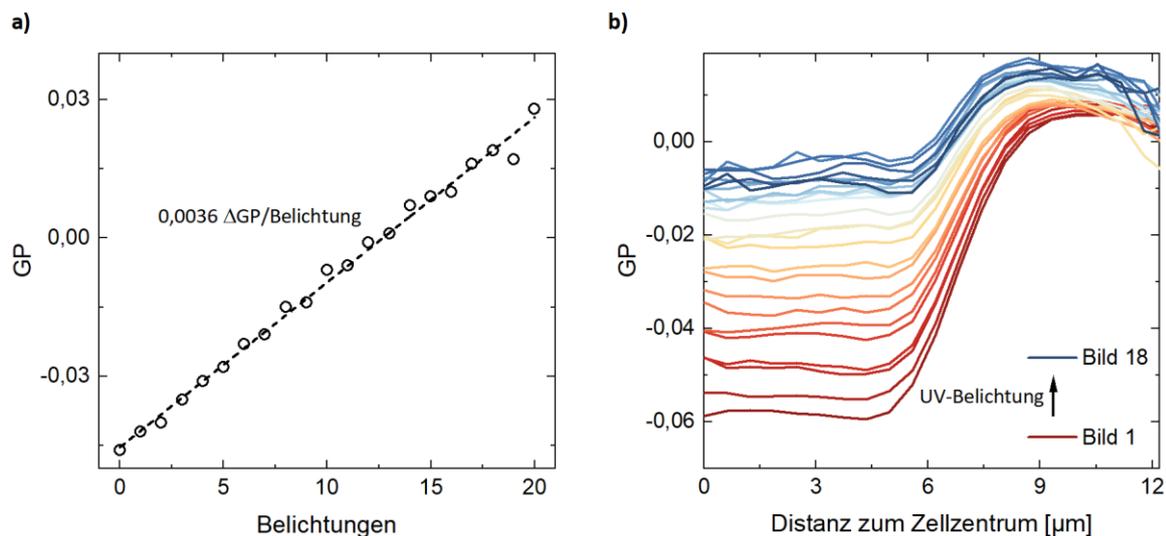


Abbildung 28 UV-induzierte Änderung der Lipidordnung in Membranen von HeLa-Zellen bei konstanter Temperatur. **a)** Mittelwert der GP-Werte mehrerer hundert Zellen als Funktion der Anzahl an Belichtungen, welche zur Aufnahme eines Fluoreszenzbildes notwendig sind. Die mittels linearer Approximation bestimmte GP-Änderung wurde zur Korrektur der UV-induzierten Lipidordnungsänderung in Abbildung 29 verwendet. **b)** Der GP-Wert innerhalb einzelner Zellmembranen als Funktion des Abstands vom Zellzentrum nach mehreren Messungen mittels Fluoreszenzmikroskopie. Das ultraviolette Anregungslicht induziert eine stärkere Änderung der zellulären Lipidordnung nahe dem Zellzentrum im Vergleich zu äußeren Membranbereichen. Der abgebildete Datensatz dient der Korrektur im Rahmen der intrazellulären Untersuchung der Lipidordnung in Abbildung 30 d).

Der Effekt der UV-induzierten Lipidordnungsänderung tritt nicht homogen innerhalb einer einzelnen Zellmembran auf, wie eine detaillierte Analyse der Lipidordnung in Abbildung 28 b) zeigt. Abgebildet ist der GP-Wert als Funktion des Abstands vom Zellzentrum, welches über den Schwerpunkt aller Zellpixel bestimmt wurde. Die jeweiligen Werte entsprechen der Mittelung der Pixel mehrerer hundert Zellmembranen. Die Analyse zeigt, dass die Lipidordnung im Zellzentrum durch UV-Exposition stärker zunimmt als in den Randbereichen einer Zelle. Im Rahmen der Untersuchung der intrazellulären Variation der Lipidordnung in Kapitel 4.2.4 wurden die GP-Werte mittels der Daten aus Abbildung 28 b) in Abhängigkeit der Belichtungen und der Pixelposition korrigiert.

### 4.2.3. Interzelluläre Variation der Lipidordnung

Die Streuung der Lipidordnung und deren Temperaturabhängigkeit von Zelle zu Zelle wurden analysiert, indem mittels Fluoreszenzmikroskopie der GP-Wert adhärenter Zellen pixelweise bei verschiedenen Temperaturen bestimmt wurde. Jeder Zelle einer Population wurde dann ein Ordnungswert durch Mittelung aller Zell-Pixel-GP-Werte zugeschrieben. Die Verteilung dieser Werte ist in Form eines Histogramms in Abbildung 29 a) als Funktion der Temperatur dargestellt. Wie erwartet, verschieben sich die Verteilungen mit sinkender Temperatur zu höheren GP-Werten, also einer erhöhten Lipidordnung. Die zweite Beobachtung ist, dass selbst bei konstanter Temperatur die GP-Werte mit einer Halbwertsbreite des Histogramms von  $\Delta GP = 0,08$  streuen, was mithilfe der in Abbildung 27 c) bestimmten Steigung von  $dGP/dT = -0,013 \text{ K}^{-1}$  in eine äquivalente Temperaturänderung von  $\Delta T = 6,2 \text{ K}$  konvertiert werden kann. Um eine Einschätzung treffen zu können, inwieweit die interzelluläre Variation der Lipidordnung die Breite der kollektiven Übergänge, welche in Kapitel 4.1 diskutiert wurden, bedingen könnte, wird im Folgenden auf Basis eines einfachen Zweizustandsmodells ein Wert für die Schmelztemperatur  $T_m$  der einzelnen Zellen hergeleitet.

Grundvoraussetzung für diese Analyse ist, dass bei der Bestimmung des temperaturabhängigen GP-Werts dieselben Zellen bei mehreren Temperaturen vermessen wurden. Somit kann nicht nur die Lipidordnung, sondern auch ihre Temperaturabhängigkeit auf Einzelzellniveau untersucht werden. Aufgrund der mehrfachen UV-Exposition der Zellen, welche den GP-Wert ebenfalls beeinflusst, wurde für jede Zelle und jede Belichtung eine GP-Korrektur vorgenommen, wie im vorherigen Kapitel 4.2.2 näher beschrieben wurde.

Für die Anwendbarkeit des Zweizustandsmodells, im Rahmen dessen Lipide entweder einen geordneten oder einen ungeordneten Zustand annehmen können, betrachten wir im Folgenden statt des GP-Werts dessen Transformation auf die Lipidordnung  $LO$ . Die jeweiligen Wertebereiche  $W$  sind:

$$W(GP) = [-1, 1] \text{ und } W(LO) = W\left(\frac{GP}{2} + 1\right) = [0, 1].$$

Der Anteil an Lipiden im ungeordneten Zustand beträgt demnach  $1 - LO$ . Die Lipidordnung als Funktion der Temperatur mehrerer hundert Zellen sowie deren Mittelwert und Standardabweichung ist in Abbildung 29 b) dargestellt. Der Vergleich der Einzelkurven mit einem im selben Graphen abgebildeten Datensatz einer Zellsuspension zeigt, dass der Phasenübergang einzelner Zellen nicht schärfer ist als der der Kollektivmessung. Der Versatz der Suspensionsmessung gegenüber der Kurvenschar adhärenter Zellen ist größtenteils durch die Denaturierung der suspendierten Zellen bedingt (siehe Kapitel 4.2.1).

Durch Auftragung der Einzelzelldaten in der Form  $\ln(LO/(1-LO))$  gegen  $1/RT$  können aus den Steigungen gemäß der Van't Hoff Gleichung (siehe Kapitel 2.1)

$$\frac{\partial(\ln(\frac{LO}{1-LO}))}{\partial T} = \frac{\Delta H^0}{RT^2}$$

die einzelnen Schmelzenthalpien  $\Delta H^0$  berechnet werden, was beispielhaft an den Messpunkten einer Zelle in Abbildung 29 c) vollzogen wurde.

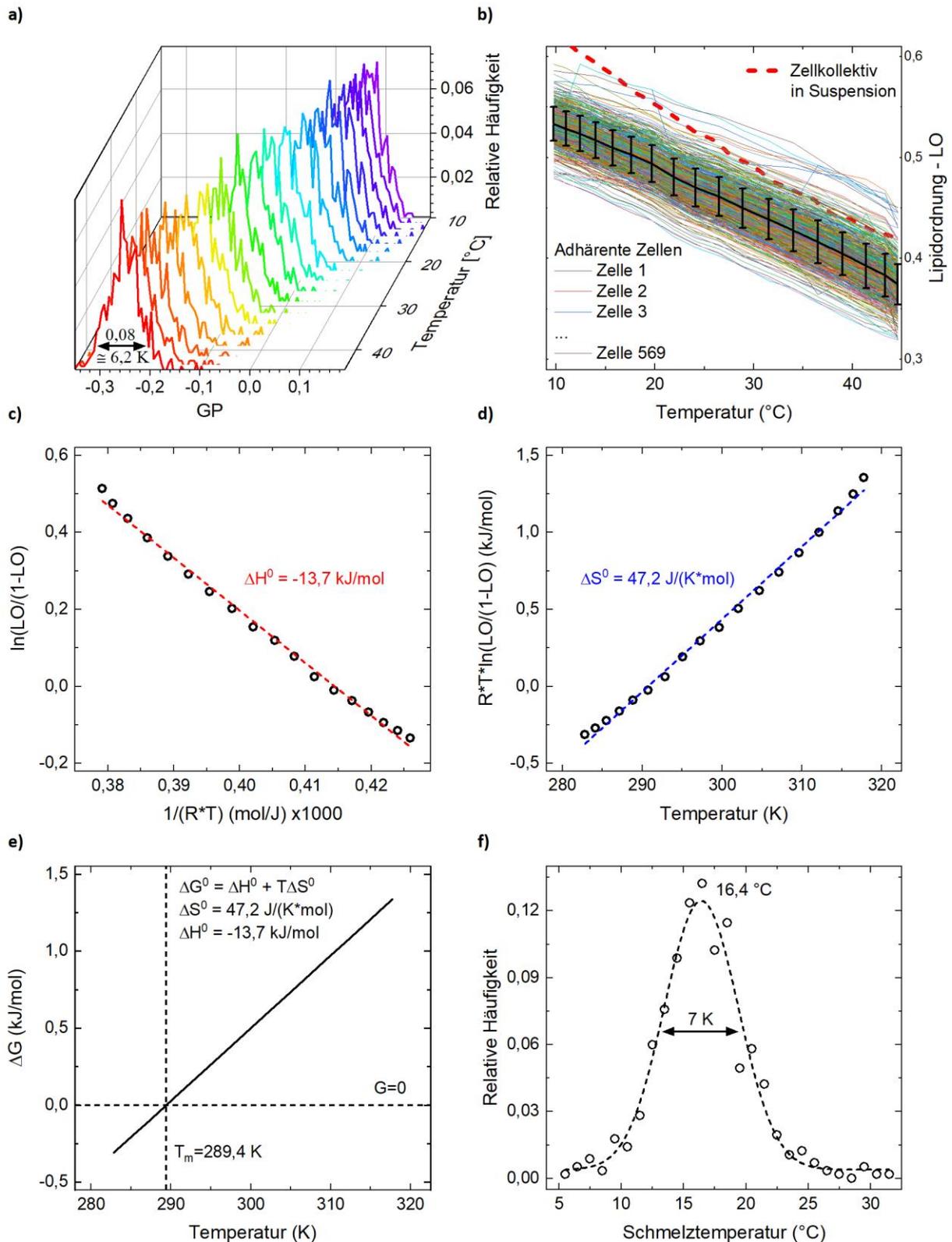


Abbildung 29 Die Temperaturabhängigkeit der Lipidordnung einzelner Zellmembranen. **a)** Verteilung der mittleren GP-Werte einzelner Zellmembranen als Funktion der Temperatur. Mit abnehmender Temperatur nimmt die Lipidordnung und damit der GP-Wert zu. Auch bei konstanter Temperatur weisen Zellen aufgrund biologischer Vielfalt verschieden geordnete Membranen auf. Die Halbwertsbreite von  $\Delta \text{GP} = 0,08$  entspricht einer Temperaturänderung von  $\Delta T = 6,2 \text{ K}$ . **b)** Die Lipidordnung LO und deren Mittelwert und Standardabweichung einzelner Zellen berechnet durch  $(\text{GP}+1)/2$  als Funktion der Temperatur. Des Weiteren die kollektive Lipidordnung LO einer Zellpopulation gemessen an einer Zellsuspension. **c)** Auftragung des Logarithmus der Lipidordnung einer einzelnen Zelle gegen die inverse Temperatur. Die mittels linearer Approximation ermittelte Steigung entspricht der Schmelzenthalpie  $\Delta H$ . **d)** Die logarithmische Lipidordnung einer einzelnen Zelle als Funktion

der Temperatur. Die Schmelzentropie  $\Delta S$  wurde durch lineare Approximation der Daten bestimmt. e) Die freie Schmelzenthalpie  $\Delta G$  der Membranlipide einer Einzelzelle bestimmt aus den Daten von c) und d) als Funktion der Temperatur. Bei der Schmelztemperatur  $T_m$  ist  $\Delta G = 0$ . f) Verteilung der Schmelztemperaturen  $T_m$  innerhalb einer Zellpopulation. Die Näherung der Daten durch eine Gauß-Funktion ergibt eine Zentrierung um den Wert  $T_m = 16,4$  °C und eine Halbwertsbreite von  $\Delta T_m = 7$  K.

Weil am Phasenübergang, also bei  $T = T_m$  gilt, dass

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = 0 \leftrightarrow \Delta H^0 = T\Delta S^0$$

kann die Van't Hoff Gleichung umgeformt werden zu

$$\frac{\partial(RT \ln(\frac{LO}{1-LO}))}{\partial T} = \Delta S^0.$$

Durch Auftragung von  $R T \ln(LO/(1-LO))$  gegen  $T$  (siehe Abbildung 29 d)) kann demnach die Schmelzentropie  $\Delta S^0$  aus der Steigung ermittelt werden.

In Abbildung 29 e) ist die freie Enthalpie  $\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$  aus den zuvor ermittelten Werten für die Schmelzenthalpie  $\Delta H^0$  und die Schmelzentropie  $\Delta S^0$  als Funktion der Temperatur gezeigt. Die Phasenübergangstemperatur  $T_m$  befindet sich bei  $\Delta G^0 = 0$ . Analog dazu wurde für alle einzelnen Zellen der Messung eine Schmelztemperatur  $T_m$  berechnet, deren Verteilung in Abbildung 29 f) dargestellt ist. Die Approximation mittels einer Gauß-Funktion ergibt eine Halbwertsbreite der Verteilung von 7 K und eine Zentrierung der Verteilung um  $T_m = 16,4$  °C. Letzterer Wert stimmt mit der kollektiven Phasenübergangstemperatur von  $T_m = 16,9$  °C der suspendierten HeLa-Zellen (siehe Abbildung 23 a)) sehr genau überein. Die Streuung der GP-Werte bei konstanter Temperatur in Abbildung 29 a) von  $\Delta GP = 0,08$  oder einer äquivalenten Temperaturänderung von  $\Delta T = 6,2$  K entsprechen in etwa der Streuung der Schmelztemperaturen von  $\Delta T_m = 7$  K aus Abbildung 29 f). Es ist daher wahrscheinlich, dass die beobachtete Diversität der Lipidordnung innerhalb einer Zellpopulation im physiologischen Temperaturbereich, welcher für alle Zellen aufgrund ihres breiten Phasenübergangs in etwa dem Schmelzregime entspricht (siehe Abbildung 27 a)), aus der Streuung der Phasenübergangstemperaturen resultiert.

Die Breite und geringe Kooperativität der in Kapitel 4.1 gemessenen Phasenübergänge in Zellkollektiven kann nicht alleine durch die Streuung der Lipidordnung von Zelle zu Zelle erklärt werden, da die GP-Profile der Einzelzellen in Abbildung 29 a) auch keinen scharfen Übergang aufweisen. Ob letztere Beobachtung auf Variationen der Lipidordnung und deren Temperaturabhängigkeit innerhalb einer Zellmembran zurückgeführt werden kann, wird im nächsten Kapitel diskutiert.

#### 4.2.4. Intrazelluläre Variation der Lipidordnung

Inwieweit eine differenzierte Betrachtung der Lipidordnung innerhalb einzelner Zellmembranen sinnvoll ist, wird in der exemplarischen Darstellung einer HeLa-Zelle in Abbildung 30 a) ersichtlich, in der für jeden Pixel des Fluoreszenzbildes in Abbildung 30 b) der entsprechende GP-Wert berechnet wurde. Es ist eine deutliche Abnahme der Lipidordnung hin zum Zellzentrum zu erkennen. Die radiusabhängige Auswertung in Abbildung 30 c) zeigt, dass der GP-Wert als Maß der Lipidordnung innerhalb einzelner Zellen um bis zu  $\Delta GP = 0,2$  variieren kann. Mit der mittleren Temperaturabhängigkeit von  $dGP/dT = -0,013$  K (siehe Abbildung 27 c)) entspricht das einer Temperaturvariation von 15 K.

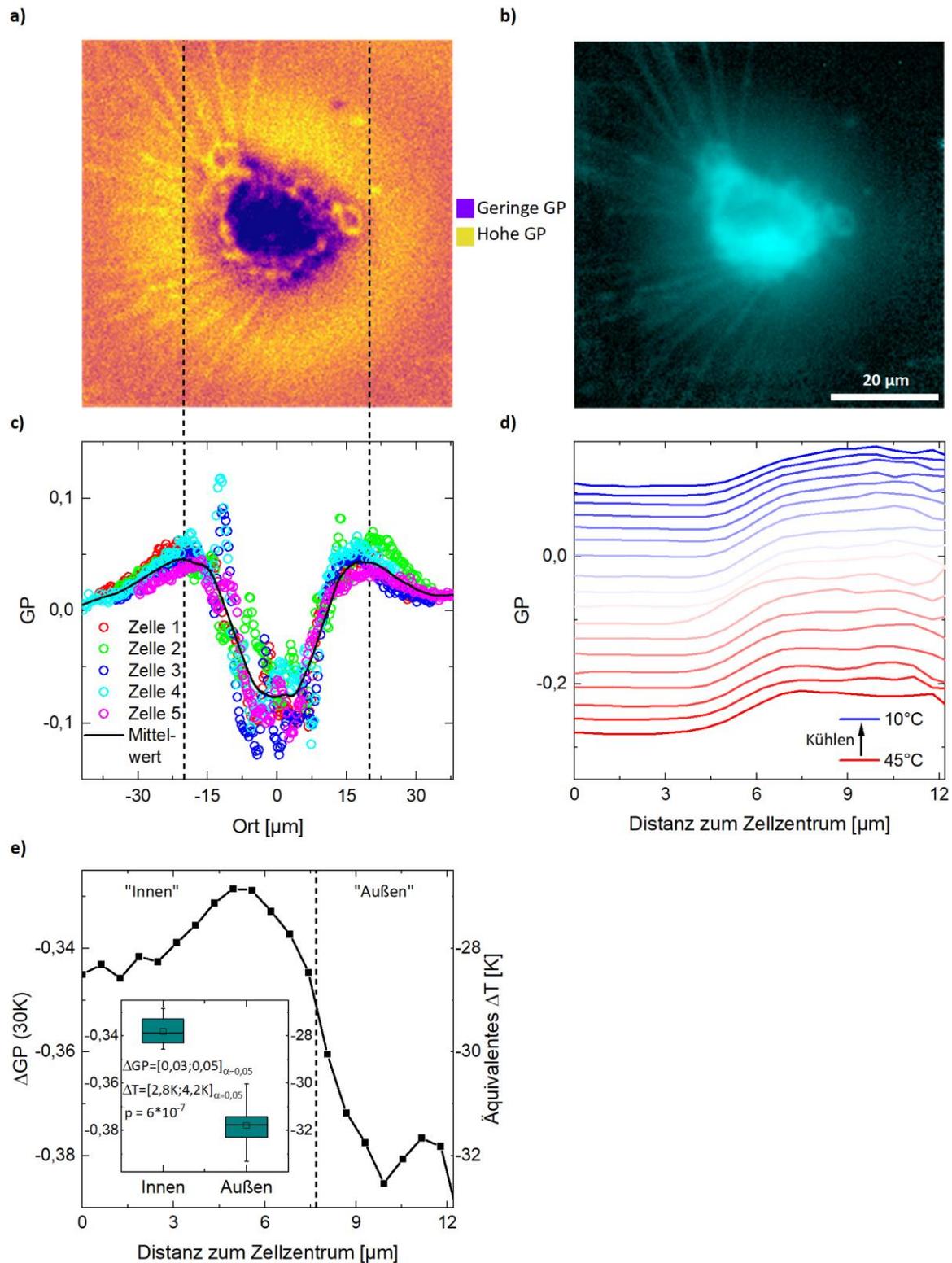


Abbildung 30 Die Temperaturabhängigkeit der Lipidordnung innerhalb einzelner Zellmembranen. **a)** GP-Darstellung der HeLa-Zellmembran aus **b)**. Gelbe Pixel entsprechen einer hohen Lipidordnung, violette einer niedrigen. **b)** Aufnahme einer mit Laurdan gefärbten HeLa-Zelle mittels Fluoreszenzmikroskopie. **c)** GP-Werte als Funktion des Abstands vom Zellzentrum fünf verschiedener Zellmembranen und deren Mittelwert. Die gestrichelten Linien stellen den räumlichen Bezug zwischen dem Diagramm und der Beispielzelle aus **a)** her. **d)** Temperaturabhängigkeit der Lipidordnung innerhalb einzelner Zellen als Funktion der Temperatur und der Distanz zum Zellzentrum. Die Graphen entsprechen der Mittelung über die Pixeldaten mehrerer hundert Zellen. **e)** Änderung der Lipidordnung  $\Delta\text{GP}$  innerhalb einzelner Zellmembranen über ein Temperaturintervall von 30 K. Ab einer Entfernung von etwa 7,5  $\mu\text{m}$  vom Zellzentrum fällt die Änderung stärker aus als im Zellinneren. Durch Zusammenfassung der Werte über und unter 7,5  $\mu\text{m}$  kann eine mittlere Ordnungsänderung für die Bereiche „Innen“ und „Außen“ bestimmt

*werden. Die Differenz beider Mittelwerte unterscheidet sich auf einem Signifikanzniveau von 95 % um mehr als  $\Delta GP = 0,03$ , was einer Temperaturdifferenz von 2,8 K entspricht.*

Zur Untersuchung, ob auch die Temperaturabhängigkeit der Lipidordnung intrazellulär variiert, wurden einzelnen HeLa-Zellen bei variierender Temperatur mehrmals fluoreszenzmikroskopisch vermessen. Um durch das Anregungslicht induzierte GP-Änderungen, welche abhängig von der Lokalisierung in der Zelle unterschiedlich stark ausfallen (siehe Kapitel 4.2.2), zu berücksichtigen, wurden die erhobenen Daten mithilfe der Referenzmessung in Abbildung 28 b) korrigiert. Der GP-Wert als Funktion des Abstands vom Zellzentrum ist in Abbildung 30 d) als Mittelwert mehrerer hundert Zellen bei verschiedenen Temperaturen dargestellt. Zunächst fällt auf, dass sich die Temperaturabhängigkeit der Lipidordnung in den inneren und äußeren Zellmembranbereichen nicht stark voneinander unterscheidet. Das bedeutet, dass auch innerhalb einzelner Membranen kein schärferer Phasenübergang detektiert werden konnte als in der Betrachtung der Zellmittelwerte in Abbildung 29 b). Erst der Vergleich der Lipidordnung über ein Temperaturintervall von 30 K offenbart Unterschiede der Temperaturabhängigkeit von GP zwischen verschiedenen Positionen innerhalb der Membranen (siehe Abbildung 30 e)).

Durch Abkühlen der Zellmembranen ändert sich der GP-Wert im Inneren um  $\Delta GP = 0,34$ , was einer mittels der Steigung von  $dGP/dT = -0,013 \text{ K}^{-1}$  (siehe Abbildung 27 c)) berechneten Temperaturänderung von  $\Delta T = 28 \text{ K}$  entspricht. Dagegen fällt die Änderung oberhalb einer Distanz von  $7,5 \mu\text{m}$  vom Zellzentrum mit  $\Delta GP = 0,38$  oder  $\Delta T = 32 \text{ K}$  höher aus. Ein Zweistichproben-t-Test ergibt, dass die Differenz der Mittelwerte auf einem Signifikanzniveau von 95% mindestens  $\Delta\Delta GP = 0,03$  oder  $\Delta\Delta T = 2,8 \text{ K}$  beträgt. Demnach reagiert die Lipidordnung von Bestandteilen der äußeren Membran stärker auf Änderungen der Temperatur als Membranen im Zellinneren.

Die Beobachtung, dass die Lipidordnung innerhalb einer Zelle räumlich stark variiert, deckt sich mit Ergebnissen aus der Literatur. Grund dafür ist unter anderem, dass Laurdan nicht nur die äußere Zellmembran, die Plasmamembran, färbt, sondern nach einiger Zeit internalisiert wird und auch in Membranen von Zellorganellen eingebettet wird [60,61]. Diese sind wiederum unterschiedlich stark geordnet, wobei beispielsweise der Golgi-Apparat, die Mitochondrien und Endosome, einen geringeren GP-Wert als die Plasmamembran aufweisen [62]. Die Nähe dieser Organellen zum Zellzentrum erklärt die Zunahme des GP-Werts hin zum Zellrand in Abbildung 30 a). Dass die leicht unterschiedliche Sensitivität der Lipidordnung gegenüber Temperaturänderungen im Zellinneren und am Rand der Zelle auch auf die Präsenz verschiedener Zellorganellen mit unterschiedlichen Membranzusammensetzungen zurückgeführt werden kann, erscheint plausibel.

Die Resultate aus Kapitel 4.1, wonach sich die Phasenübergänge zellulärer Membranen über einen Temperaturbereich von etwa 60 K erstrecken und etwa 20-mal weniger kooperativ als Übergänge in synthetischen Membranen sind, konnten nicht durch eine interzelluläre Streuung der Lipidordnung erklärt werden. Konkret wurde nicht beobachtet, dass Phasenübergänge einzelner Zellmembranen kooperativer sind als die eines Zellkollektivs. Auch auf Längenskalen innerhalb einzelner Zellen, welche durch Epifluoreszenz-Mikroskopie zugänglich sind, konnten keine schärferen Übergänge detektiert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass biologische Membranen aufgrund ihrer Heterogenität grundsätzlich keine stark kooperativen Phasenübergänge durchlaufen können. Gegen diese Hypothese spricht eine jüngere Studie, im Rahmen derer sprunghafte Änderungen der Lipidordnung in den Plasmamembranen von Nervenzellen detektiert wurden, welche sich über ein Temperaturintervall von weniger als einem Kelvin vollzogen [63]. Im Vergleich zu den hier beschriebenen Messungen wurden dabei Membrankompartimente in der Größe eines Quadratmikrometers mittels Konfokalmikroskopie untersucht. Solche scharfen Übergänge könnten durch eine Entmischung der Membran auf

mikroskopischer Ebene und der damit verbundenen Bildung einzelner, homogener Lipidflöße hoher Kooperativität (englisch „Lipid rafts“) erklärt werden [64].

#### 4.2.5. Fazit

Durch die Analyse der Lipidordnung und deren Temperaturabhängigkeit einzelner Zellmembranen konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden:

- Die Temperaturabhängigkeit der Lipidordnung adhärenter Membranen entspricht in etwa der von Zellen in Suspension.
- Die Exposition biologischer Membranen zu ultraviolettem Licht erhöht die Lipidordnung, wobei der Effekt im Zellzentrum stärker ausfällt.
- Innerhalb einer Zellpopulation beträgt die Streuung der Lipidordnung einzelner Zellen bei konstanter Temperatur  $\Delta GP = 0,08$ , was einer Temperaturstreuung von  $\Delta T = 6,2$  K entspricht.
- Die Phasenübergänge einzelner Zellmembranen sind in etwa genauso kooperativ wie die gemessen an Zellkollektiven.
- Die Schmelztemperaturen einzelner Zellmembranen streuen um einen Wert von  $T_m = 16,4$  K in einem Bereich von  $\Delta T_m = \pm 3,5$  K.
- Die Variation der Lipidordnung innerhalb einer Zellmembran beträgt bis zu  $\Delta GP = 0,2$ , was einer Temperaturvariation von  $\Delta T = 15$  K entspricht.
- Die Abhängigkeit der Lipidordnung von der Temperatur innerhalb einer Zelle variiert nur leicht, sodass auch intrazellulär keine scharfen Phasenübergänge beobachtet werden konnten.

### 4.3. Poröser Membrantransport in Zellen

Nachdem die zelluläre Lipidordnung und deren Variation zwischen einzelnen, aber auch innerhalb einzelner Zellen und deren Empfindlichkeit gegenüber diversen Umwelteinflüssen wie Temperatur, pH-Wert und Anästhetika in den ersten beiden Kapiteln eingehend untersucht wurden, beschäftigt sich dieses Kapitel mit der Frage, ob die beobachteten Phänomene eine Funktionalität für den Organismus mit sich bringen.

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden durch die Beobachtungen an synthetischen Membranen inspiriert, welche am Phasenübergang eine stark erhöhte Permeabilität aufweisen (siehe Abbildung 7). Wenn ein ähnlicher Zusammenhang für Zellmembranen bestünde, wäre eine Zelle in der Lage, den eigentlich passiven Prozess der Diffusion von Molekülen über die Membran hinweg durch Anpassung ihrer Lipidordnung zu regulieren. Dass eine solche aktive Änderung des Membranzustands möglich ist, konnte durch die Adaptation von HeLa-Zellen an verringerte Wachstumstemperaturen in Kapitel 4.1.4 gezeigt werden.

Die Permeabilität zellulärer Membranen wurde durch die Exposition von HeLa-Zellen zu den Fluoreszenzfarbstoffen Rhodamin B und Hoechst 33342 und anschließender Messung der intrazellulären Fluoreszenzintensität mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt (siehe Kapitel 3.5.2). Um auf eine Korrelation der Membranpermeabilität und der Lipidordnung zu testen, wurden die zu untersuchenden Zellmembranen zuvor mittels Laurdan angefärbt, um in denselben Experimenten neben der Permeabilität auch die Lipidordnung durch optische Analyse untersuchen zu können (siehe Kapitel 3.5.1).

Bei der Verwendung von Rhodamin B als Permeabilitätssonde müssen dessen temperaturabhängige Quanteneffizienz und dessen Wechselwirkungen mit der Lipidordnung berücksichtigt werden. Zu Beginn sollen diese Einflussgrößen quantifiziert und daraus eine Korrektur für die anschließend beschriebenen Experimente hergeleitet werden.

Die nachfolgend diskutierten Daten des Kapitels 4.3. entstammen der Publikation „Transport across cell membranes is modulated by lipid order“ [65] von Nicolas Färber, Jonas Reitler, Julian Schäfer sowie Christoph Westerhausen und sind Teil der Bachelorarbeit von Julian Schäfer und der Masterarbeit von Jonas Reitler.

#### 4.3.1. Messtechnische Einflussfaktoren der Permeabilitätsmessung mit Rhodamin B

Der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B wird aufgrund der starken Temperaturabhängigkeit seiner Quantenausbeute auch für optische Temperaturmessungen zum Beispiel in mikrofluidischen Systemen eingesetzt [66,67]. Die Fluoreszenzintensität von Rhodamin B, normiert auf den Intensitätswert bei  $T = 22\text{ °C}$ , ist als Funktion der Temperatur in Abbildung 32 a) dargestellt. Seine Quantenausbeute halbiert sich bei einer Erhöhung der Temperatur um etwa 20 K. Da die Permeabilitätsmessungen an Zellmembranen bei den Temperaturen  $T = 10\text{ °C}$ ,  $22\text{ °C}$  und  $37\text{ °C}$  stattfanden, wurden die gemessenen Intensitätswerte bei  $T = 10\text{ °C}$  und  $T = 37\text{ °C}$  entsprechend der temperaturabhängigen Quantenausbeute um einen Faktor 1,5 bzw. 0,6 korrigiert.

Rhodamin B wurde aufgrund des geringen Überlapps seines Emissionsspektrums mit dem von Laurdan (siehe Abbildung 16) zur simultanen Analyse von Lipidordnung und Permeabilität ausgewählt. Auch wenn mit den verwendeten Filtersätzen (siehe Abbildung 16) kein Emissionslicht von Rhodamin B durch Übersprechen die Messung der Lipidordnung beeinflussen kann, ist es dennoch möglich, dass

das Emissionslicht von Laurdan durch Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) verfälscht wurde. Die Voraussetzung für diesen Effekt, der Überlapp des Emissionsspektrums von Laurdan (Donor) mit dem Absorptionsspektrum von Rhodamin B (Akzeptor) ist gegeben. Außerdem könnten Laurdanmoleküle in ungeordneter Umgebung und damit einhergehender grünlicher Emission eine höhere Wahrscheinlichkeit für FRET aufgrund des größeren spektralen Überlapps aufweisen als Laurdanmoleküle, welche in geordnete Membrankompartimente eingebettet sind und deswegen bläulich emittieren. Dies hätte zur Folge, dass das Fluoreszenzsignal im  $\lambda = 490$  nm Kanal stärker reduziert würde als im  $\lambda = 440$  nm Kanal und der gemessene GP-Wert von Membranen durch Rhodamin B Exposition erhöht würde. Eine Verfälschung der zellulären GP-Werte aufgrund von phasenzustandsabhängigem FRET wird durch den nachfolgenden Vergleich der experimentellen Beobachtungen in Abbildung 32 c) und theoretisch zu erwartenden FRET bedingten GP-Änderungen in Abbildung 31 widerlegt.

Der schwarze Graph in Abbildung 31 a) zeigt den GP-Wert einer unbeeinflussten optischen Messung als Funktion verschiedener Lipidordnungszustände. Die Reduktion der Intensität bei  $\lambda = 490$  nm beispielsweise durch Interaktion mit Rhodamin B via wellenlängenabhängigem FRET würde eine Erhöhung des GP Werts bewirken (roter Graph). Eine Absorption der Laurdanfluoreszenz bei  $\lambda = 440$  nm durch Rhodamin B Absorption würde dagegen eine Reduktion von GP bewirken (grüner Graph). Die blaue und die violette Kurve zeigen die Abweichungen des gemessenen GP-Werts von der Referenz bei einer Beeinflussung beider Wellenlängen  $\lambda = 440$  nm und  $\lambda = 490$  nm. Die Faktoren 0,5 und 0,75 wurden zur Verdeutlichung des FRET-Effekts gewählt und fielen im Experiment deutlich geringer aus. Unabhängig davon welcher Wellenlängenbereich stärker reduziert wird, bewirkt phasenzustandsabhängiger FRET besonders im Bereich um GP = 0 eine Veränderung des Messwerts. Dieser Effekt ist besonders deutlich in Abbildung 31 b) zu erkennen, welche die jeweilige GP-Änderung  $\Delta GP$  im Vergleich zur unbeeinflussten Messung zeigt.

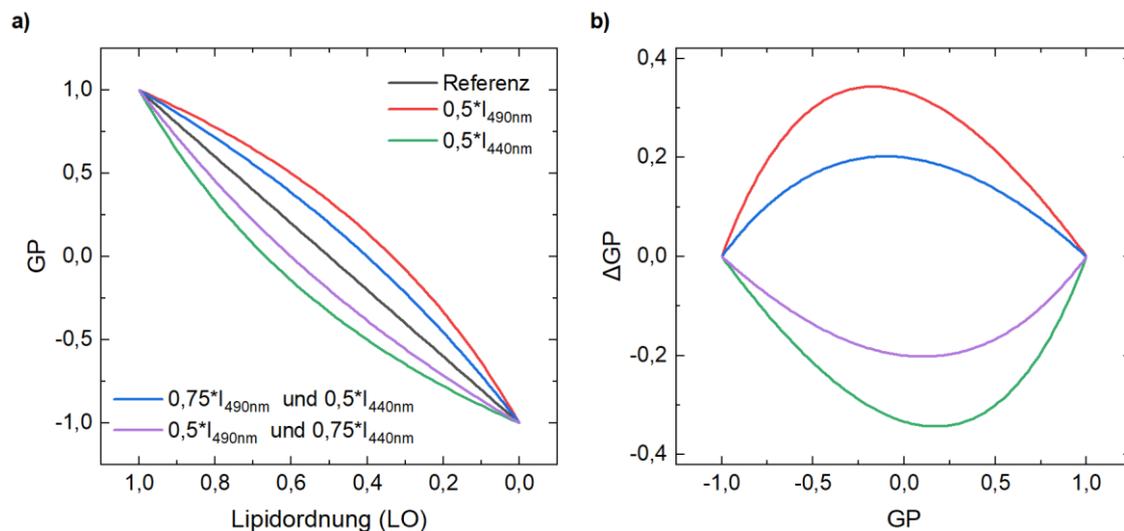


Abbildung 31 Beeinflussung des GP-Werts durch unterschiedlich starke Dämpfung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei  $\lambda = 440$  nm und  $\lambda = 490$  nm. a) GP als Funktion verschiedener Ordnungszustände. Eine Reduktion der Intensität bei  $\lambda = 490$  nm gegenüber  $\lambda = 440$  nm bewirkt eine Erhöhung des GP-Werts und vice versa. b) Die induzierten GP-Änderungen fallen für Ordnungszustände mit GP = 0 am stärksten aus.

Die GP-Änderung, welche durch die Exposition von Zellmembranen zu Rhodamin B induziert wird, zeigt Abbildung 32 b). Der Graph stellt die Differenz der GP-Werte von HeLa-Zellen vor und nach dem Kontakt mit Rhodamin B als Funktion der intrazellulären Rhodamin B-Intensität dar. Nahezu unabhängig von der aufgenommenen Menge an Rhodamin B ist der GP-Wert im Mittel um etwa  $\Delta GP = 0,1$  erhöht. Es zeigt sich lediglich eine leichte Zunahme der GP-Änderung mit zunehmender Intensität von 0,0001 GP/count.

Die geringe Abhängigkeit der Lipidordnungsänderung von der intrazellulären Rhodamin B-Konzentration deutet darauf hin, dass eine Anlagerung des Farbstoffs an die Zellmembran stattfindet, da so trotz geringer Volumenkonzentration lokal eine Anreicherung und damit auch eine stärkere Interaktion mit der Membran möglich ist. Ob es sich bei dieser Interaktion um eine Wechselwirkung von Rhodamin B direkt mit Laurdan via FRET oder um eine tatsächliche Veränderung der Lipidordnung handelt, kann durch die Analyse in Abbildung 32 c) genauer untersucht werden. Abgebildet sind die durch Rhodamin B induzierten Zustandsänderungen an Zellmembranen der Daten aus Abbildung 32 b) als Funktion der Lipidordnung vor der Rhodamin B-Exposition.

Es ist eine deutliche Abhängigkeit der GP-Wertänderung vom initialen GP-Wert erkennbar. Der GP-Wert ungeordneter Membranen wird durch Rhodamin B stärker erhöht als der von Zellen mit einem GP-Wert nahe  $GP = 0$ . Der Vergleich mit den simulierten  $\Delta GP$ -Werten in Abbildung 31 b) zeigt jedoch, dass unabhängig von der Art der Beeinflussung eine direkte Interaktion von Rhodamin B mit Laurdan vor allem Zellen mit  $GP = 0$  beeinflussen sollte. FRET scheint daher bei der durch Rhodamin B induzierten Phasenzustandsänderung eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die wahrscheinliche Anlagerung von Rhodamin B an zelluläre Membranen deutet auf eine elektrostatische Wechselwirkung hin. Während zelluläre Membranen vorwiegend negativ geladen sind, ist Rhodamin B bei einem pH Wert von 7,4 zwitterionisch. Dass die Wechselwirkung von geladenen Membranen mit Ionen zu einer Änderung der Lipidordnung führen kann, ist aus der Literatur bekannt [21].

Nachdem die Auswirkungen der Permeabilitätssonde auf die Lipidordnung charakterisiert wurden, kann der Zusammenhang, der eigentlich im Fokus der Betrachtung steht, nämlich die Aufnahme von Rhodamin B als Funktion der Lipidordnung, durch eine Auftragung der Rhodamin B-Intensität gegen GP untersucht werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 32 d) dargestellt, wobei die Farbstoffaufnahme als Funktion der Lipidordnung vor und nach der Farbstoffexposition gezeigt ist.

Beide Graphen zeigen qualitativ den gleichen Verlauf. Es ist eine Zunahme der Rhodamin B-Intensität mit steigendem GP-Wert zu erkennen. Lediglich der GP-Wertebereich nach der Farbstoffzugabe ist vergleichsweise gestaucht und nach rechts verschoben. Der Grund dafür ist die in Abbildung 32 c) dargestellte GP-abhängige Lipidordnungsänderung, im Rahmen derer Werte nahe  $GP = 0$  unverändert bleiben und niedrige GP-Werte erhöht werden.

Zur Abschätzung, ob die zunehmende Permeabilität mit steigendem GP-Wert ein Artefakt aus der Rhodamin B-bedingten GP-Erhöhung in Abbildung 32 b) ist, können die Steigungen der linearen Approximationen verglichen werden. Um den in Abbildung 32 d) beobachteten Effekt durch eine Rhodamin B-bedingte GP-Änderung zu bewirken, müsste eine Zunahme der Intensität von 57 counts eine GP-Änderung von 1 bewirken, also  $1/57 = 0,018$  GP/count. Die beobachtete Effektstärke der Rhodamin B-induzierten GP-Änderung beträgt jedoch nur 0,0001 und ist damit 180-mal kleiner.

Weil sich die Ergebnisse in Abbildung 32 d) lediglich durch den GP-Wertebereich, nicht jedoch qualitativ unterscheiden, wurde in den folgenden Experimenten auf die Messung des GP-Werts vor der Farbstoffexposition verzichtet, um den experimentellen Aufwand und die damit verbundenen Fehlerquellen gering zu halten. Die gemessenen GP-Werte wurden jedoch mittels der linearen Approximation aus Abbildung 32 c) korrigiert, um die Ausprägung des Effekts der zunehmenden Farbstoffaufnahme mit steigender Lipidordnung nicht zu überschätzen.

Der Transport extrazellulärer Moleküle in das Zellinnere kann sowohl diffusiv durch Poren als auch durch Membraneinstülpung, also vesikulärer Aufnahme, erfolgen. Die Aufnahme von Rhodamin B erfolgte wahrscheinlich auf beiden Wegen, wie die Detailaufnahme von HeLa-Zellen nach dem Kontakt mit Rhodamin B in Abbildung 32 e) zeigt: Es sind sowohl intensitätsreiche stark lokalisierte Lichtquellen als auch eine diffuse Farbstoffverteilung über das gesamte Zytosol zu erkennen.

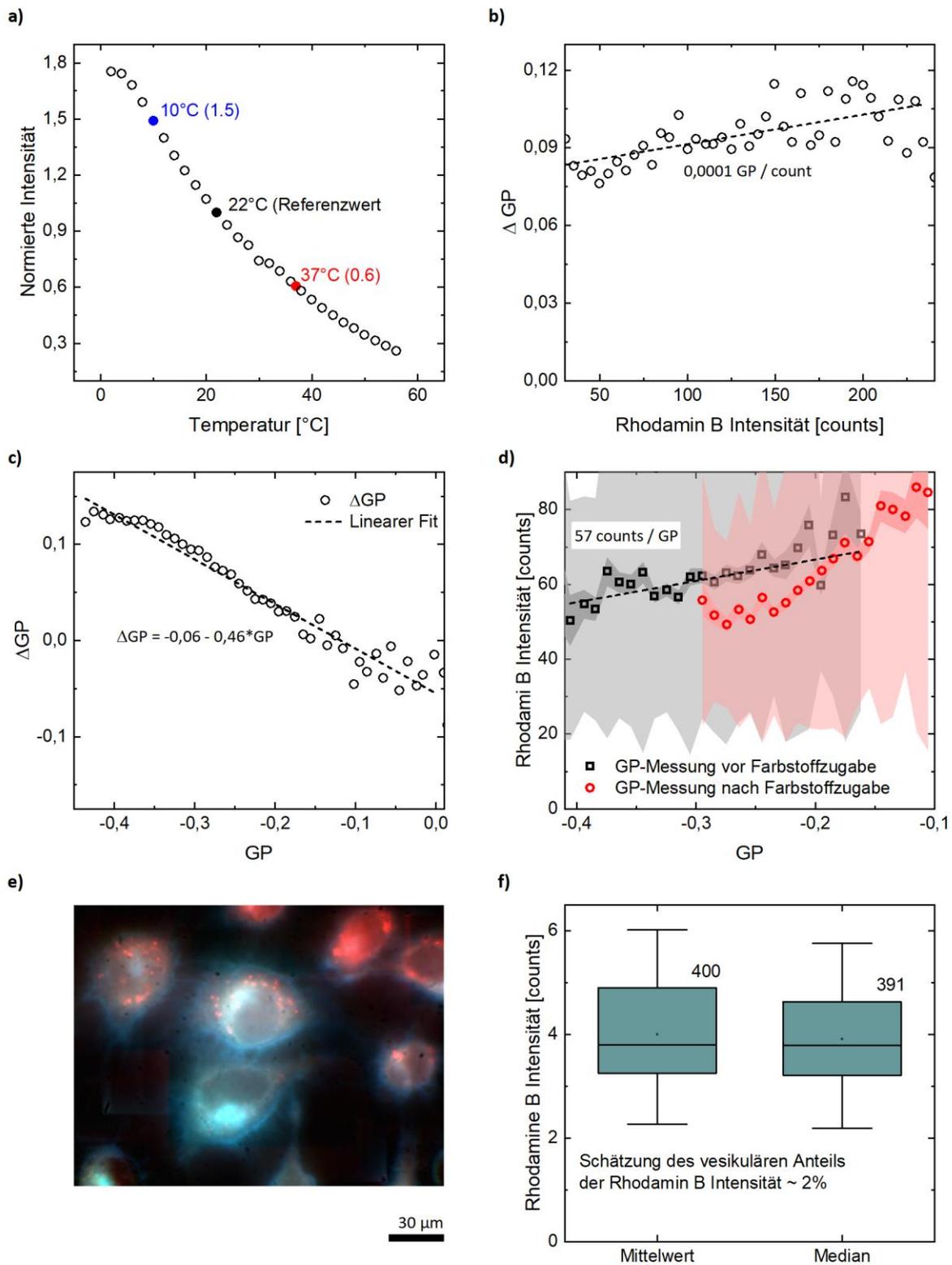


Abbildung 32 Messtechnische Einflussfaktoren, die bei der Messung der Membranpermeabilität von Rhodamin B beachtet werden müssen. **a)** Rhodamin B-Intensität als Funktion der Temperatur. Die Messwerte wurden auf den Intensitätswert bei 22 °C normiert. Mit steigender Temperatur sinkt die Quantenausbeute des Farbstoffs. **b)** Die Differenz der mittleren GP-Werte einzelner Zellen vor und nach dem Kontakt zu Rhodamin B als Funktion der Farbstoffintensität. Die Farbstoffexposition bewirkt eine Erhöhung des GP-Werts, wobei der für höhere Intensitäten leicht zunimmt. Ein Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von mindestens 100 Zellen in einem Intensitätsintervall von 10 counts. Die lineare Approximation ermöglicht, die

*Intensitätsabhängigkeit der Phasenzustandsänderung zu quantifizieren. c) Die Differenz der mittleren GP-Werte einzelner Zellen vor und nach dem Kontakt zu Rhodamin B als Funktion der Lipidordnung vor der Farbstoffexposition. Ein Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von mindestens 100 Zellen in einem GP-Intervall von 0,01. Zellmembranen mit geringer Lipidordnung erfahren eine stärkere GP-Erhöhung als Zellen mit hohem GP-Wert. Mithilfe der linearen Annäherung der Daten wurden die zellulären GP-Werte von Experimenten ohne initiale Phasenzustandsmessung korrigiert. d) Die Rhodamin B-Intensität als Maß für den Stofftransport ins Zellinnere als Funktion der zellulären Lipidordnung vor und nach dem Kontakt zu Rhodamin B. Beide Messungen zeigen eine erhöhte Farbstoffaufnahme mit zunehmender Lipidordnung. Lediglich der GP-Wertebereich ist durch die Farbstoff-induzierte Phasenzustandsänderung verschoben und gestaucht. Ein Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert über mindestens 100 Zell-GP-Werte. Die breiten transparenten Farbbereiche indizieren die Standardabweichung und die etwas dunkleren Bänder den Fehler des Mittelwerts. e) Aufnahme von Laurdan gefärbten HeLa-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie nach der Exposition zu Rhodamin B. Die hellen roten Punkte lassen auf vesikuläre Aufnahme des Farbstoffs schließen. Die diffuse Rotintensität im gesamten Zytoplasma deutet dagegen auf diffusiven Stofftransport hin. f) Vergleich der Verteilungen des Medians und des Mittelwerts der zellulären Rhodamin B-Intensität. Die Mittelwerte der jeweiligen Größe betragen 400 bzw. 391 counts. Im Gegensatz zum Mittelwert ist der Median sensitiv gegenüber räumlichen Inhomogenitäten der Intensität.*

Für eine Abschätzung, welcher der beiden Transportprozesse hauptsächlich stattgefunden hat, wurden in Abbildung 32 f) die Mittel- und Medianwerte der Rhodamin B-Intensität von mehreren tausend Zellen verglichen. Während der Mittelwert insensitiv gegenüber der Farbstoffverteilung innerhalb der Zelle ist, fallen kleine Bereiche mit stark erhöhter Intensität bei der Berechnung des Medians weniger stark ins Gewicht. Weil sich der Median der Rhodamin B-Intensität nur geringfügig von der mittleren Intensität unterscheidet, wird davon ausgegangen, dass der Großteil der Rhodamin B-Moleküle diffusiv aufgenommen wurde.

#### 4.3.2. Membrantransportmessungen mit Rhodamin B

Zur Untersuchung der Fragestellung, inwieweit die Lipidordnung die zelluläre Funktion des Membrantransports beeinflusst, wurden adhärenzte HeLa-Zellen mit Laurdan gefärbt und für 10 Minuten dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B ausgesetzt. Nach Abspülen des extrazellulären Farbstoffs konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie sowohl die Lipidordnung durch Bestimmung von GP einzelner Zellmembranen als auch der Transport von Rhodamin B in das Zellinnere auf Einzelzellniveau quantifiziert werden (siehe Kapitel 3.5.1 und 3.5.2). Die in Kapitel 4.2 untersuchte Variation der Lipidordnung innerhalb einer Zellpopulation ermöglichte es dabei, einen breiten Wertebereich von GP bei konstanter Temperatur zu analysieren. Um den zugänglichen Lipidordnungsbereich noch weiter zu vergrößern, wurden die Experimente bei drei verschiedenen Temperaturen durchgeführt.

Die beschriebene Verteilung der GP-Werte der Membranen von HeLa-Zellen ist in Abbildung 33 a) bei den Temperaturen  $T = 10\text{ °C}$ ,  $22\text{ °C}$ , und  $37\text{ °C}$  dargestellt. Dafür wurden die Pixel-GP-Werte einer einzelnen Zellmembran zunächst zu einem mittleren GP pro Zelle zusammengefasst. Zur Berechnung der Histogramm-Daten wurden diese Werte dann in Intervallen von  $\Delta GP = 0,1$  summiert und normiert. Mit steigender Temperatur nimmt die Lipidordnung ab und die Verteilungen der GP-Werte verschiebt sich zu niedrigeren GP-Werten.

Die zugehörigen Daten der Rhodamin B-Aufnahme als Maß für die Membranpermeabilität sind in Abbildung 33 c) gezeigt. Analog zu den Pixel GP-Werten einer Zelle wurden die Pixel Rhodamin B-Intensitäten zu einem Mittelwert pro Zelle zusammengefasst. Im Gegensatz zur Darstellung in Abbildung 33 a) wurden die Daten der Transportmessung nicht in äquidistanten GP-Intervallen, sondern in Intervallen mit gleicher Zellzahl zusammengefasst. Somit ist leichter erkennbar, welcher GP-Bereich durch wie viele Datenpunkte abgedeckt ist.

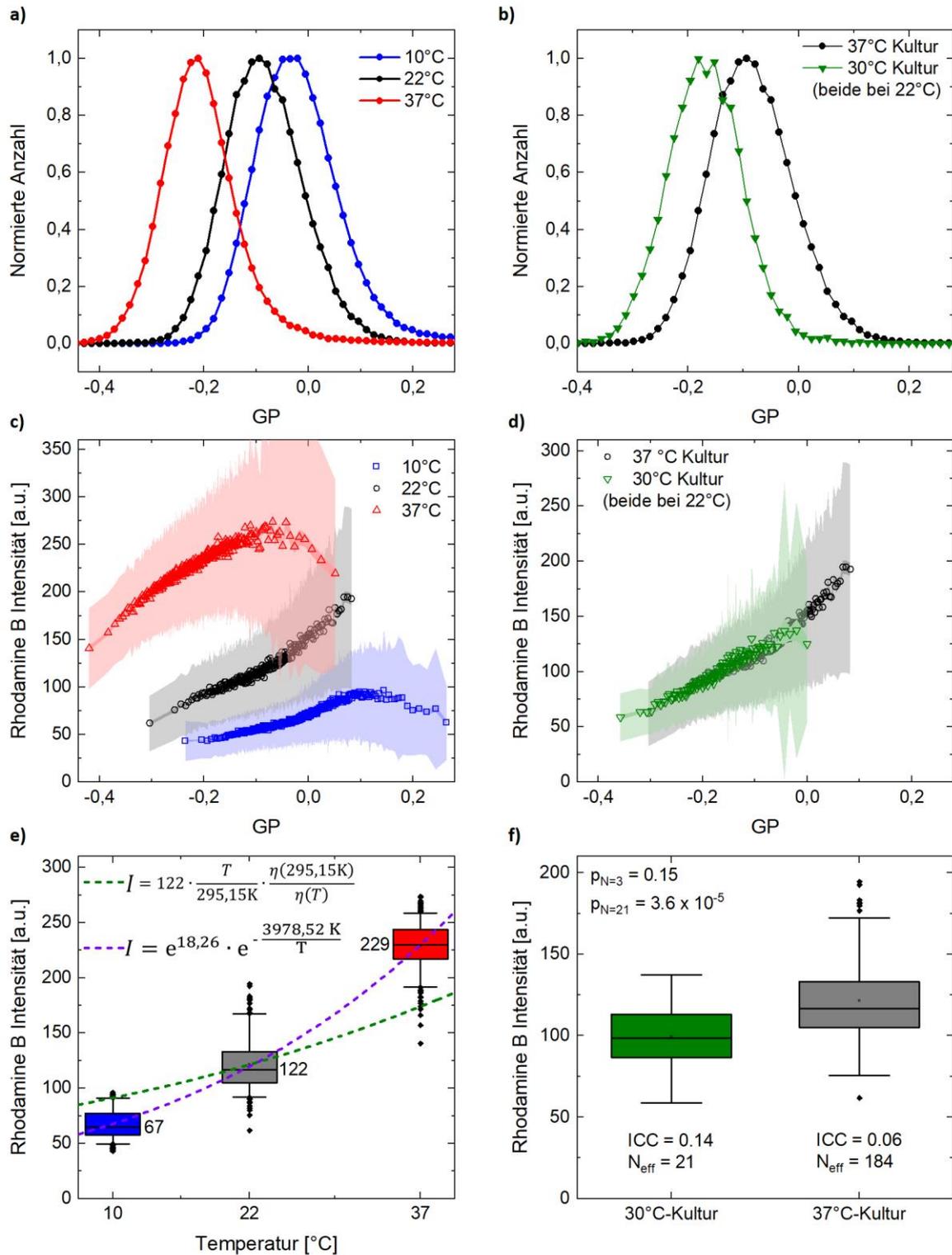


Abbildung 33 Abhängigkeit der Rhodamin B-Aufnahme von der zellulären Lipidordnung. **a)** Verteilung der Lipidordnung gemessen durch GP innerhalb einer Zellpopulation, bei drei verschiedenen Temperaturen. Mit steigender Temperatur nimmt die Lipidordnung und damit der GP-Wert ab. **b)** Verteilung der Lipidordnung zweier Zellpopulationen, die bei  $T = 30^\circ\text{C}$  und bei  $T = 37^\circ\text{C}$  kultiviert wurden, bei gleicher Temperatur. Durch Anpassung an die verringerte Temperatur verschiebt sich die Verteilung zu niedrigeren GP-Werten **c)** Rhodamin B-Intensität der Zellen aus **a)** als Funktion der Lipidordnung bei drei verschiedenen Temperaturen. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert mehrerer hundert Zellen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Daten wurden zu Intervallen mit jeweils gleicher Zellzahl zusammengefasst, sodass ersichtlich ist, in welchem GP-Bereich wie viele Messpunkte generiert wurden. Die hellen farbigen Bänder indizieren die Standardabweichung, die etwas dunkleren den Fehler des Mittelwerts. **d)** Rhodamin B-Intensität der Zellen aus **b)** als Funktion der Lipidordnung bei gleicher

Temperatur. Die Darstellung der Daten folgt dem Schema aus c). e) GP-unabhängiger Box-Plot der Intensitätsdaten aus c) dreier verschiedener Temperaturen. Die Zahlenwerte neben den Datenpunkten entsprechen dem Mittelwert. Außerdem abgebildet sind zwei Funktionen zur Approximation der Daten basierend auf einem diffusiven Modell und einem Arrhenius-Verhalten. f) GP-unabhängiger Box-Plot der Intensitätsdaten aus d) gemessen bei gleicher Temperatur. Wird bei der Berechnung des P-Werts nur die Zahl  $N=3$  der unabhängigen Experimente berücksichtigt, ergibt sich ein P-Wert von  $p = 0,15$ . Wird die hohe Zellzahl innerhalb eines Experiments durch eine Intraklassen-Korrelationsanalyse nach [68] berücksichtigt, ergibt sich eine effektive Probengröße von  $N_{eff} = 21$  und ein p-Wert von  $3,6 \cdot 10^{-5}$ .

Unabhängig von der Temperatur zeigt sich, dass mit zunehmendem GP-Wert, also mit zunehmender Lipidordnung, mehr Rhodamin B in das Zellinnere aufgenommen wird. Zusätzlich kann bei den Temperaturen  $T = 10\text{ °C}$  und  $T = 37\text{ °C}$  ein Maximum der Membranpermeabilität bei hohen GP-Werten und eine Abnahme bei einer noch höheren Lipidordnung beobachtet werden. Ein solches Maximum der Permeabilität wurde in synthetische Lipidmembranen direkt an der Phasenübergangstemperatur gemessen (siehe Abbildung 7). Es wäre also zu erwarten, dass das Maximum der zellulären Aufnahme von Rhodamin unabhängig von der Temperatur bei einem GP-Wert nahe  $GP = 0$  liegt. Die Maximalwerte der Rhodamin B-Intensität bei  $T = 10\text{ °C}$  und  $T = 37\text{ °C}$  liegen jedoch um  $GP = 0,2$  auseinander, weshalb die zelluläre Membranpermeabilität eine komplexere Abhängigkeit der Permeabilität von der Lipidordnung aufweist als synthetische Lipidvesikel.

Neben dem qualitativen Verlauf der Graphen in Abbildung 33 c) deuten die Absolutwerte der Rhodamin B-Intensität darauf hin, dass neben der Abhängigkeit von der Lipidordnung eine noch stärkere Abhängigkeit der Membranpermeabilität von der Temperatur besteht. Selbst die maximale Menge an Rhodamin B, welche bei  $T = 10\text{ °C}$  aufgenommen wurde, liegt in etwa bei dem Minimalwert der Verteilung, welcher bei einer Temperatur von  $T = 22\text{ °C}$  gemessen wurde. Die Temperaturabhängigkeit der mittleren Rhodamin B-Intensität einer Zellpopulation ist in Abbildung 33 e) unabhängig vom GP-Wert dargestellt. Es ist eine nicht-lineare Zunahme der aufgenommenen Farbstoffmenge mit steigender Temperatur erkennbar.

Unter der Annahme, dass die Rhodamin B-Moleküle ungehindert durch Membranporen diffundieren können, ergäbe sich die Temperaturabhängigkeit der Rhodamin B-Aufnahme aus der Temperaturabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten  $D$ , weil diesem der Teilchenstrom  $J$  von Rhodamin B-Molekülen in die Zelle direkt proportional ist:

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x}.$$

Die Ableitung der Konzentration  $c$  nach dem Ort  $x$  entspricht dabei dem Konzentrationsgefälle zwischen Zellinnerem und -äußerem. Der Diffusionskoeffizient  $D$  ist wiederum nach der Stokes-Einstein-Gleichung proportional zur Temperatur  $T$  und invers proportional zur Viskosität  $\eta$  eines flüssigen Mediums:

$$D = \frac{k_B T}{6 \pi \eta R_0}.$$

$R_0$  bezeichnet dabei den hydrodynamischen Radius des diffundierenden Teilchens und  $k_B$  die Boltzmann-Konstante. Unter Annahme der Proportionalität der aufgenommenen Rhodamin B-Menge zum Diffusionskoeffizienten  $D$  sollte sich die Referenzintensität  $I_0$  bei  $T = T_0$  durch Änderung der Temperatur folgendermaßen ändern:

$$\frac{I(T)}{I_0} = \frac{D(T)}{D_0} = \frac{T \eta_0}{T_0 \eta}.$$

Die so berechnete Intensität  $I$  als Funktion der Temperatur  $T$  für die Referenzwerte  $I_0 = 122$ ,  $T_0 = 295,15$  K (22 °C) und  $\eta_0 = 0,95$  mPa·s ist als grün gestrichelte Linie in Abbildung 33 e) eingezeichnet. Sie beschreibt die mit der Temperatur zunehmende Intensität zwar qualitativ richtig, stimmt mit den absoluten Messwerten jedoch nicht überein. Eine ungehinderte Diffusion der Rhodamin B-Moleküle erscheint daher unwahrscheinlich.

Die Annahme, dass eine Energiebarriere  $E_A$  überwunden werden muss, um durch die Zellmembran zu gelangen, führt zu einem Arrhenius Ansatz, wie er häufig zur Charakterisierung der Permeabilität von Membranen genutzt wird [69,70]:

$$I = I_0 e^{-\frac{E_A}{RT}}$$

$R$  ist dabei die universelle Gaskonstante. Die Auftragung der Rhodamin B-Intensitätswerte in einem entsprechenden Arrhenius Plot ist in Abbildung 34 a) zu sehen. Durch lineare Approximation wurden die Werte  $I_0 = \exp(18,26)$  und  $E_A/R = 3978,52$  K der Arrhenius-Funktion in Abbildung 33 e) ermittelt, welche mit den gemessenen Intensitätswerten treffend übereinstimmt.

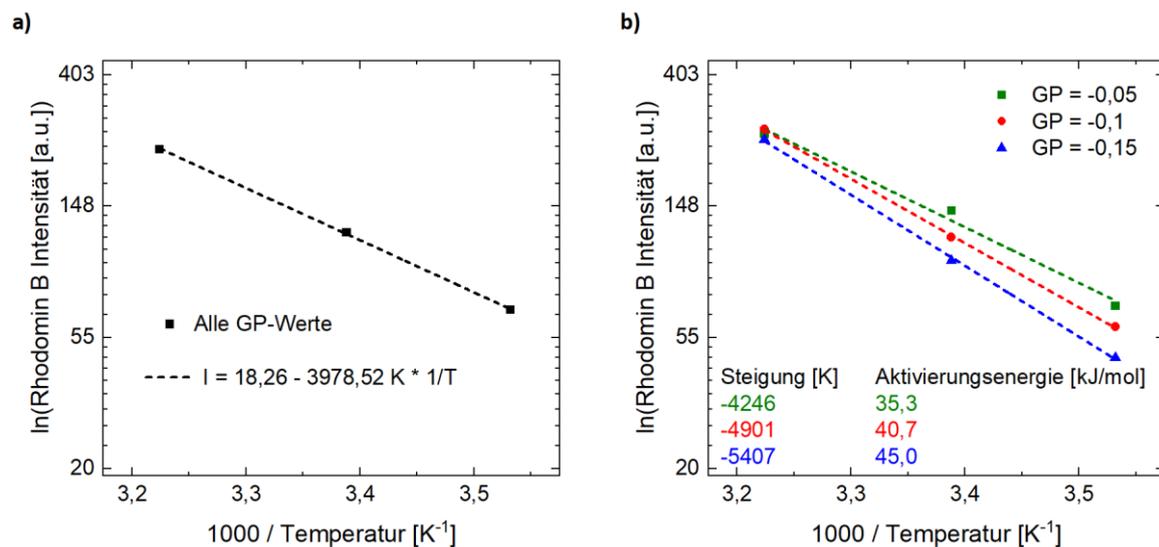


Abbildung 34 a) Arrhenius-Graph der GP-unabhängigen Rhodamin B-Intensität aus Abbildung 33 e). Die Steigung der linearen Approximation entspricht dem Produkt aus der Aktivierungsenergie  $E_A$  und der universellen Gaskonstante  $R$ . b) Arrhenius-Graph der Rhodamin B-Intensitäten aus Abbildung 33 e) für verschiedene GP-Werte. Die aus der Steigung der linearen Näherung bestimmten Aktivierungsenergie nimmt mit steigendem GP-Wert ab.

Mithilfe des gleichen Ansatzes wurden die mittleren Rhodamin B-Intensitätswerte von Zellen mit unterschiedlichen GP-Werten in Abbildung 34 b) analysiert. Aus den mittels linearer Näherung ermittelten Steigungen  $E_A/R$  wurde dann eine GP-abhängige Energiebarriere  $E_A$  ermittelt. Diese nimmt mit steigender Lipidordnung ab, was im Rahmen des so untersuchten GP-Bereichs [-0,3; 0] eine erhöhte Membranpermeabilität in geordneten Zellmembranen bedeutet.

Die Messungen der Permeabilität als Funktion der Temperatur und der Lipidordnung implizieren, dass eine Erhöhung der Temperatur einerseits die Überwindung der Membran und der damit verbundenen Energiebarrieren erleichtert, aber gleichzeitig eine Reduktion der Lipidordnung bewirkt, wodurch die zu überwindende Energiebarriere größer wird. Andersherum bewirkt eine Reduktion der Temperatur eine Erhöhung der Lipidordnung und damit eine Verringerung der Energiebarriere, aber auch eine Reduktion der thermischen Energie, welche notwendig ist, die Membranbarriere zu überwinden. Das Verhalten der Lipidmembran scheint daher die Auswirkungen von Temperaturänderungen auf den Stofftransport zu dämpfen.

Die Lipidordnung zellulärer Membranen ändert sich nicht nur passiv im Moment wechselnder Umwelteinflüsse. Bereits bei der Analyse von Phasenübergängen in Zellsuspensionen in Kapitel 4.1.4 konnte eine dauerhafte Adaptation von HeLa-Zellen an verringerte Wachstumstemperaturen beobachtet werden. Die Analyse der Lipidordnung eben dieser Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie ist in Abbildung 33 b) dargestellt. Die Verteilung der GP-Werte ist gegenüber einer Kultur, die bei  $T = 37\text{ °C}$  kultiviert wurde, zu niedrigeren Werten verschoben, was einer geringeren Lipidordnung entspricht. Die Zellpopulation hat also die Erhöhung der Lipidordnung, welche durch die verringerte Wachstumstemperatur induziert wurde, kompensiert, indem sie durch eine Anpassung der Membranzusammensetzung die Membranordnung wieder verringert hat. Allein der Vorgang der Adaptation legt nahe, dass die Lipidordnung zellulärer Membranen einem Zweck dient.

Der Vergleich der adaptierten mit regulär kultivierten Zellen bietet einen besonderen Vorteil bei der Analyse der Membranpermeabilität: Es können bei konstanter Temperatur zwei Zellpopulationen mit verschiedener Membranordnung verglichen werden, so dass die Temperaturabhängigkeit des Membrantransports nicht berücksichtigt werden muss. Das Ergebnis der GP-abhängigen Rhodamin B-Messung beider Zellpopulationen bei  $T = 22\text{ °C}$  ist in Abbildung 33 d) dargestellt. Beide Graphen zeigen eine nahezu linear ansteigende Zunahme der intrazellulären Rhodamin B-Intensität mit zunehmendem GP-Wert. Die Verschiebung der GP-Werte der adaptierten Kultur führt dazu, dass mehr Datenpunkte in Bereichen niedriger Rhodamin B-Intensität liegen, sodass die adaptierten Zellen insgesamt weniger Farbstoff aufgenommen haben als die Kontrolle. Dies zeigt sich auch bei der Analyse der mittleren Rhodamin B-Intensität in Abbildung 33 f), die belegt, dass die adaptierte Kultur bei gleicher Temperatur eine reduzierte Membranpermeabilität aufweist. Demnach bewirkt eine dauerhafte Anpassung der zellulären Membranordnung auch eine anhaltende Änderung des Membrantransports.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte der zunehmenden Membranpermeabilität mit steigender Lipidordnung ein Artefakt einer Zellgrößenabhängigkeit der Lipidordnung und des Farbstoffaufnahme sind, wurde eine größenabhängige Auswertung durchgeführt, welche in Abbildung 35 a) gezeigt ist. Dargestellt ist die Rhodamin B-Intensität als Funktion des GP-Werts für drei verschiedene Intervalle der gemessenen zellulären Projektionsfläche. Alle Graphen zeigen eine monotone Zunahme der aufgenommenen Farbstoffmenge als Funktion der Lipidordnung. Es ist auch keine ausgeprägte Abhängigkeit des GP-Werts von der Zellgröße in Abbildung 35 b) erkennbar, welche sowohl das Größenhistogramm einer Zellpopulation und für jede Größe den mittleren GP-Wert zeigt. Der Pearson-Korrelationskoeffizient, welcher ein Maß für die lineare Abhängigkeit zweier Größen ist, beträgt 0,03.

Wie bereits in Kapitel 4.2.4 diskutiert, färbt Laurdan nicht nur die äußere, sondern auch intrazelluläre Membranen einzelner Zellorganellen und Endosomen. Für den Stofftransport in das Zellinnere ist jedoch nur der Zustand der Plasmamembran entscheidend. Die beschriebene Korrelation zwischen Farbstoffaufnahme und Lipidordnung konnte also beobachtet werden, obwohl das Messsignal zur Bestimmung des GP-Werts auch aus Membrankompartimenten stammte, welche nicht in den Stofftransport involviert sind. Deswegen wurde analog zum Vorgehen in Kapitel 4.2.4 die aufgenommene Farbstoffmenge als Funktion der Lipidordnung verschiedener Membranbereiche analysiert. Dazu wurde ein radialer Bereich um das Zellzentrum von  $7,5\text{ }\mu\text{m}$  Durchmesser als innere Membran und alle anderen Pixel bis zum Zellrand als äußere Membran definiert. Der Vergleich der aufgenommenen Farbstoffmenge als Funktion der Lipidordnung in Abbildung 35 c) zeigt, dass die Korrelation für die innere Membran geringer ausfällt. Dagegen ist der beobachtete Effekt bei der Auswertung der gesamten Membran fast vollständig auf die äußere Membran zurückzuführen. Diese Beobachtung ist in Einklang mit der Annahme, dass größtenteils die Lipidordnung der Plasmamembran für den Stofftransport ausschlaggebend ist.

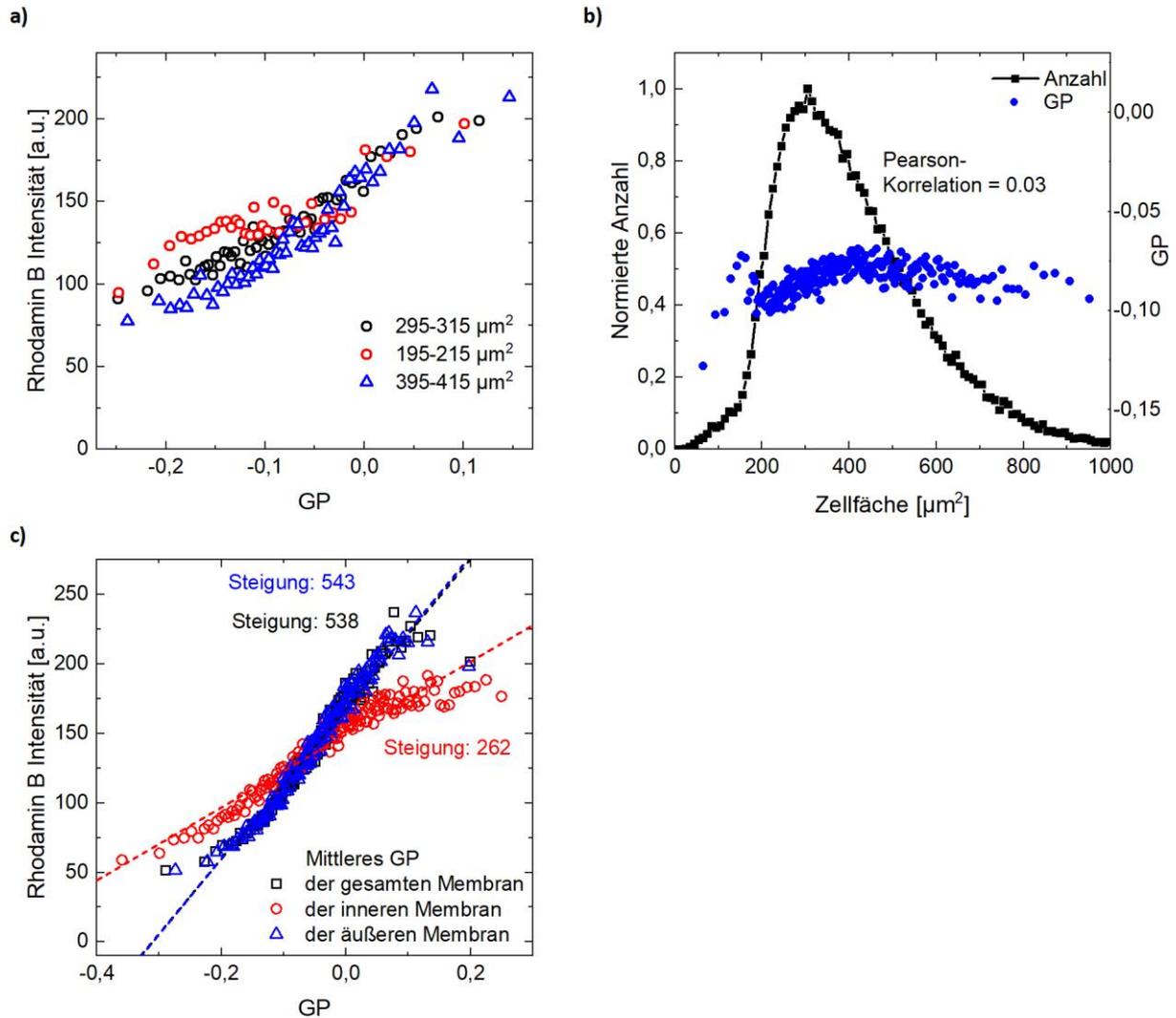


Abbildung 35 Analyse der Abhängigkeit der Farbstoffaufnahme von der Zellfläche und der intrazellulären Lipidordnung. **a)** Die Rhodamin B-Intensität als Funktion der zellulären Lipidordnung für verschiedene Zellgrößen. Alle Graphen zeigen eine ähnliche monotone Zunahme der Intensität mit steigendem GP-Wert. **b)** Histogramm der Zellfläche als Maß für die Zellgrößenverteilung innerhalb einer Population. Außerdem ist für dieselben Größenintervalle der mittlere zelluläre GP-Wert abgebildet, welcher keine starke Abhängigkeit von der Zellgröße zeigt. Der Pearson-Korrelationskoeffizient der Größen GP und Zellgröße beträgt 0,03. **c)** Rhodamin B-Intensität als Funktion der zellulären Lipidordnung für verschiedene Membranbereiche. Ein kreisförmiger Bereich um das Zellzentrum von  $7,5 \mu\text{m}$  wurde als innere Membran definiert, alle anderen Zellpixel als äußere Membran. Die Abhängigkeit der Farbstoffaufnahme von der Lipidordnung der inneren Membranen fällt weniger als halb so groß aus wie die der äußeren Membran. Die Korrelation des Stofftransports mit der Lipidordnung der äußeren Membran entspricht in etwa dem Wert der gesamten Membranfläche.

### 4.3.3. Membrantransportmessungen mit Hoechst 33342

Die Transportmessungen mit Rhodamin B ermöglichen eine simultane Analyse der Lipidordnung aufgrund des geringen Überlapps beider Emissionsspektren, wodurch während des Mikroskopierens alle Informationen zur gleichen Zeit an einer Stelle aufgenommen werden können. Der Einfluss von Rhodamin B auf die Lipidordnung muss bei der Datenauswertung jedoch berücksichtigt werden. Eine solche Interferenz zwischen Messung des Transports und der Lipidordnung ist bei einer sequenziellen Erfassung beider Größen nicht notwendig. Dieses Konzept wurde durch die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst 33342, welcher bereits als Farbstoff zur Messung zellulärer Membranpermeabilität verwendet wurde, umgesetzt, um die Ergebnisse der Rhodamin B-Messung zu validieren [71].

Ein Vorteil von Hoechst 33342 gegenüber anderen Fluorophoren ist, dass er erst nach Interkalation in die DNA der Zelle fluoresziert und deswegen kein Spülen der Proben zur Reduktion des Hintergrunds notwendig ist. Eine sequenzielle Messung des Transports und der Lipidordnung ist außerdem notwendig, weil Hoechst 33342 ein ähnliches Emissionsspektrum wie Laurdan aufweist. Experimentell wurde also wie folgt vorgegangen: Zunächst wurde die Lipidordnung von mit Laurdan gefärbten HeLa-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie gemessen. Anschließend folgte die Zugabe des Farbstoffs Hoechst 33342, woraufhin die Zunahme von dessen Fluoreszenzintensität im Zellinneren durch wiederholtes Mikroskopieren als Funktion der Zeit gemessen wurde. Aufgrund des spektralen Überlapps von Laurdan und Hoechst 33342 wurden die Intensitätswerte der Permeabilitätsmessung um die anfänglich gemessene Intensität von Laurdan korrigiert.

Die Zunahme der Fluoreszenzintensität im Zellinneren ist auf den Mikroskopbildern der Abbildung 36 a) zu erkennen. Weil Hoechst 33342 nach Interkalation in die DNA fluoresziert, wird vor allem der Zellkern angefärbt. Die Verteilung der GP-Werte und die Hoechst 33342-Intensität als Funktion von GP zu verschiedenen Zeitpunkten ist in Abbildung 36 b) dargestellt. Der Intensitätszuwachs fällt für Zellmembranen hoher Lipidordnung stärker aus als bei Zellen mit niedrigem GP-Wert.

Selbige Intensitätsdaten sind in Abbildung 36 c) als Funktion der Zeit für verschiedene GP-Werte aufgetragen. Der Intensitätszuwachs für Zellmembranen mit hohem GP-Wert fällt deutlich steiler aus. Durch lineare Approximation der anfänglichen Intensitätssteigerung wurden aus den zeitabhängigen Intensitätswerten für verschiedene GP-Intervalle Permeationsraten berechnet, welche in Abbildung 36 d) dargestellt sind. Im Einklang mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.3.2 zeigt sich, dass Membranen mit erhöhter Lipidordnung eine gesteigerte Permeabilität aufweisen. Die mittels Rhodamin B durchgeführten Transportmessungen scheinen damit validiert zu sein.

Abhängig vom Zellzyklus einer Zelle variiert die Größe des Zellkerns und die Menge an der sich dort befindlichen DNA. Sollte die Fluoreszenzintensität von Hoechst 33342 von der Menge an intrazellulärer DNA abhängen und auch die Lipidordnung als Funktion des Zellzyklus variieren, könnte dies Artefakte im Rahmen einer lipidordnungsabhängigen Auswertung der Fluoreszenzintensität bedingen. Deshalb wurde in Abbildung 36 e) auf eine Korrelation der Nukleusgröße mit der Lipidordnung getestet. Es ist jedoch keine ausgeprägte Abhängigkeit beider Größen erkennbar.

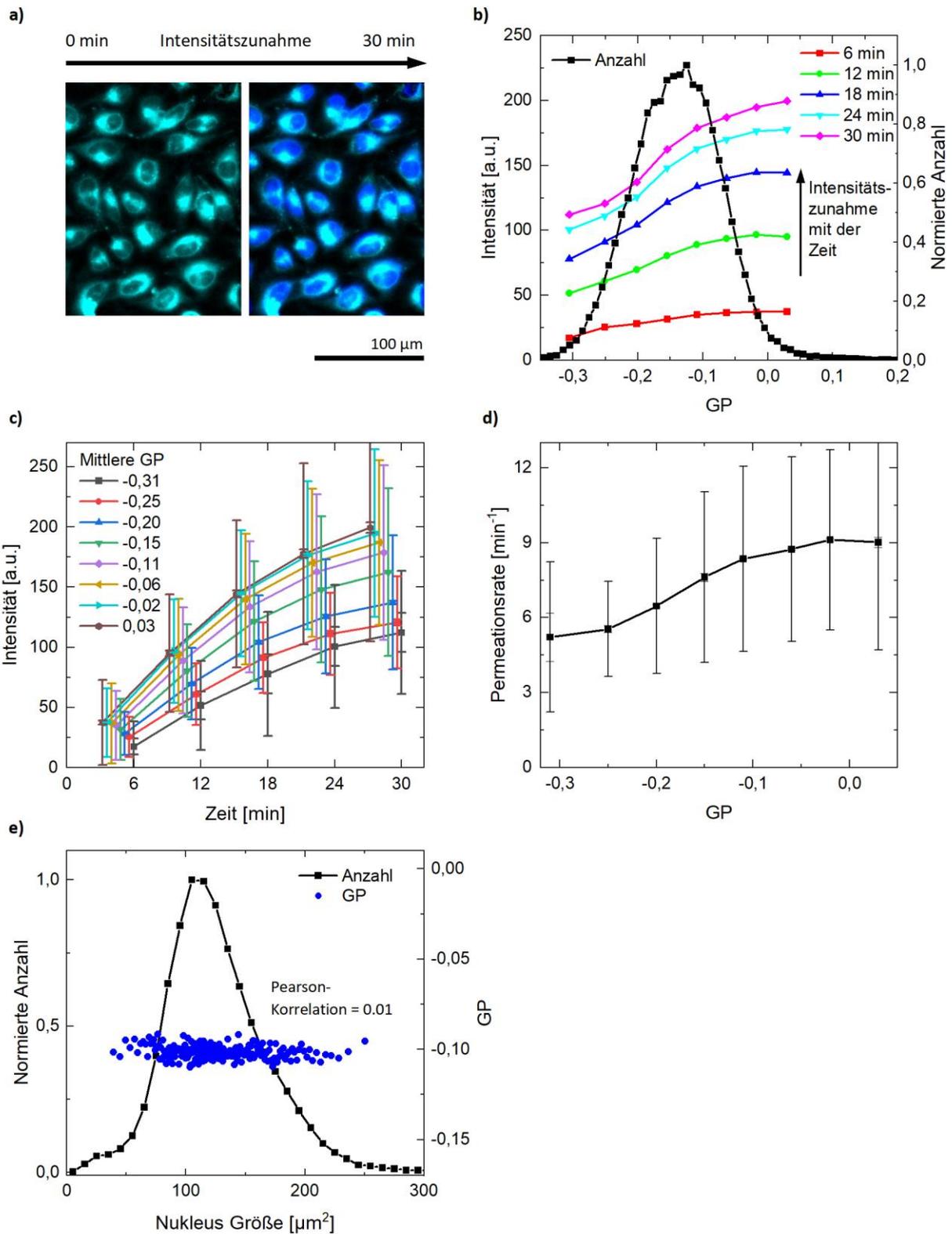


Abbildung 36 Abhängigkeit der Aufnahme von Hoechst 33342 von der Lipidordnung zellulärer Membranen. **a)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer mit Laurdan gefärbten HeLa-Zellmembran zu Beginn der Exposition zu Hoechst 33342 und nach 30 Minuten. Nach dem Transport ins Zellinnere interkaliert der Farbstoff in die DNA und beginnt zu fluoreszieren. **b)** Verteilung der zellulären GP-Werte innerhalb einer Zellpopulation und GP-abhängige Aufnahme von Hoechst 33342 zu verschiedenen Zeitpunkten. Zellmembranen mit hoher Lipidordnung zeigen eine erhöhte Aufnahme des Farbstoffs. **c)** Die Fluoreszenzintensität von Hoechst 33342 als Funktion der Zeit für verschiedene GP Werte. Ein Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von mehreren hundert Zellen. Die Fehlerbalken indizieren die jeweilige Standardabweichung. **d)** Die aus den zeitabhängigen Intensitätswerten aus c) bestimmten Permeationsraten als Funktion des GP-Werts. Im Einklang mit den Transportmessungen mittels Rhodamin B weisen Zellmembranen mit hoher Lipidordnung eine höhere Permeabilität auf. Die

*Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung der jeweiligen Mittelwerte. e) Histogramm der Zellkerngröße und die Abhängigkeit der Lipidordnung einzelner Zellen von der Zellkerngröße. Es ist keine ausgeprägte Korrelation zwischen beiden Größen erkennbar.*

#### 4.3.4. Einfluss der Zelldichte auf den Membranzustand und den Membrantransport

Der Vergleich adaptierter Zellen mit herkömmlich kultivierten HeLa-Zellen in Kapitel 4.3.2 ermöglichte es, zwei Zellpopulationen zu untersuchen, die unter exakt gleichen Bedingungen unterschiedlich stark geordnete Lipidmembranen aufweisen. So konnte ohne Beeinflussungen anderer Zelleigenschaften oder physikalischer Größen, wie sie zum Beispiel bei Änderungen der Temperatur auftreten, Effekte untersucht werden, die dann ausschließlich auf die Änderung der Lipidordnung zurückgeführt werden können.

Ein noch effektiverer Ansatz, im Rahmen dessen die Betrachtung einer einzigen Zellpopulation genügt, ist die Analyse von Lipidordnungsänderungen, welche durch morphologische Anpassung an Variationen der lokalen Zelldichte induziert werden. Die Messungen der Lipidordnung an HeLa-Zellen während des Übergangs vom gespreiteten Zustand in eine sphärischen Form in Abbildung 21 b) belegen, dass eine Anpassung der Zellmorphologie eine Änderung der Lipidordnung bewirken kann. Wenn einer Zelle in einem Bereich lokal erhöhter Zelldichte nur wenig Raum zur Verfügung steht, weist sie eine andere Morphologie auf als eine Zelle ohne Nachbarn, die sich weit auf dem Substrat ausbreiten kann. Demnach könnte die lokale Zelldichte tatsächlich die Lipidordnung modulieren. Aufgrund deren Korrelation mit der Membranpermeabilität sollte dann auch eine Modulation des Membrantransports beobachtet werden können.

Als Maß für die lokale Zelldichte wurde die Zahl der nächsten Nachbarn einzelner Zellen bestimmt. Als benachbart gelten zwei Zellen, wenn die Distanz von deren Pixelschwerpunkten weniger als 31  $\mu\text{m}$  beträgt. Abbildung 37 b) zeigt eine beispielhafte Fluoreszenzmikroskop-Aufnahme von mit Laurdan gefärbten HeLa-Zellen, in der die durch Bildsegmentierung ermittelten Konturen einzelner Zellen und die Zahl derer nächsten Nachbarn eingezeichnet sind. Die nach dieser Methode ausgewerteten GP-Werte einzelner Zellen sind als Funktion der Anzahl nächster Nachbarn in Abbildung 37 a) dargestellt. Es ist eine deutliche Abhängigkeit der Lipidordnung von der lokalen Zelldichte zu erkennen. Die Membranen von Zellen mit einer geringen Zahl nächster Nachbarn weisen eine geringere Lipidordnung auf als die von Zellen, welche sich in Bereichen erhöhter Zelldichte befinden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Resultaten aus Abbildung 21 b), da sich Zellen mit geringen räumlichen Einschränkungen weiter ausbreiten können und deren Membranspannung gegenüber Zellen, welche nur wenig Substratfläche zur Verfügung haben, erhöht ist. Auch in einer aktuellen Publikation wurde eine erhöhte Lipidordnung in Vesikeln gemessen, welche aus Zellen extrahiert wurden, die bei einer vergleichsweise hohen Zelldichte kultiviert wurden [14]. Solche Änderungen der Lipidordnung durch die lokale Zellumgebung werden in der Literatur durch eine Anpassung der Lipidkomposition erklärt [72,73].

Um die Hypothese zu überprüfen, dass eine Modulation der Lipidordnung durch die lokale Zelldichte auch eine Modulation der Membranpermeabilität bewirkt, wurde selbige Auswertung auf mit Laurdan gefärbten Zellen nach einer Exposition zu Rhodamin B angewandt, um neben der Lipidordnung auch den Membrantransport messen zu können (siehe Abbildung 37 d)). Das Resultat ist in Abbildung 37 c) dargestellt und zeigt sowohl die Lipidordnung als auch die Rhodamin B-Intensität als Funktion der Anzahl nächster Nachbarn. Beide Messgrößen nehmen mit steigender Zelldichte zu. Das bedeutet, dass nicht nur die Lipidordnung, sondern auch die Membranpermeabilität durch die lokale Zelldichte moduliert werden. Das in Kapitel 4.3.2 und 4.3.3 beobachtete Phänomen der zunehmenden Membranpermeabilität mit steigender Lipidordnung ist auch in diesem Zusammenhang gültig.

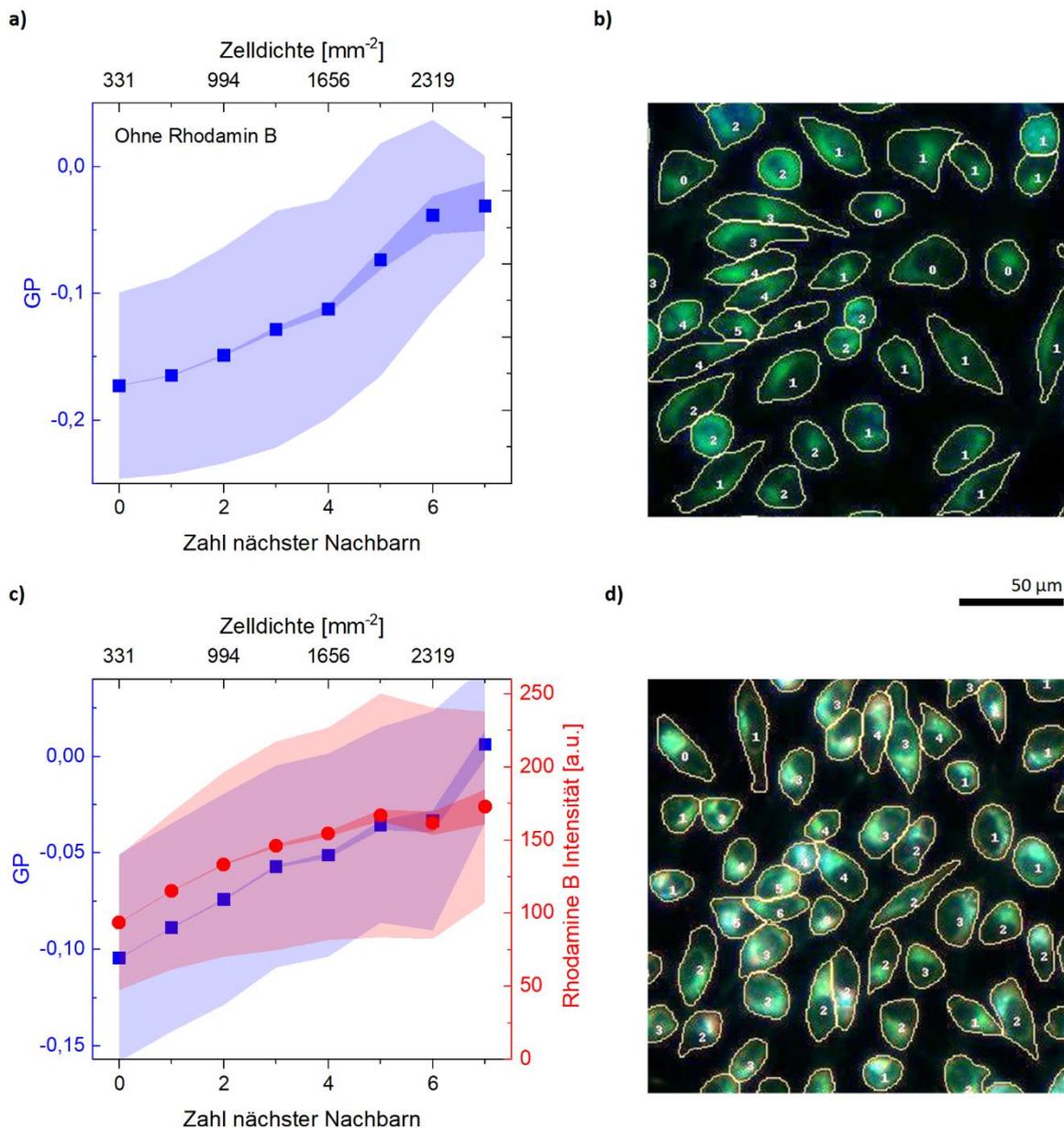


Abbildung 37 Abhängigkeit von Membrantransport und -zustand von der lokalen Zelldichte. **a)** Abhängigkeit des GP-Werts einzelner Zellen von der Zellzahl in direkter Umgebung. Zellen, deren Distanz der Pixelschwerpunkte weniger als  $31 \mu\text{m}$  beträgt, werden als nächste Nachbarn klassifiziert. Mit zunehmender Zelldichte nimmt die Lipidordnung von Zellmembranen zu. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten von insgesamt 40.000 Zellen. Die leicht transparenten Bänder indizieren die Standardabweichung und den Fehler des Mittelwerts. **b)** Fluoreszenzaufnahme von HeLa-Zellen gefärbt mit Laurdan. Das Ergebnis der Zellsegmentierung ist als gelbe Kontur dargestellt. Die Zahl im jeweiligen Zellzentrum repräsentiert die Anzahl der nächsten Nachbarn. **c)** Abhängigkeit des GP-Werts und der Rhodamin B-Intensität einzelner Zellen von der Zellzahl in direkter Umgebung. Die Darstellung der Daten folgt dem Schema aus a). Es wurden drei unabhängige Experimente mit jeweils mindestens 18.000 Zellen ausgewertet. Wie in a) nimmt die Lipidordnung von Zellmembranen in Regionen hoher Zelldichte zu. Die Rhodamin B-Intensität als Maß für die aufgenommene Farbstoffmenge und den Stofftransport folgt dem gleichen Trend. Dieses Resultat entspricht dem in Kapitel 4.3.2 beobachteten Zusammenhang der steigenden Rhodamin B-Aufnahme mit zunehmender Lipidordnung. **d)** Fluoreszenzaufnahme von HeLa-Zellen gefärbt mit Laurdan nach der Exposition zu Rhodamin B. Das Ergebnis der Zellsegmentierung ist als gelbe Kontur dargestellt. Die Zahl im jeweiligen Zellzentrum repräsentiert die Anzahl der nächsten Nachbarn.

Aus der Abhängigkeit der Membranpermeabilität von der lokalen Zelldichte kann abgeleitet werden, dass der Stoffaustausch innerhalb eines geschlossenen Zellrasens gegenüber dem Zellrand erhöht ist. Noch weitergedacht, müsste auch der Stoffaustausch innerhalb eines 3-dimensionalen Gewebes

größer sein als an der Oberfläche. Der 2-dimensionale Fall kann mit wenig Aufwand experimentell nachgebildet werden und steht im Fokus des nächsten Kapitels.

#### 4.3.5. Physiologische Relevanz des phasenzustandsabhängigen Membrantransports

Der Abhängigkeit der Membranpermeabilität von der Lipidordnung und deren Beeinflussung durch die lokale Zelldichte sollte eine besondere physiologische Relevanz in der Nähe von Grenzbereichen zellulären Gewebes zukommen. Dies kann im physiologischen Fall die Oberfläche von Organen im pathophysiologischen Beispiel eine Wunde sein. Dieses Szenario lässt sich in zwei Dimensionen leicht auf einem Objektträger mit speziellen Kultureinsätzen nachbilden. Diese bestehen aus zwei Kammern, die durch eine etwa 300 µm breite Barriere voneinander getrennt sind. Nach Kultur adhärenter Zellen in beiden Kammern und anschließendem Entfernen der Barriere erhält man eine „Wunde“, welche durch Migration der Zellen in die zellfreie Fläche mit der Zeit geschlossen wird (siehe Abbildung 38 b), d) und f)).

Während dieses Prozesses wurden die Lipidordnung mittels Laurdan und der Membrantransport durch Exposition der Zellen zu Rhodamin B gemessen. Die Resultate einer Messung sechs Stunden nach Entfernen der Barriere ist in Abbildung 38 a) dargestellt. Abgebildet sind die Mittelungen über GP- und Intensitätswerte einzelner Zellen als Funktion der horizontalen Position. Die initialen Ränder der Barriere sind als gestrichelte Linien gekennzeichnet, in deren Nähe im Vergleich zum geschlossenen Zellrasen ein scharfer Abfall von GP und der Rhodamin B-Intensität hin zum zellfreien Bereich beobachtet werden kann. Die mittlere Farbstoffaufnahme ist im Zellrasen um einen Faktor 1,5 gegenüber dem Wundbereich erhöht. Dies steht im Einklang mit den Messungen aus Kapitel 4.3.4, da die lokale Zelldichte in Richtung des Mittelpunkts der Wunde abnimmt.

12 Stunden nach Entfernen der Barriere ist die Wunde nahezu geschlossen (siehe Abbildung 38 d)), sodass in Abbildung 38 c) nahezu über den gesamten ursprünglich zellfreien Bereich Messdaten erhoben werden konnten. Der bereits nach 6 Stunden beobachtbare Trend setzt sich nach 12 Stunden noch stärker fort. Die Änderung der Lipidordnung vom geschlossenen Zellrasen hin zur Mitte der Wunde vergrößert sich noch weiter von etwa  $\Delta GP = 0,12$  auf  $\Delta GP = 0,17$ . Auch das Verhältnis der Rhodamin B-Intensitäten zwischen Zellrasen und Wundbereich vergrößert sich auf einen Faktor 1,9.

Nach 24 Stunden ist die Wunde vollständig geschlossen und die Unterschiede der Lipidordnung und der Rhodamin B-Intensität zwischen Zellrasen und ursprünglich zellfreiem Bereich beginnen sich im Graphen der Abbildung 38 e) zu verringern. Aufgrund der immer noch deutlich reduzierten Zelldichte (siehe Abbildung 38 f)) gegenüber dem Randbereich variiert die Lipidordnung und die Rhodamin B-Intensität aber immer noch deutlich.

Wie erwartet sind die Lipidordnung und der Membrantransport in geschlossenen Zellrasen höher als in den Randbereichen. Im pathophysiologischen Kontext einer Wunde hat dies zur Folge, dass die Permeabilität am Wundrand verringert ist. Ein solcher Effekt scheint vorteilhaft, da so der Verlust zellulärer Substanzen verringert und die Aufnahme gewebefremder Stoffe reduziert wird. Eine Reduzierung der Lipidordnung bewirkt unter anderem eine Abnahme der Biegesteifigkeit einer Membran [14]. Ein reduzierte Biegesteifigkeit bewirkt wiederum ein erhöhte Zellmigration [13]. Daher könnte die Reduktion der Lipidordnung am Rand der Wunde eine erhöhte Migration der Zellen bewirken, wodurch der Wundheilungsprozess beschleunigt wird.

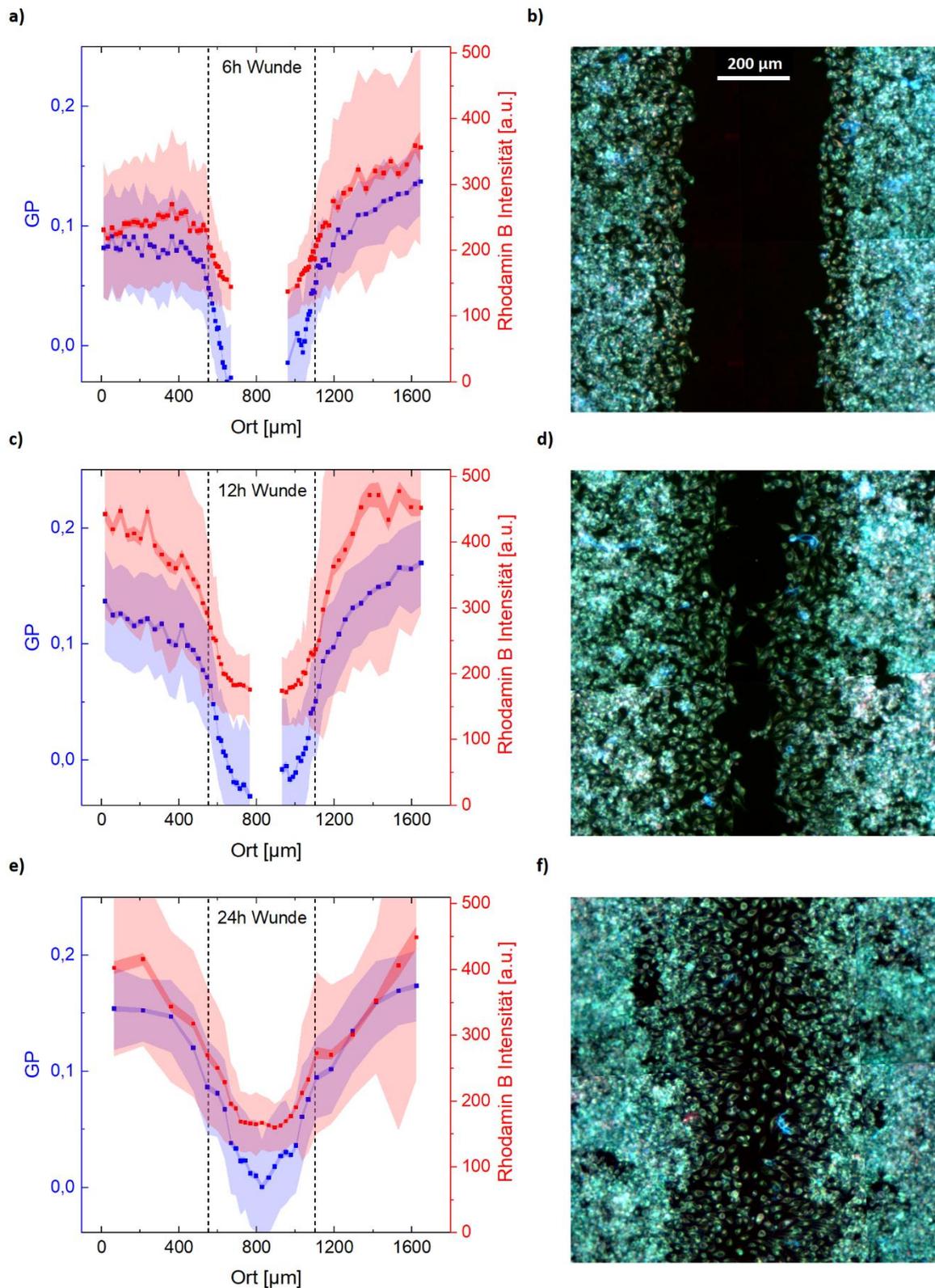


Abbildung 38 Analyse des Membrantransports und der Lipidordnung innerhalb eines Wundheilungsmodells. **a)**, **c)** und **d)** Der GP-Wert und die Rhodamin B-Intensität als Funktion der horizontalen Position im Wundheilungsmodell, welches in **b)**, **d)** und **f)** abgebildet ist, zu drei verschiedenen Zeitpunkten. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert über mehrere hundert Zell-GP bzw. Zell-Intensitätswerte dar. Die transparenten Bänder repräsentieren die jeweiligen Standardabweichungen und den Fehler des Mittelwerts. Die Daten wurden 6, 12 und 24 Stunden nachdem eine Barriere zwischen beiden Zellfronten entfernt wurde, aufgenommen und decken den Prozess der Wundheilung durch Migration in die zellfreie Fläche in verschiedenen Stadien ab. Die Zellen am Rand der Wunde, welche 6 Stunden nach Entfernen der Barriere beginnen zu migrieren, weisen eine geringere Lipidordnung auf als die Zellen in den Regionen hoher Zelldichte und nehmen weniger Farbstoff auf. Nach 12 Stunden ist der

*Effekt noch stärker ausgeprägt und nach 24 Stunden und vollständiger Schließung der Wunde immer noch zu beobachten. b), d), und f) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit Laurdan gefärbten HeLa-Zellen nach Rhodamin B-Exposition in verschiedenen Stadien der Wundheilung.*

Die Proportionalität der Membranpermeabilität zur Lipidordnung hat zur Folge, dass Einwirkungen auf den Phasenzustand von Zellmembranen den Membrantransport beeinflussen. Dies wurde am Beispiel der Adaptation und der lokalen Zelldichte demonstriert. Aus Kapitel 4.1 ist bekannt, dass auch der pH-Wert, Lösemittel, Anästhetika und der Cholesterolgehalt von Membranen die Lipidordnung verändern. Es ist daher davon auszugehen, dass diese Umweltfaktoren aber auch noch weitere wie die Salz-Konzentration oder elektrische Felder, über die Lipidordnung Einfluss auf die Membranpermeabilität nehmen können. Dieses universelle Konzept erlaubt Vorhersagen über das Verhalten des porösen Membrantransports unter verschiedensten Umwelteinflüssen.

#### 4.3.6. Fazit

Die Untersuchung des Membrantransports als Funktion der Lipidordnung hat folgende Erkenntnisse hervorgebracht:

- Die Exposition von Zellmembranen zu Rhodamin B bewirkt eine Erhöhung der Lipidordnung, wobei der Effekt bei ungeordneten Membranen stärker ausfällt.
- Die Aufnahme von Rhodamin B findet hauptsächlich diffusiv statt.
- Die Membranpermeabilität ist in weiten GP-Bereichen direkt proportional zur Lipidordnung
- Eine Erhöhung der Temperatur bewirkt eine Zunahme des Stofftransports, wobei die gleichzeitige Verringerung der Lipidordnung den Effekt dämpft.
- Die Adaptation an verringerte Wachstumstemperaturen induziert eine Reduktion der Lipidordnung und infolgedessen eine Abnahme der Membranpermeabilität.
- Eine Erhöhung der lokalen Zelldichte induziert eine Zunahme der Lipidordnung und infolgedessen eine Zunahme der Membranpermeabilität. Umgekehrt resultiert daraus eine verringerte Permeabilität von Zellmembranen an den Rändern einer Wunde.

## 4.4. Membranzustand und Nanopartikeltransport

Die Aufnahmen der intrazellulären Rhodamin B-Verteilung (siehe Abbildung 32 e)) zeigen, dass abgesehen vom porösen Membrantransport auch vereinzelt eine vesikuläre Aufnahme stattgefunden hat. Um auch diesen Prozess als Funktion des zellulären Membranzustands genauer zu charakterisieren, wird in diesem Kapitel der Transport von Kieselgel-Nanopartikeln untersucht, welche bekanntermaßen durch den Prozess der Endozytose von Lipidmembranen aufgenommen werden.

Bisherige Studien an synthetischen Lipidvesikeln aber auch an zellulären Membranen zeigten, dass die Interaktion von Kieselgel-Nanopartikeln Änderungen der Lipidordnung induzieren. Deswegen soll vor der Untersuchung des endozytotischen Aufnahmeprozesses als Funktion der Lipidordnung zunächst die Lipidordnung als Funktion der Nanopartikelexposition charakterisiert werden. In diesem Kontext werden Phasenzustandsänderungen an multilamellaren Vesikeln und suspendierten HeLa-Zellen optisch analysiert.

Die Phasenzustandsmessungen an synthetischen Membranen des Kapitels 4.4. führte Michael Saule als Teil seiner Masterarbeit durch. Die Urheber der experimentellen Untersuchungen an Zellmembranen sind Jonas Reitler und Nicolas Färber. Eine Veröffentlichung hierzu befindet sich in Vorbereitung [74].

### 4.4.1. Phasenzustandsänderungen induziert durch Nanopartikel in synthetischen Vesikeln

Die Aufnahme von Nanopartikeln über eine Lipidmembran durch Endozytose beinhaltet die Anlagerung, die Umhüllung und die Abtrennung von der Membran (siehe Kapitel 2.3). Es wurde gezeigt, dass die zur Umhüllung des Nanopartikels induzierte Krümmung zu einer lokalen Reduktion der Lipidordnung führt, was sich in Form eines zusätzlichen Maximums im Wärmekapazitätsprofil der Lipidmembran zeigt [75]. Diese Beobachtung wurde durch kalorimetrische Messungen an Vesikeln bestehend aus dem Lipid DMPC mit  $d = 80$  nm großen Kieselgel-Nanopartikeln reproduziert, deren Resultat in Abbildung 39 a) dargestellt ist.

Zur Untersuchung, ob selbige Phasenzustandsänderung auch durch spektrale Analyse von Laurdan eingebettet in die Vesikelmembranen detektiert werden kann, wurde mithilfe der in Abbildung 13 gezeigten experimentellen Anordnung der GP-Wert als Funktion der Temperatur bestimmt, welcher in Abbildung 39 b) dargestellt ist. Zunächst fällt auf, dass GP über den gesamten Temperaturbereich gegenüber der Referenz ohne Nanopartikel-Exposition erhöht ist. Dieser Effekt könnte auf eine Reduktion der Membranhydratisierung bei der Adsorption von Nanopartikeln zurückzuführen sein. Die Anlagerung des Partikels an die Membran bewirkt eine Verdrängung des Wassers bis auf eine dünne Schicht von wenigen immobilen, strukturierten Wassermolekülen [76]. Außerdem ist eine Verschiebung des Phasenübergangs indiziert durch den steilen Abfall von GP zu höheren Temperaturen zu beobachten. Selbiges zeigt sich in der negativen Ableitung  $-dGP/dT$  in Abbildung 39 c), welche auch eine Verschiebung des Maximums zu höheren Temperaturen zeigt.

Die Schmelzpunkterhöhung, welche sich auch leicht in der kalorimetrischen Messung in Abbildung 39 a) zeigt, fand bereits in der Literatur Erwähnung und wurde auf eine Reduktion der Mobilität der Lipide zurückgeführt, an welche die Nanopartikel adhären [77]. Abgesehen von der Verschiebung der Hauptphasenumwandlung konnte durch optische Analyse auch das kleinere lokale Maximum, welches durch die Membrankrümmung induziert wird, detektiert werden, wie die Vergrößerung in Abbildung 39 c) zeigt.

Die Exposition zu Lipidnanopartikeln wirkt sich demnach auf dreierlei verschiedene Arten auf die optische Messung der Lipidordnung von synthetischen Membranen aus: Der GP-Wert wird wahrscheinlich unabhängig von der Lipidordnung durch Reduktion der Membranhydratisierung erhöht. Die Schmelztemperatur verschiebt sich zu höheren Temperaturen, was eine Erhöhung der Lipidordnung indiziert. Die Umhüllung von Nanopartikeln und die damit einhergehende Membrankrümmung reduziert die Lipidordnung und bewirkt einen schwach ausgeprägten Phasenübergang von etwa 3 K unterhalb der eigentlichen Schmelztemperatur  $T_m$ .

Der zuletzt genannte Effekt konnte erst durch die Separation der lipidumhüllten Nanopartikel von freien Membranen durch Zentrifugierung und anschließender Abnahme des Überstands detektiert werden. Bei der Charakterisierung biologischer Membranen im nächsten Kapitel wurde eine solche Aufkonzentrierung nicht vorgenommen.

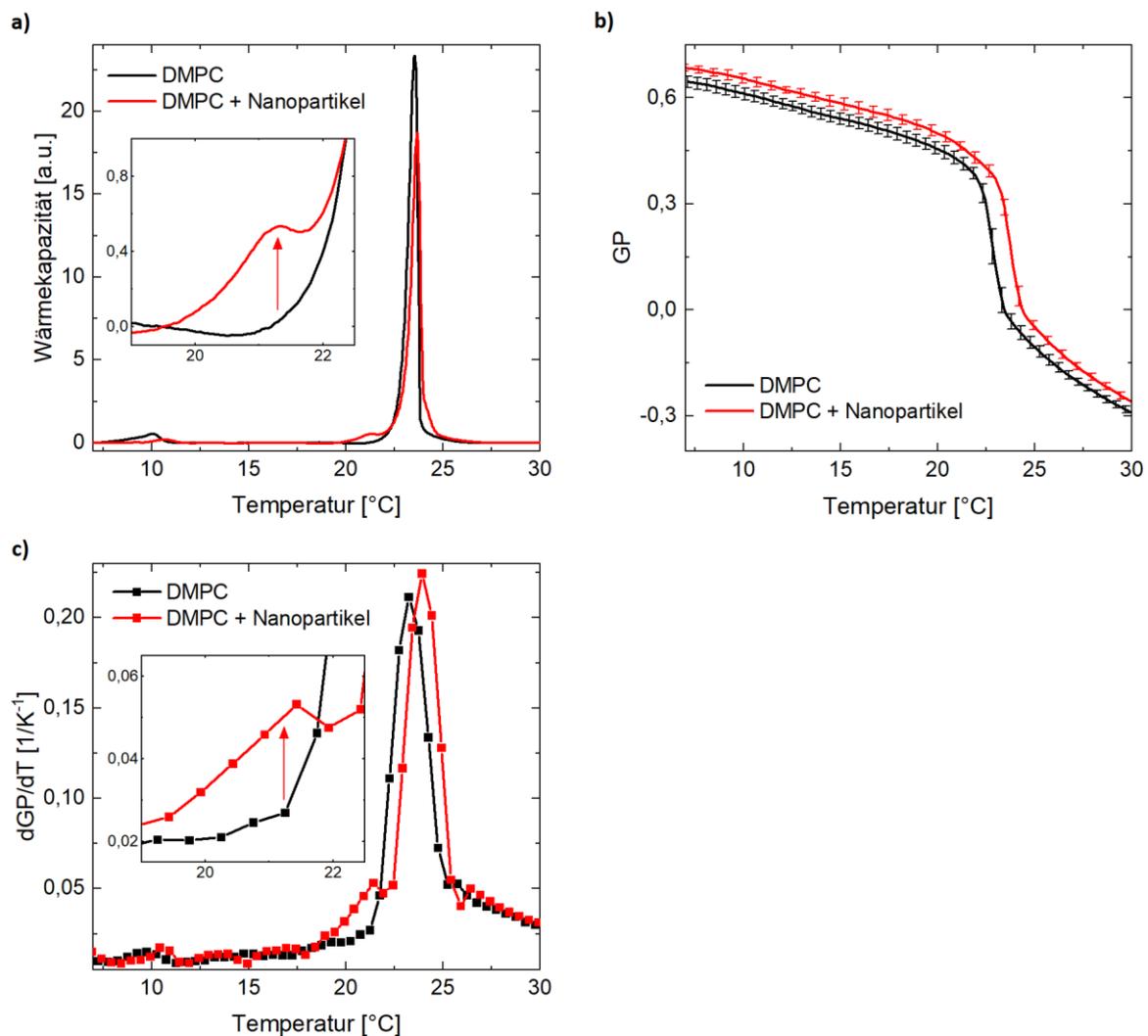


Abbildung 39 Auswirkungen der Nanopartikelexposition auf den Phasenzustand synthetischer Membranen. **a)** Wärmekapazität als Funktion der Temperatur von multilamellaren Vesikeln aus DMPC. Die Exposition der Vesikel zu  $d = 80$  nm großen Nanopartikeln in einem Oberflächenverhältnis von  $1 : 10$  ( $A_{\text{Nanopartikel}} : A_{\text{Vesikel}}$ ) für 24 Stunden bewirkt einen zusätzlichen Phasenübergang der Lipide unterhalb der eigentlichen Schmelztemperatur  $T_m$ . **b)** GP als Funktion der Temperatur der mit Laurdan gefärbten Lipidsysteme aus a). Die Nanopartikelexposition bewirkt eine Zunahme von GP und Verschiebung des Schmelzpunkts zu höheren Temperaturen. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung dreier unabhängiger Experimente. **c)** Negative Ableitung des GP-Werts einer beispielhaften Messung an DMPC-Vesikeln vor und nach der Nanopartikelzugabe. Neben der Schmelzpunkterhöhung der Hauptphasenumwandlung ist ein zweiter kleinerer Übergang wie im Wärmekapazitätsprofil in a) zu erkennen.

#### 4.4.2. Phasenzustandsänderungen induziert durch Nanopartikel in Zellsuspensionen

Analog zur Charakterisierung synthetischer Membranen im vorherigen Abschnitt soll in diesem Kapitel untersucht werden, inwieweit die Lipidordnung zellulärer Membranen durch Exposition von Kieselgel-Nanopartikeln beeinflusst wird. Dazu wurden  $d = 80$  nm große Nanopartikel für 24 Stunden in einer Konzentration von 1 mg/ml zum Kulturmedium adhärenter HeLa-Zellen gemischt. Nach der Anfärbung mittels Laurdan (siehe Kapitel 3.1.2) und der anschließenden Ablösung der Zellen vom Substrat mittels des Enzyms Trypsin, wurde die Zellsuspension im gleichen Versuchsaufbau (siehe Abbildung 13) wie die multilamellaren Vesikel charakterisiert. Das Ergebnis der GP-Messung als Funktion der Temperatur ist in Abbildung 40 a) dargestellt.

Ähnlich zur Messung der Lipidordnung an Vesikeln in Abbildung 39 b) ist nahezu über den gesamten Temperaturbereich eine Erhöhung des GP-Werts durch Nanopartikelexposition zu beobachten, wobei der Effekt bei höheren Temperaturen stärker ausfällt. Auch bei Zellmembranen könnte dieser Effekt durch eine Reduktion der Membranhydrierung durch Nanopartikelkontakt bedingt sein, wie in Kapitel 4.4.1 diskutiert. Die Phasenübergangstemperatur, indiziert durch das Maximum der Ableitung  $-dGP/dT$  in Abbildung 40 b), verschiebt sich um etwa 4 K zu höheren Temperaturen. Auch diese Beobachtung steht im Einklang mit denen an synthetischen Membranen (siehe Abbildung 39 c)).

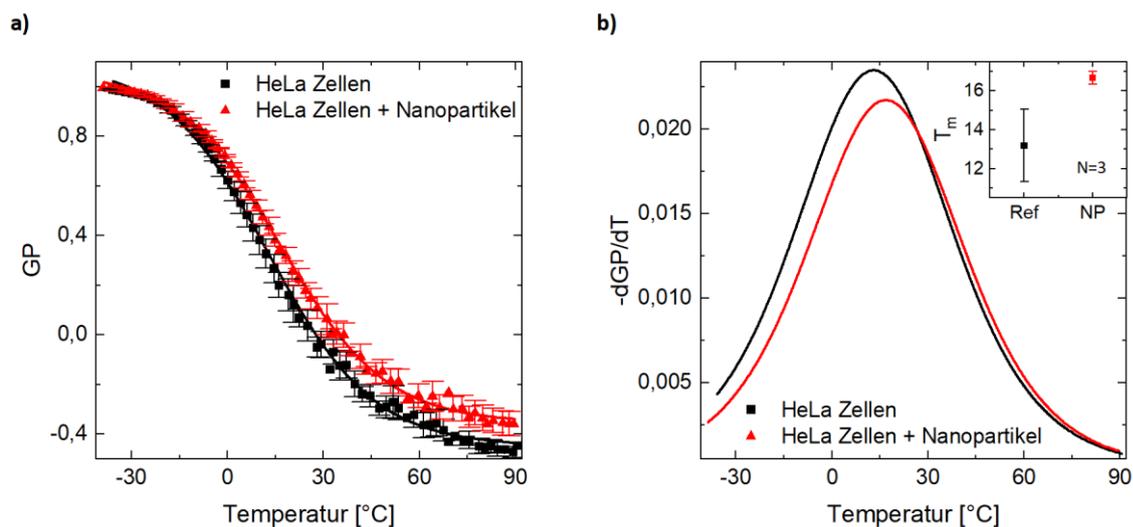


Abbildung 40 Auswirkungen der Nanopartikelexposition auf den Phasenzustand von HeLa-Zellsuspensionen. a) GP als Funktion der Temperatur von HeLa-Zellmembranen. Die Exposition zu  $d = 80$  nm großen Kieselgel-Nanopartikeln für 24 Stunden bei einer Konzentration von 1 mg/ml bewirkt eine Erhöhung des GP-Werts vor allem bei hohen Temperaturen. Die einzelnen Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte dreier unabhängiger Messungen, während die Fehlerbalken die jeweilige Standardabweichung angeben. b) Negative Ableitung des GP-Werts der Daten aus a). Der Phasenübergang zellulärer Membranen wird durch Nanopartikelexposition um etwa 4 K zu höheren Temperaturen verschoben.

Die Untersuchung der Auswirkungen von Nanopartikel-Exposition auf die Lipidordnung von Brustkrebszellen im Rahmen einer kürzlich veröffentlichten Studie ergab ebenfalls eine Nanopartikel-induzierte Zunahme der Lipidordnung [78]. Außerdem wurde eine Zunahme der intrazellulären Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies beobachtet. Diese können in Kombination mit ungesättigten Fettsäuren eine radikalische Kettenreaktion initiieren, die sogenannte Lipidperoxidation, welche wiederum die Lipidordnung zellulärer Membranen erhöht und mit hoher Wahrscheinlichkeit in neurodegenerativen Erkrankungen involviert ist [40,79–81]. Die Erhöhung der Schmelztemperatur in Abbildung 40 b) könnte daher auch indirekt durch oxidativen Stress hervorgerufen worden sein.

#### 4.4.3. Phasenzustandsänderungen und Transportmessungen an adhärennten Zellen

Die Untersuchungen der vorigen beiden Kapitel haben gezeigt, dass der endozytische Aufnahmeprozess von Kieselgel-Nanopartikeln in unterschiedlicher Art und Weise die Ordnung von Lipidmembranen beeinflusst. Da der Prozess selbst von den Größen Membranspannung, Membranbiegesteifigkeit und Membranadhäsion abhängt (siehe Kapitel 2.3), welche wiederum alle Funktionen der Lipidordnung darstellen, lässt sich kaum eine Vorhersage über die Abhängigkeit des Nanopartikeltransports in Zellmembranen treffen. Deswegen wurden mithilfe fluoreszierender Nanopartikel und dem Membranfarbstoff Laurdan die Lipidordnung und der Nanopartikeltransport simultan gemessen (siehe 3.5.1 und 3.5.2).

Auch wenn mittels Epifluoreszenz-Mikroskopie nicht eindeutig zwischen an der Membran adsorbierten und tatsächlich in das Zellinnere aufgenommen Nanopartikeln unterschieden werden kann, belegen Messungen mittels Konfokalmikroskopie und Transmissionselektronenmikroskopie, dass Kieselgel-Nanopartikel durch Endozytose von Zellen aufgenommen werden [82–84]. Außerdem erfolgte nach 10-minütiger Nanopartikelexposition das mehrmalige Spülen der adhärennten Zellen mit Phosphatpuffer, um die Menge nicht aufgenommenen Nanopartikel vor der mikroskopischen Analyse zu reduzieren. Die mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgenommenen Bilder von mit Laurdan gefärbten HeLa-Zellen vor und nach dem Kontakt mit rot fluoreszierenden Nanopartikeln sind in Abbildung 41 a) und b) dargestellt. Der rote Kanal zeigt Intensitäten in Bereichen der Zellmembranen und auch in direkter Umgebung. Vereinzelt ist auch Fluoreszenz von Nanopartikeln in zellfreien Flächen erkennbar, woraus geschlossen werden kann, dass durch den Spülprozess nicht alle adsorbierten Partikel entfernt wurden. Eine Anhaftung an nur schwach fluoreszierende Membranausläufer in scheinbar zellfreien Flächen ist jedoch auch möglich.

Abbildung 41 c) und d) zeigen die pixelweise Berechnung des GP-Werts vor und nach dem Kontakt zu Nanopartikeln aus den darüber abgebildeten Fluoreszenzaufnahmen. Der Vergleich beider GP-Bilder zeigt, dass die Lipidordnung der meisten Zellmembranen durch Nanopartikelexposition erhöht wurde. Genauer quantifiziert ist dieser Effekt in Abbildung 41 e), in welcher die Verteilungen der GP-Werte einzelner Zellmembranen vor und nach der Zugabe der Partikel dargestellt sind. Es ist eine deutliche Verschiebung des Schwerpunkts der Verteilung hin zu höheren GP-Werten erkennbar. Die Lipidordnung adhärennter Zellen nimmt also, wie schon bei der Messung von Zellsuspensionen beobachtet (siehe Abbildung 39 b)), durch den Kontakt zu Nanopartikel zu. Interessanterweise verschiebt sich die linke Flanke der Verteilung stärker als die rechte, was durch eine stärkere Zunahme der Lipidordnung von Zellmembranen mit ursprünglich niedrigem GP-Wert erklärt werden kann.

Die Analyse der durch Nanopartikel induzierten GP-Änderung als Funktion des initialen GP-Werts in Abbildung 41 f) bestätigt diese Beobachtung, da  $\Delta GP$  mit zunehmendem initialen GP abnimmt. Des Weiteren ist die Fluoreszenzintensität als Maß für die aufgenommene Menge an Nanopartikeln als Funktion des GP-Werts vor der Nanopartikelexposition abgebildet. Überraschenderweise ist die Nanopartikelintensität für Zellen mit hoher Lipidordnung am stärksten ausgeprägt, obwohl für selbige Zellen die geringste Änderung der Lipidordnung durch Nanopartikelinteraktion gemessen wurde. Die Unabhängigkeit von  $\Delta GP$  von der aufgenommenen Stoffmenge, welche bereits bei der Exposition zu Rhodamin B (siehe Abbildung 32 b)) beobachtet wurde, deutet daraufhin, dass eine lokal erhöhte Nanopartikelkonzentration durch Adsorption an der Membran vorliegen könnte. Abgesehen davon besteht die Möglichkeit der Interferenz zwischen beiden Fluorophoren beispielsweise durch FRET. Ein Energieübertrag von Laurdan auf die rot fluoreszierenden Nanopartikel könnte die Messung der Lipidordnungsphasenzustandsabhängig beeinflussen.

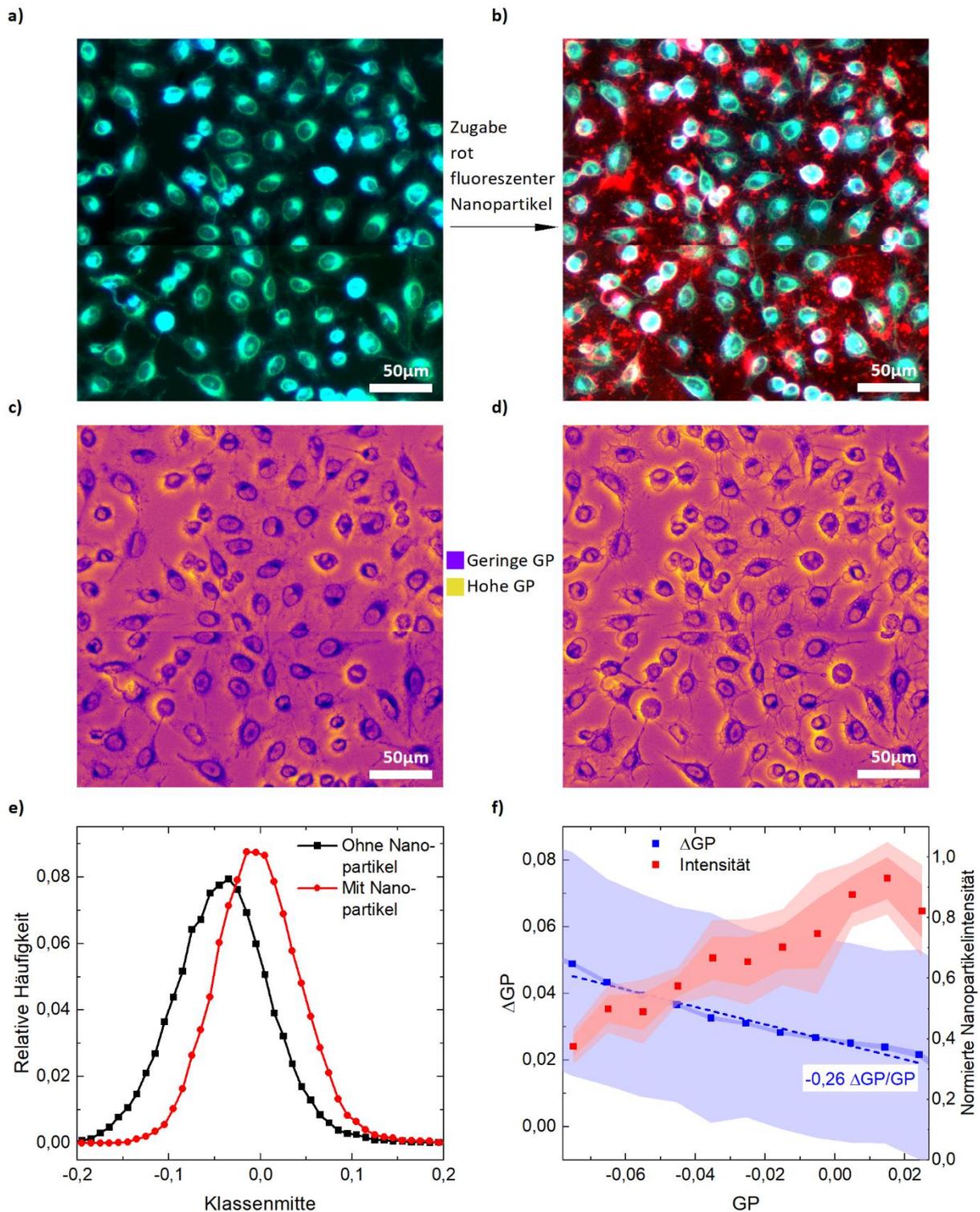


Abbildung 41 Abhängigkeit des Transports von fluoreszenten Kieselgel-Nanopartikeln von der zellulären Lipidordnung. **a)** Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme von mit Laurdan gefärbten HeLa-Zellen. **b)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Zellen aus **a)** nach 10-minütiger Exposition zu rot fluoreszierenden  $d = 80$  nm großen Nanopartikeln bei einer Konzentration von 1 mg/ml. **c)** Pixelweise berechnete GP-Werte der fluoreszenten Aufnahme aus **a)**. Niedrige GP-Werte sind bläulich, hohe gelblich dargestellt. **d)** Pixelweise berechnete GP-Werte der fluoreszenten Aufnahme aus **b)**. Im Vergleich zu **c)** bewirkt die Zugabe von Nanopartikeln insgesamt eine Erhöhung der zellulären GP-Werte. **e)** Verteilung der GP-Werte innerhalb einer Zellpopulation vor und nach dem Kontakt zu Kieselgel-Nanopartikeln. Die Exposition bewirkt eine Verschiebung zu höheren Werten, also eine Erhöhung der Lipidordnung. Die linke Flanke der Verteilung wird dabei stärker verschoben als die rechte, wodurch auf eine stärkere Beeinflussung von Zellmembranen mit geringer Lipidordnung geschlossen werden kann. **f)** GP-Wert-Änderung und Fluoreszenzintensität der Nanopartikel als Funktion des GP-Werts vor der Nanopartikelexposition. Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert einzelner zellulärer GP- und Intensitätswerte aus drei unabhängigen Experimenten mit insgesamt mehr als 30.000 Zellen. Die Standardabweichung wird durch das helle, der Fehler des Mittelwerts durch das dunkle

transparente Band indiziert. Obwohl Zellen mit hohem GP-Wert mehr Nanopartikel-Intensität aufweisen, fällt die induzierte GP-Änderung geringer als bei Zellen mit anfänglich geringerer Lipidordnung aus. Der Effekt der Nanopartikelinduzierten Lipidordnungsänderung wurde durch lineare Approximation quantifiziert:  $-0,26 \Delta GP/GP$

Um optische Wechselwirkungen auszuschließen, wurde das Experiment mit nicht fluoreszierenden Kieselgel-Nanopartikeln wiederholt. Die GP-Verteilungen der Zellen des Referenzexperiments vor und nach dem Kontakt zu Nanopartikeln ist in Abbildung 42 a) dargestellt. Wie Abbildung 41 e) zeigt, ist eine asymmetrische Verschiebung der Verteilung hin zu höheren GP-Werten zu beobachten. Die GP-Werte zellulärer Membranen sind wiederholt stärker verschoben als die von Zellen mit anfänglich geringerer Lipidordnung. Die Analyse der Nanopartikel-bedingten Änderung der Lipidordnung als Funktion des initialen Phasenzustands ist in Abbildung 42 b) dargestellt. Ähnlich zum Resultat aus Abbildung 41 f) ist eine monotone Abnahme der Lipidordnungsänderung  $\Delta GP$  als Funktion von GP zu beobachten. Die Effektstärke  $\Delta GP/GP$  liegt in der gleichen Größenordnung wie im Experiment mit fluoreszenten Nanopartikeln, weshalb die zuvor beschriebenen Effekte nicht durch eine Wechselwirkung zwischen zwei Fluorophoren bedingt sein kann.

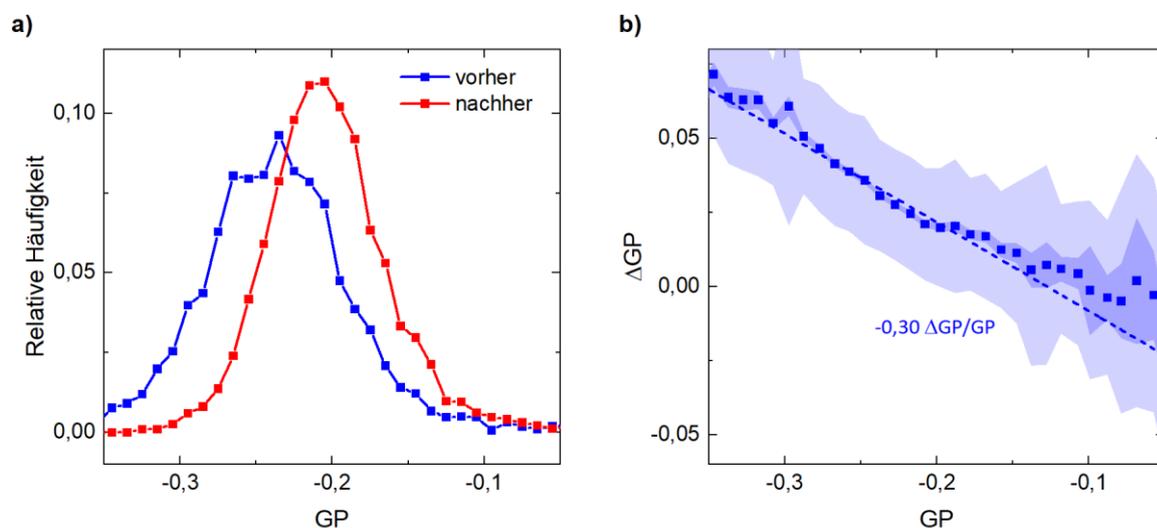


Abbildung 42 Änderungen der Lipidordnung in Membranen von HeLa-Zellen durch den Kontakt zu nicht fluoreszierenden Kieselgel-Nanopartikeln. a) Verteilung der GP-Werte innerhalb einer Zellpopulation vor und nach dem Kontakt zu nicht fluoreszierenden Kieselgel-Nanopartikeln. Es ist eine Beeinflussung der Lipidordnung analog zu den Messungen mit fluoreszenten Nanopartikeln in Abbildung 41 e) zu erkennen. b) GP-Wert-Änderungen in HeLa-Zellmembranen durch Exposition zu nicht fluoreszierenden Kieselgel-Nanopartikeln. Wie bereits in Abbildung 41 f) dargestellt, induziert der Kontakt zu Nanopartikeln eine ausgeprägtere Änderung der Lipidordnung bei zellulären Membranen mit initial geringerem GP-Wert. Die beobachteten Effekte sind demnach kein Artefakt einer Wechselwirkung von Laurdan mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff der Partikel in den Experimenten aus Abbildung 41.

Der endozytotische Transport von Kieselgel-Nanopartikeln wirkt sich auf die Lipidordnung zellulärer Membranen ähnlich aus wie auf Membranen des Modellsystems der Lipidvesikel. Durch 24-stündige Exposition, während derer nach [82–84] eine endozytotische Aufnahme von Kieselgel-Nanopartikeln erfolgt sein muss, erhöht sich der GP-Wert über einen weiten Temperaturbereich und es wird eine Schmelzpunkterhöhung also eine Zunahme der Lipidordnung induziert. Eine erhöhte Lipidordnung bewirkt wiederum nach den Erkenntnissen aus Kapitel 4.3 eine gesteigerte Membranpermeabilität. In diesem Kontext könnte die Lipidordnung als potentielle Ursache der erhöhten Permeabilität zellulärer Membranen nach Nanopartikelexposition, welche beispielsweise an der Blut-Hirnschranke, dem Darm und an neuronalen Membranen beobachtet wurde, identifiziert werden [85–87].

Die Toxizität von Kieselgel-Nanopartikeln ist Gegenstand aktueller Studien und steht unter anderem auch in Zusammenhang mit Veränderungen der mechanischen Eigenschaften zellulärer Membranen,

welche wiederum stark mit der Lipidordnung korrelieren [88]. Demnach könnte die schädliche Wirkung von Kieselgel-Nanopartikeln teilweise auf deren Wechselwirkung mit der Lipidordnung zurückzuführen sein. Die Untersuchung der Auswirkungen des endozytotischen Transports von Lipidnanopartikeln an einzelnen Zellen hat gezeigt, dass besonders die Lipidordnung von Zellen mit einem geringen GP-Wert beeinflusst wird. Demnach sind die Membran-Nanopartikel-Wechselwirkung und eine potentiell zellschädigende Wirkung selektiv und könnten unterschiedliche Arten von Gewebe in veränderter Maße betreffen.

Die Fluoreszenzintensität der Nanopartikel an der jeweiligen Zellmembran in Abbildung 41 b) muss nicht ausschließlich durch endozytotische Aufnahme ins Zellinnere bedingt sein, da auch an der Membran adsorbierte Partikel zum Messsignal beitragen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass eine hohe Zahl adsorbierter Partikel letztendlich auch zu erhöhtem endozytotischem Transport führt. Wenn also wie in Abbildung 41 f) der Transport von Lipidnanopartikeln von der Lipidordnung zellulärer Membranen abhängt, sollte dies bei der Entwicklung neuartiger Medikamente berücksichtigt werden, da Kieselgel-Nanopartikel seit einiger Zeit als Träger pharmazeutischer Wirkstoffe verwendet werden [89]. So wäre es zum Beispiel möglich gezielt Gewebe zu behandeln, welche sich in ihrer Lipidordnung von anderen unterscheiden.

#### 4.4.4. Fazit

- Die Aufnahme von Nanopartikeln in synthetische Lipidvesikel bewirkt phasenzustandsunabhängig eine Erhöhung des GP-Werts, ein zusätzliches weniger kooperatives Membranschmelzen unterhalb der eigentlichen Schmelztemperatur und eine Verschiebung des Hauptphasenübergangs zu höheren Temperaturen.
- Die Aufnahme von Nanopartikeln in Zellsuspensionen durch 24-stündige Exposition induziert eine Erhöhung des Schmelzpunktes des kollektiven Phasenübergangs.
- Durch 10-minütigen Kontakt adhärenter Zellen zu Kieselgel-Nanopartikeln nimmt die Lipidordnung einzelner Zellmembranen zu, wobei die Phasenzustandsänderung für Zellen mit initial geringerem GP-Wert stärker ausgeprägt ist.
- Die Menge aufgenommener oder adsorbierter Nanopartikel nimmt mit steigender Lipidordnung zellulärer Membranen zu.

## 4.5. Phasenzustand und Membrantransport unter Scherfluss

Die vorangegangenen Untersuchungen der Lipidordnung und des Stofftransports erfolgten unter statischen Bedingungen, das heißt ohne Strömungseinflüsse der wässrigen Umgebung von Zellen oder Vesikeln. Speziell im menschlichen Körper sind Zellmembranen jedoch unentwegt mechanischen Stimuli beispielsweise durch muskuläre Bewegung oder strömendes Blut ausgesetzt. Letzterer Aspekt ist im Kontext des Stofftransports von besonderer Bedeutung, da über die Zellmembranen an der Schnittstelle zwischen Blut und Gewebe, dem Endothel, der Austausch verschiedenster Metabolite aber auch die Aufnahme einer Vielzahl von Therapeutika erfolgt. Der Einfluss strömender Flüssigkeiten auf die Lipidordnung und die Permeabilität zellulärer Membranen wurden bereits unabhängig voneinander untersucht. Beispielsweise bewirken durch Strömung induzierte Scherkräfte auf Endothelzellen eine Reduktion der Membranlipidordnung [90]. Die Permeabilität für Calcium-Ionen und verschiedene Dextrane wird hingegen unter Flussbedingungen gesteigert [91–93].

Abgesehen von der Relevanz für Stoffwechselprozesse im menschlichen Körper, wird die lipidordnungsabhängige Membranpermeabilität bei der Entwicklung von Liposomen genutzt, welche die gezielte Freisetzung von Therapeutika abhängig von der Temperatur oder dem pH-Wert ermöglicht [94,95]. Eine Abhängigkeit der Lipidordnung von den Strömungsbedingungen im Blutsystem muss bei der Entwicklung solcher Wirkstoffe berücksichtigt werden.

Bislang gibt es noch keine systematischen Studien, inwieweit der Phasenzustand von Lipidmembranen durch Scherfluss beeinflusst wird und welche Konsequenzen potenzielle Änderungen der Lipidordnung wiederum für die Membranpermeabilität haben. Deswegen wurden Messungen der Membranpermeabilität (siehe Kapitel 3.5.3) und Lipidordnungsmessungen unter Fluss bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.2). Die Messungen erfolgten am Modellsystem der unilamellaren Riesenvesikel, um eine Grundlage für zukünftige Untersuchungen an zellulären Membranen zu schaffen. Der Scherfluss wurde durch Pumpen einer Vesikelsuspension durch einen temperierten Polyethylenschlauch von  $d = 380 \mu\text{m}$  Durchmesser generiert (siehe Abbildung 19 a)). Die Permeabilität wurde durch Verlust von fluoreszenten Dextranmolekülen gemessen, mit welchen die Vesikel vor der Scherflusseexposition gefüllt waren (siehe Abbildung 19 d)). Zur Messung der Lipidordnung wurden Riesenvesikel mit Laurdan gefärbt und deren Emissionsspektren unter Strömungseinwirkung in einer temperierten Glaskapillare, welche in Abbildung 14 schematisch dargestellt ist, analysiert. Die beiden Größen Membranpermeabilität und Lipidordnung wurden in separaten Experimenten gemessen (siehe Abbildung 43 a) und b)), um eine Interferenz der jeweiligen Fluorophore zu vermeiden.

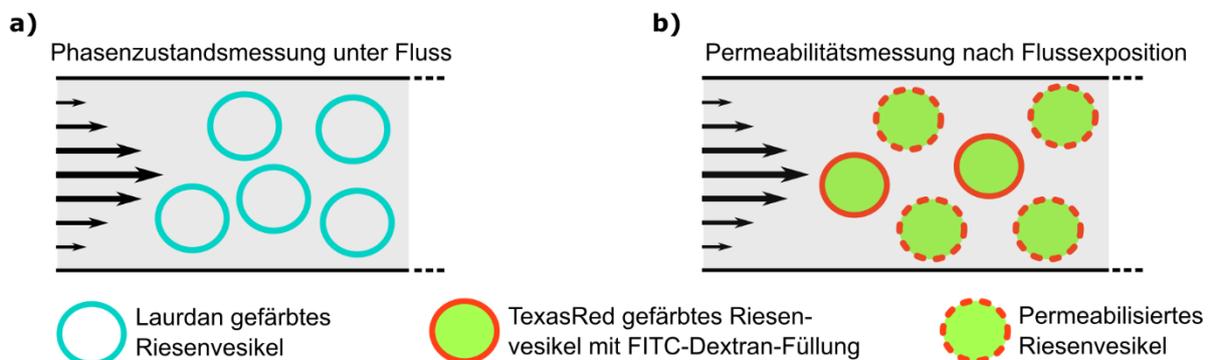


Abbildung 43 Messung der Lipidordnung und der Membranpermeabilität unilamellarer Riesenvesikel. a) Die Membranfärbung mittels Laurdan ermöglicht die Messung der Lipidordnung. b) Durch Messung des FITC-Dextran-Gehalts von Vesikeln, welche zur Lokalisierung auf Mikroskop Bildern mittels des Fluorophors Texas Red gefärbt sind, kann die Membranpermeabilität bestimmt werden.

Die Resultate des Kapitels 4.5. sind in der Arbeit „Shear stress induced lipid order and permeability changes of giant unilamellar vesicles“ von Nicolas Färber, Jonas Reitler, Andrej Kamenac und Christoph Westerhausen (Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects, 2022) publiziert [96].

#### 4.5.1. Permeabilität unter Scherfluss nahe eines Phasenübergangs

Die Abhängigkeit der Membranpermeabilität von der Lipidordnung wurde für alle Phasenzustände der Membran charakterisiert, also unterhalb, oberhalb und direkt an der Schmelztemperatur. Dafür wurden zunächst Vesikel bestehend aus 15:0 PC verwendet, welche eine Phasenübergangstemperatur von  $T_m = 34,5\text{ °C}$  aufweisen, wie sie durch das Maximum des Wärmekapazitätsprofils in Abbildung 44 b) indiziert wird. Die mittels Fluoreszenzmikroskopie gemessene Verteilung der intravesikulären FITC-Dextran Intensität von 15:0 PC Vesikeln nach der Scherflusseexposition bei verschiedenen Temperaturen und einer Schergeschwindigkeit von  $\dot{\gamma}_{\max} = 515\text{ s}^{-1}$  ist in Abbildung 44 a) gezeigt. Vesikel, welche den Schlauch bei einer Temperatur von  $T = 29\text{ °C}$  passierten und demnach während der Scherflusseinwirkung in der Gelphase waren, weisen zum größten Teil eine hohe FITC-Dextran Intensität auf, woraus auf einen geringen Farbstoffverlust und eine niedrige Membranpermeabilität geschlossen werden kann. Während der Scherung bei  $T = 34\text{ °C}$ , also knapp unterhalb der Schmelztemperatur, scheint dagegen eine leicht erhöhte Permeabilisierung aufgetreten zu sein, da ein zweites lokales Maximum der entsprechenden Verteilung bei niedrigeren Intensitäten zu beobachten ist, was entleerten Vesikeln zuzuordnen ist. Die weitere Erhöhung der Temperatur um ein Kelvin auf  $T = 35\text{ °C}$ , also knapp oberhalb der Schmelztemperatur in der fluiden Phase, bewirkt eine drastische Zunahme der Anzahl von Vesikeln mit geringer FITC-Dextran-Intensität in Abbildung 44 a). Nach einer Scherung bei  $T = 37\text{ °C}$  sind kaum noch Vesikel mit hoher Intensität vorhanden, sodass auf eine starke Permeabilisierung der Lipidmembran geschlossen werden kann.

Das interessanteste Resultat ist, dass zwischen den beiden Maxima der Verteilungen bei hoher und niedriger Intensität in Abbildung 44 a) nahezu keine Vesikel zu finden sind. Der intravesikuläre Farbstoff ging also entweder vollständig oder überhaupt nicht verloren, was auf ein Alles-oder-Nichts Verhalten der Membranpermeabilität hindeutet. Dieses Phänomen ist auch auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 44 c) zu erkennen. Obwohl alle Vesikel bei der gleichen Temperatur durch den Schlauch flossen, verhalten sie sich hinsichtlich der Permeabilität komplett unterschiedlich. Die einzige Größe, welche innerhalb des Schlauchs abhängig von der Position zwischen Zentrum und Schlauchwand variiert, ist die Schergeschwindigkeit, welche im Zentrum null und am Rand maximal ist. Demnach müssen die Unterschiede in der Membranpermeabilität durch variierende Schergeschwindigkeiten bedingt sein. Die Frage, ob Scherkräfte die Lipidordnung beeinflussen und in Konsequenz daraus die Membranpermeabilität oder ob sie direkt auf die Permeabilität Einfluss nehmen, wird im nächsten Kapitel diskutiert.

Durch Definition eines Intensitätsschwellwerts zwischen den Intensitäten von permeabilisierten und unbeeinflussten Vesikeln, wie er in Abbildung 44 a) als gestrichelte Linie indiziert ist, kann die Vesikelpopulation in zwei Klassen aufgeteilt werden: Vesikel mit geringer FITC-Dextran-Intensität heißen „leer“, alle anderen oberhalb des Schwellwerts werden im Weiteren „voll“ genannt. Der prozentuale Anteil leerer Vesikel kann als Maß für die Permeabilisierung eines Vesikelensembles verwendet werden und ist in Abbildung 44 b) als Funktion der bei der Scherflusseexposition vorherrschenden Temperatur für drei verschiedene Flussraten dargestellt.

Unabhängig von der Flussrate ist eine sprunghafte Zunahme der Permeabilität am Phasenübergang zu erkennen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Studien, welche die

Membranpermeabilität von Vesikeln unter statischen Bedingungen untersucht haben. Sie fanden eine erhöhte Permeabilität bei der Schmelztemperatur und erklären ihre Beobachtung durch Porenbildung am Phasenübergang aufgrund einer gesteigerten Flächenkompressibilität und erhöhten Membranflächenfluktuationen [33,97,98]. Die Größe solcher Poren variiert unter statischen Bedingungen zwischen 0,8 nm und 1,6 nm und sollte daher das Ausdiffundieren des in dieser Studie verwendeten FITC-Dextrans mit einem hydrodynamischen Radius von 2,3 nm ausschließen [33,99]. Unter Einwirkung äußerer Kräfte wie etwa mechanische Spannung oder elektrische Felder können sich jedoch Poren mit einem Durchmesser von einigen Mikrometern bilden und wieder schließen [100,101]. Der beobachtete Farbstoffverlust kann demnach durch am Phasenübergang thermodynamisch induzierte Poren erklärt werden, welche durch die Einwirkung von Scherkräften vergrößert wurden und so die Diffusion von FITC-Dextran über die Membran hinweg ermöglicht haben.

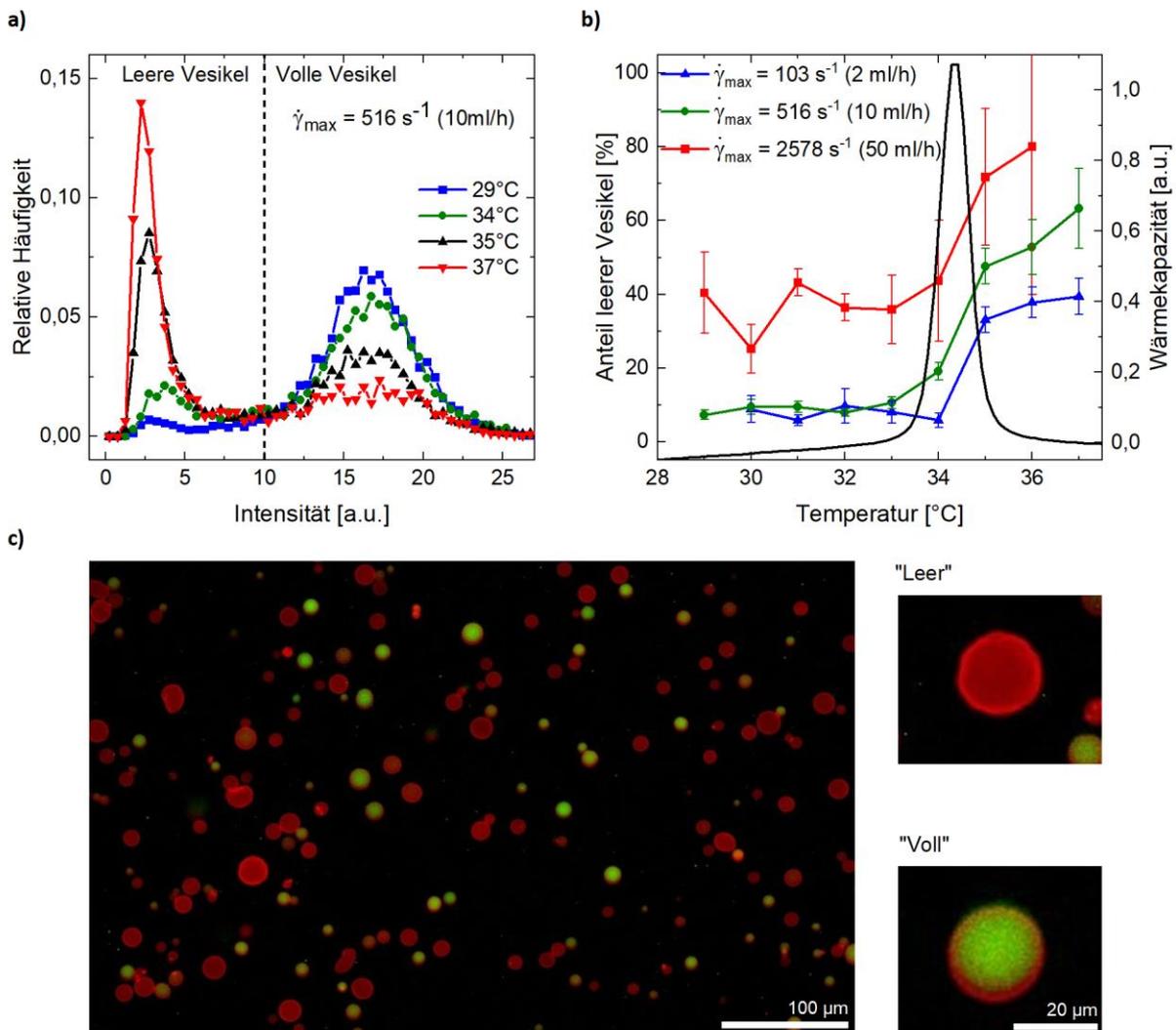


Abbildung 44 Permeabilitätsmessungen an unilamellaren Riesenvesikeln aus 15:0 PC-Lipiden nahe des Phasenübergangs [96]. **a)** Histogramme der intravesikulären FITC-Dextran-Intensität nach einer Exposition zu Scherkräften bei verschiedenen Temperaturen unter und überhalb der Schmelztemperatur  $T_m = 34,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die aus der Flussrate 10 ml/h resultierende maximale Schergeschwindigkeit betrug  $\dot{\gamma}_{\max} = 516 \text{ s}^{-1}$ . Für jedes Histogramm wurden etwa 3000 Vesikel analysiert. Nach einer Scherung unterhalb der Phasenübergangstemperatur weisen die meisten Vesikel eine hohe Intensität auf, was einen geringen Verlust von FITC-Dextran bedeutet und eine geringe Membranpermeabilität indiziert. In der fluiden Phase fällt die Permeabilisierung dagegen höher aus, sodass die meisten Vesikel eine geringe Intensität aufweisen. Die Definition eines Schwellerts (gestrichelte Linie) ermöglicht die Differenzierung zwischen „vollen“ und „leeren“ Vesikeln. **b)** Der Anteil leerer Vesikel an der gesamten Vesikelzahl ist als Maß für die Permeabilisierung durch Scherkräfte gegen die Temperatur für drei verschiedene Flussraten aufgetragen. Die Fehlerbalken indizieren die Abweichung des Anteils leerer Vesikel bei einer Variation des Schwellerts um 5%. Es wurden 3 unabhängige Experimente mit jeweils etwa 20.000 Vesikeln durchgeführt. Das Maximum der

*Wärmekapazitätsmessung indiziert den Phasenübergang der Membranen. Für alle Flussraten ist eine sprunghafte Zunahme der Vesikelpermeabilität bei der Schmelztemperatur zu sehen. c) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Vesikeln nach der Exposition zu Scherfluss, deren Membran mit Texas Red (rot) gefärbt ist und welche vor dem Experiment mit fluoreszierendem FITC-Dextran gefüllt waren (grün). Es sind zwei verschiedene Arten von Vesikeln zu erkennen: Einige haben ihre Ladung verloren und werden deshalb als „leer“ klassifiziert. Andere zeigen keinen Verlust von FITC-Dextran und können als „voll“ bezeichnet werden.*

Der Einfluss der Schergeschwindigkeit auf die Permeabilisierung der Vesikelmembranen zeigt sich bei Erhöhung der Flussrate von 2 ml/h auf 10 ml/h in Abbildung 44 b). Während unterhalb des Phasenübergangs kein Unterschied der Membranpermeabilität erkennbar ist, nimmt der Anteil leerer Vesikel bei  $T = 37\text{ °C}$  um etwa 60% zu. Die Zunahme der Schergeschwindigkeit von  $\dot{\gamma}_{\max} = 103\text{ s}^{-1}$  auf  $\dot{\gamma}_{\max} = 516\text{ s}^{-1}$  entspricht in etwa dem Übergang des venösen Blutflusses ( $1\text{-}6\text{ dyn/cm}^2 \approx 36\text{-}214\text{ s}^{-1}$ ) in das arterielle Blutsystem ( $10\text{-}70\text{ dyn/cm}^2 \approx 357\text{-}2500\text{ s}^{-1}$ ) [102]. Ein Liposom als Wirkstoffträger würde bei einem Wechsel zwischen diesen Flussregimen seine Ladung verlieren. Aus der erhöhten Permeabilität oberhalb der Schmelztemperatur  $T_m = 34,5\text{ °C}$  kann abgeleitet werden, dass die Porenbildung in der fluiden Phase erleichtert ist, was auf eine im Vergleich zur Gelphase reduzierte Flächenkompressibilität zurückgeführt werden kann.

Durch weitere Erhöhung der Flussrate auf  $\dot{\gamma}_{\max} = 2578\text{ s}^{-1}$  ist die Permeabilität auch unterhalb der Schmelztemperatur erhöht, was darauf hindeutet, dass ein gewisser Schwellwert überwunden werden muss, um Poren in der Gelphase zu erzeugen. Schergeschwindigkeiten über  $\dot{\gamma}_{\max} = 2500\text{ s}^{-1}$  entsprechen pathologischen Flussbedingungen, wie einer arteriellen Stenose [103], welche aufgrund der erhöhten Vesikelpermeabilität in der Gel- und der fluiden Phase zu einer ungewollten Freisetzung von Thermo-responsiven Liposomen führen könnte. Außerdem bewirken solch hohe Flussraten eine morphologische Veränderung der Vesikel, was aus dem Vergleich der Vesikelgrößen in Abbildung 45 a) geschlossen werden kann. Dargestellt sind die mittleren Vesikeldurchmesser und deren Standardabweichung nach der Scherflussbehandlung ober- und unterhalb der Phasenübergangstemperatur bei drei verschiedenen Flussraten.

Für alle Flussraten erscheint die Gelphase hinsichtlich des Durchmessers im Vergleich zu einer statischen Kontrollmessung stabiler zu sein. Die Größenreduktion fällt für eine Schergeschwindigkeit von  $\dot{\gamma}_{\max} = 2578\text{ s}^{-1}$  am stärksten aus, sodass der mittlere Vesikeldurchmesser nur noch etwa 60 % einer unbehandelten Probe beträgt. Die zugehörigen Größenverteilungen sind in Abbildung 45 b) dargestellt. Die Exposition von Vesikeln zu einer Schergeschwindigkeit von  $\dot{\gamma}_{\max} = 2578\text{ s}^{-1}$  bei  $T = 36\text{ °C}$  führt zu einer Verschiebung der Verteilung von initial etwa  $10\text{ }\mu\text{m}$  zu einem mittleren Durchmesser von ca.  $d = 6\text{ }\mu\text{m}$ . Demnach könnte die Freisetzung des Farbstoffs im Rahmen der Experimente bei höchsten Flussraten und Temperaturen neben Porenbildung auch während der Vesikelteilung in kleinere Tochtervesikel stattgefunden haben.

Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen statischen Experimenten anderer Arbeitsgruppen, die ausschließlich eine Erhöhung der Membranpermeabilität von Vesikeln direkt am Phasenübergang beobachtet haben, deutet der Anteil leerer Vesikel in Abbildung 44 b) auch in der fluiden Phase auf eine erhöhte Permeabilität hin. Dieser Umstand könnte der experimentellen Umsetzung der Permeabilitätsmessung geschuldet sein, welche das Erwärmen der Vesikelsuspension von Raumtemperatur (ca.  $T = 22\text{ °C}$ ) auf die jeweilige Temperatur im Schlauch beinhaltet, gefolgt von einer erneuten Abkühlung auf Raumtemperatur nach Verlassen des Schlauchs. Deswegen durchliefen alle Vesikel, welche dem Scherfluss bei einer Temperatur oberhalb der Schmelztemperatur ausgesetzt waren, zwangsläufig zweimal einen Phasenübergang: Beim Aufwärmen von der Gelphase zur fluiden Phase und beim Abkühlen umgekehrt. Die dabei induzierten Poren könnten auch noch bei höheren Temperaturen stabil gewesen sein und den Ausstrom von intravesikulärem FITC-Dextran auch in der fluiden Phase ermöglichen, in welcher die Membranpermeabilität im Vergleich zum Phasenübergang reduziert sein sollte.

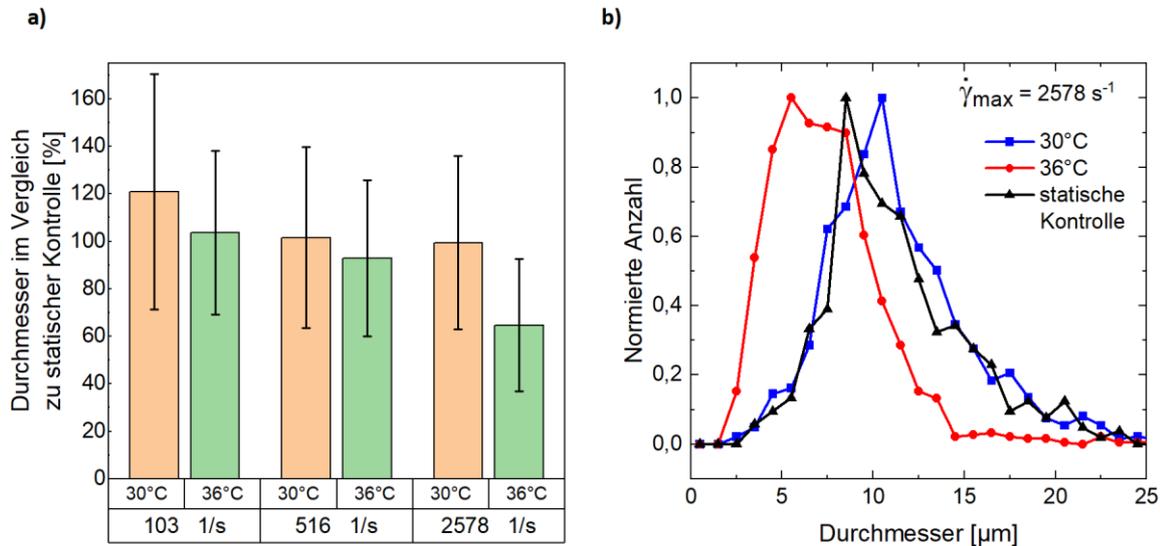


Abbildung 45 Phasenzustandsabhängige Auswirkung von Scherkräften auf die Vesikelgröße [96]. a) Mittlerer Durchmesser von 15:0 PC-Vesikeln nach Exposition zu Scherfluss bei verschiedenen Temperaturen in Prozent einer Kontrollmessung, welche keinen Scherkräften ausgesetzt war. Die Fehlerbalken indizieren die Standardabweichung innerhalb einer Vesikelprobe. Es wurden mindestens 2000 Vesikel pro Messung ausgewertet. Unabhängig von der Schergeschwindigkeit ist die mittlere Vesikelgröße bei  $T = 36^\circ\text{C}$ , also in der fluiden Phase, reduziert. Der Effekt ist am stärksten bei der höchsten Schergeschwindigkeit ausgeprägt. b) Verteilung des Vesikeldurchmessers nach einer Scherung bei  $T = 30^\circ\text{C}$  und  $T = 36^\circ\text{C}$  sowie eine statische Kontrollmessung. Die Schergeschwindigkeit betrug  $\dot{\gamma}_{\text{max}} = 2578 \text{ s}^{-1}$ . Gegenüber der Kontrollmessung, welche keinen Scherkräften ausgesetzt war, ist die Größenverteilung der Vesikel, welche in der fluiden Phase behandelt wurden, deutlicher zu niedrigeren Werten verschoben als die  $30^\circ\text{C}$  Messung.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde selbiges Experiment mit Riesenvesikeln bestehend aus 14:0 PC-Lipiden, welche eine Schmelztemperatur von  $T_m = 23,5^\circ\text{C}$  aufweisen, bei einer erhöhten Raumtemperatur von  $T = 25^\circ\text{C}$  wiederholt. Dadurch befanden sich die Vesikel bei Raumtemperatur in der fluiden Phase, sodass durch Scherflusseexposition im Schlauch bei  $T = 25^\circ\text{C}$  kein Phasenübergang durchlaufen wurde und die Permeabilität gering sein sollte. Der Vergleich der Permeabilität von Riesenvesikeln bestehend aus den Lipiden 14:0 PC und 15:0 PC, welche während der Exposition zu Scherkräften bei  $\dot{\gamma}_{\text{max}} = 516 \text{ s}^{-1}$  durchgehend in der Gel- oder fluiden Phase blieben bzw. Phasenübergänge der Art gel  $\rightarrow$  fluid  $\rightarrow$  gel oder fluid  $\rightarrow$  gel  $\rightarrow$  fluid durchliefen, ist in Abbildung 46 a) und b) dargestellt.

Für jedes Szenario wurden zwei verschiedene Maße für die Permeabilisierung verglichen: Die Zunahme der leeren Vesikel und der mittlere Verlust an FITC-Dextran-Intensität. Beide wurden in Bezug zu einer Referenz gesetzt, welche keinen Scherkräften ausgesetzt wurde. Beide Maße zeigen in Abbildung 46 a), dass ein Durchlaufen des Phasenübergangs zu einer erhöhten Permeabilisierung im Vergleich zu den Vesikeln führte, welche sich während der Dauer des Experiments durchgehend in der Gelphase befanden. In Abbildung 46 b) ist der Vergleich der verschiedenen Temperaturprofile des Experiments mit 14:0 PC-Vesikeln dargestellt. Sowohl die Zunahme des Anteils an leeren Vesikeln als auch die Reduktion der mittleren FITC-Dextran-Intensität indizieren, dass Vesikel, welche sich ausschließlich in der fluiden Phase während der Scherkraftexposition befanden, in geringerem Maße permeabilisiert wurden als Membranen, die den Phasenübergang in Richtung fluid  $\rightarrow$  gel  $\rightarrow$  fluid durchliefen. Demnach weisen Vesikelmembranen in der fluiden Phase auch unter Scherfluss eine geringere Permeabilität auf als am Phasenübergang. Die in Abbildung 44 b) dargestellte Stufenfunktion ist demnach Resultat der experimentellen Umsetzung der Scherflussanalyse und dem daraus resultierenden Temperaturprofil.

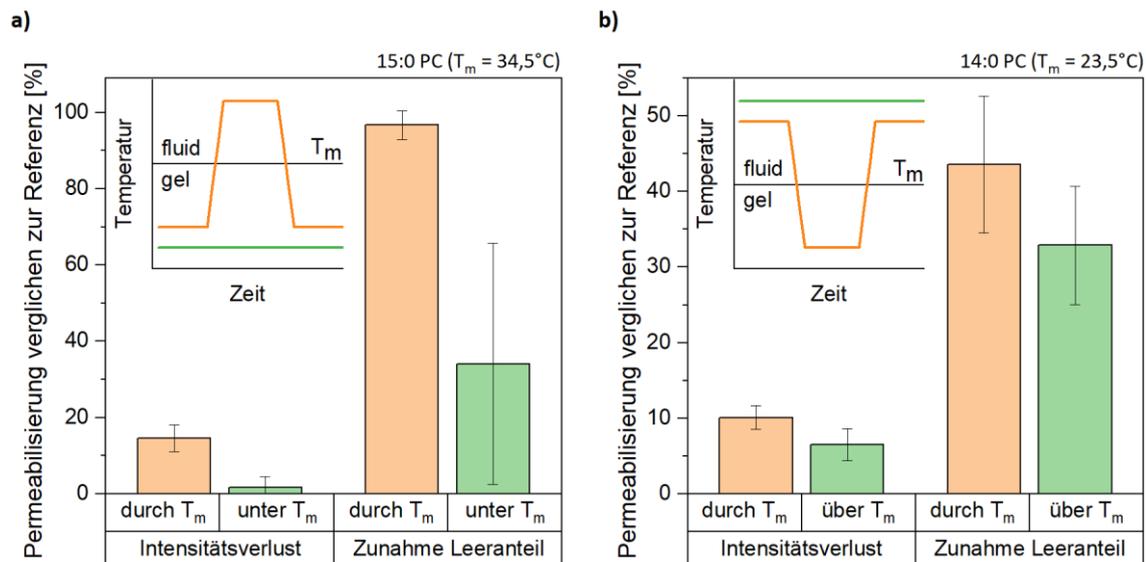


Abbildung 46 Permeabilität unilamellarer Riesenvesikel unter Scherfluss in der fluiden Phase, in der Gelphase und bei Durchlaufen des Phasenübergangs [96]. **a)** Der mittlere Intensitätsverlust durch Schereinwirkung von intravesikulärem FITC-Dextran und die Zunahme des Anteils leerer Vesikel als Maß für die Permeabilität der Membranen von 15:0 PC-Vesikeln. Beide Größen beziehen sich auf eine Referenzmessung ohne Schereinwirkung. Vor und nach der Exposition zu Scherkräften befinden sich die Vesikel bei Raumtemperatur in der Gelphase, weshalb sie abhängig von der Schlauchtemperatur immer in der Gelphase bleiben oder zweimal einen Phasenübergang durchlaufen (gel  $\rightarrow$  fluid  $\rightarrow$  gel). Beide Maße indizieren, dass die Permeabilität durch einen Phasenwechsel erhöht wird. **b)** Die Permeabilität von 14:0 PC-Vesikeln gemessen wie in a). Bei Raumtemperatur befanden sich die Vesikel in der fluiden Phase, sodass sie bei einer Schlauchtemperatur von  $T = 21^\circ\text{C}$ , also unterhalb von  $T_m = 23,5^\circ\text{C}$ , einen Phasenübergang durchliefen (fluid  $\rightarrow$  gel  $\rightarrow$  fluid) oder aber bei einer Temperatur von  $T = 25^\circ\text{C}$  immer fluid waren. Wie in a) ist die Permeabilität durch den Phasenwechsel erhöht gegenüber dem Szenario, in einer unveränderten Phase während des gesamten Experiments zu verbleiben.

Das bemerkenswerte Alles-oder-Nichts-Verhalten der Membranpermeabilität unter Scherfluss, welches sich im teils vollständigen teils kaum beobachtbaren Verlust des intravesikulären FITC-Dextrans äußerte, könnte durch verschiedene Mechanismen erklärt werden: Entweder bewirken Scherkräfte direkt eine Öffnung von Membranporen oder sie nehmen Einfluss auf die Lipidordnung und bewirken eine Phasenübergangverschiebung, sodass ein Membranschmelzen und eine dadurch erhöhte Permeabilität induziert werden. Um letzteres Szenario näher zu untersuchen, wird im nächsten Absatz die Messung der Lipidordnung von Riesenvesikeln unter Scherfluss diskutiert.

#### 4.5.2. Phasenzustandsänderungen unter Scherfluss

Zur Untersuchung, inwieweit Scherkräfte die Lipidordnung und damit die Membranpermeabilität beeinflussen können, wurden unilamellare Riesenvesikel mit in der Membran eingebettetem Laurdan synthetisiert (siehe Kapitel 3.2.2) und deren Emissionsspektren in einer Glaskapillare von  $390\ \mu\text{m}$  Durchmesser (siehe Abbildung 14) unter verschiedenen Flussraten und bei variierender Temperatur analysiert. Das Resultat sind GP-Temperaturprofile, welche das Phasenübergangsverhalten der Vesikelmembranen bei verschiedenen Schergeschwindigkeiten beschreiben.

Der Vergleich der GP-Werte als Funktion der Temperatur bei Schergeschwindigkeiten von  $\dot{\gamma}_{\text{max}} = 0\ \text{s}^{-1}$ ,  $5\ \text{s}^{-1}$ ,  $10\ \text{s}^{-1}$  und  $26\ \text{s}^{-1}$  in Abbildung 47 a) zeigt eine Reduktion der Lipidordnung vor allem bei höheren Temperaturen mit zunehmender Schergeschwindigkeit. Der Phasenübergang der Vesikelmembranen, welcher eine starke Reduktion der GP-Werte bei etwa  $T = 32,5^\circ\text{C}$  bewirkt, ist in der negativen Ableitung des GP-Werts  $-\text{dGP}/\text{dT}$  in Abbildung 47 b) als Maximum zu erkennen. Im Vergleich zu einer

kalorimetrischen Messung an 15:0 PC-Vesikeln fällt auf, dass die Schmelztemperatur der optischen Messungen um etwa 1,1 K zu niedrigeren Temperaturen verschoben ist. Dies lässt sich auf den hohen Laurdangehalt der Membranen zurückführen (1 Laurdanmolekül auf 7 Lipide), welcher für die optischen Messungen erforderlich war, um ein ausreichendes Maß an Fluoreszenzintensität im verhältnismäßig kleinen Kapillarenvolumen detektieren zu können.

Die Maximalwerte der Ableitungen  $-dGP/dT$  in Abbildung 47 b) verschieben sich leicht mit zunehmender Schergeschwindigkeit zu niedrigeren Temperaturen, woraus geschlossen werden kann, dass Scherkräfte eine Schmelzpunktreduktion bewirken. Dieser Effekt könnte auf eine erhöhte Membranspannung zurückzuführen sein, welche durch die Vesikeldeformation unter Scherfluss induziert wird und zu einer Abnahme der Lipidordnung führt [35,51,104]. Die beobachteten Änderungen der GP-Werte bei Schergeschwindigkeiten von  $\dot{\gamma}_{\max} = 0 \text{ s}^{-1}$ ,  $5 \text{ s}^{-1}$ ,  $10 \text{ s}^{-1}$  und  $26 \text{ s}^{-1}$  waren alle reversibel, das heißt, dass direkt nach Anhalten der Strömung wieder der GP-Wert angenommen wurde, welcher unter statischen Bedingungen gemessen wurde. Die Exposition von Riesenvesikeln zu Schergeschwindigkeiten, welche auch im Rahmen der Analyse der Membranpermeabilität untersucht wurden, führten dagegen zu irreversiblen Änderungen der Lipidordnung, welche in Abbildung 47 c) dargestellt sind.

Im Vergleich zur statischen Messung bewirkt die Exposition zu einer Schergeschwindigkeit von  $\dot{\gamma}_{\max} = 516 \text{ s}^{-1}$  teilweise eine Zunahme des GP-Werts. Selbiger Effekt ist für eine Schergeschwindigkeit von  $\dot{\gamma}_{\max} = 2578 \text{ s}^{-1}$  noch deutlicher ausgeprägt, sodass eine gesteigerte Lipidordnung über den gesamten vermessenen Temperaturbereich beobachtet werden kann. Die entsprechenden Maxima der GP-Ableitung in Abbildung 47 d) sind gegenüber der statischen Kontrolle zu höheren Temperaturen verschoben. Im Gegensatz zu der reversiblen Erhöhung der Lipidordnung bei niedrigen Schergeschwindigkeiten bewirken größere Scherkräfte eine irreversible Reduktion der Lipidordnung. Das heißt, dass nach Anhalten der Vesikelströmung der statische unter statischen Bedingungen bestimmte GP-Wert nicht wieder erreicht wurde. Zusätzlich wurde dabei eine irreversible Reduktion der Laurdan-Fluoreszenzintensität beobachtet, welche in Abbildung 47 f) gezeigt ist. Sowohl die Irreversibilität als auch die Reduktion der Emissionsintensität können durch einen Verlust von membrangebundenem Laurdan erklärt werden. Eine Abnahme des Laurdangehalts innerhalb der Lipidmembran würde außerdem die Richtung der irreversiblen Schmelzpunktverschiebung in Abbildung 47 d) erklären. Eine Reduktion der membrangebundenen Zahl an Laurdanmolekülen bedeutet eine geringere Farbstoff-bedingte Schmelzpunktreduzierung und eine Annäherung der Schmelztemperatur an die mittels Kalorimetrie gemessene, welche den Phasenübergang einer Membran ohne Laurdan zeigt.

Sowohl die reversiblen als auch die dauerhaften Schmelzpunktverschiebungen sind als Funktion der Schergeschwindigkeit in Abbildung 47 e) zusammengefasst. Es wurde tatsächlich ein Einfluss von Scherkräften auf die Lipidordnung vesikulärer Membranen festgestellt, wobei die exakte Abhängigkeit durch den Verlust von membrangebundenem Laurdan nicht korrekt abgebildet werden konnte. Die maximale durch Scherfluss induzierte Änderung der Schmelztemperatur bei  $\dot{\gamma}_{\max} = 2578 \text{ s}^{-1}$  konnte die durch Laurdan induzierte Schmelzpunktverschiebung von  $\Delta T_m = 1,1 \text{ K}$  nicht kompensieren, weshalb der Scherkraft-bedingte Effekt auf  $\Delta T_{m, \text{ Scherung}} < 1,1 \text{ K}$  geschätzt werden kann. Das Alles-oder-Nichts-Verhalten der Membranpermeabilität wurde jedoch in einem Bereich von etwa 5 K um die Schmelztemperatur beobachtet, weshalb die Scherkraft-induzierte Änderung der Lipidordnung während der Permeabilisierung wohl eine untergeordnete Rolle spielt. Eine direkte Beeinflussung der Porenbildung durch Scherkräfte erscheint plausibler. Ob die Nähe zu einem Phasenübergang im Rahmen der Experimente des vorigen Kapitels Auswirkungen auf die Membranpermeabilität hatte, steht im Fokus der Untersuchungen des nächsten Absatzes.

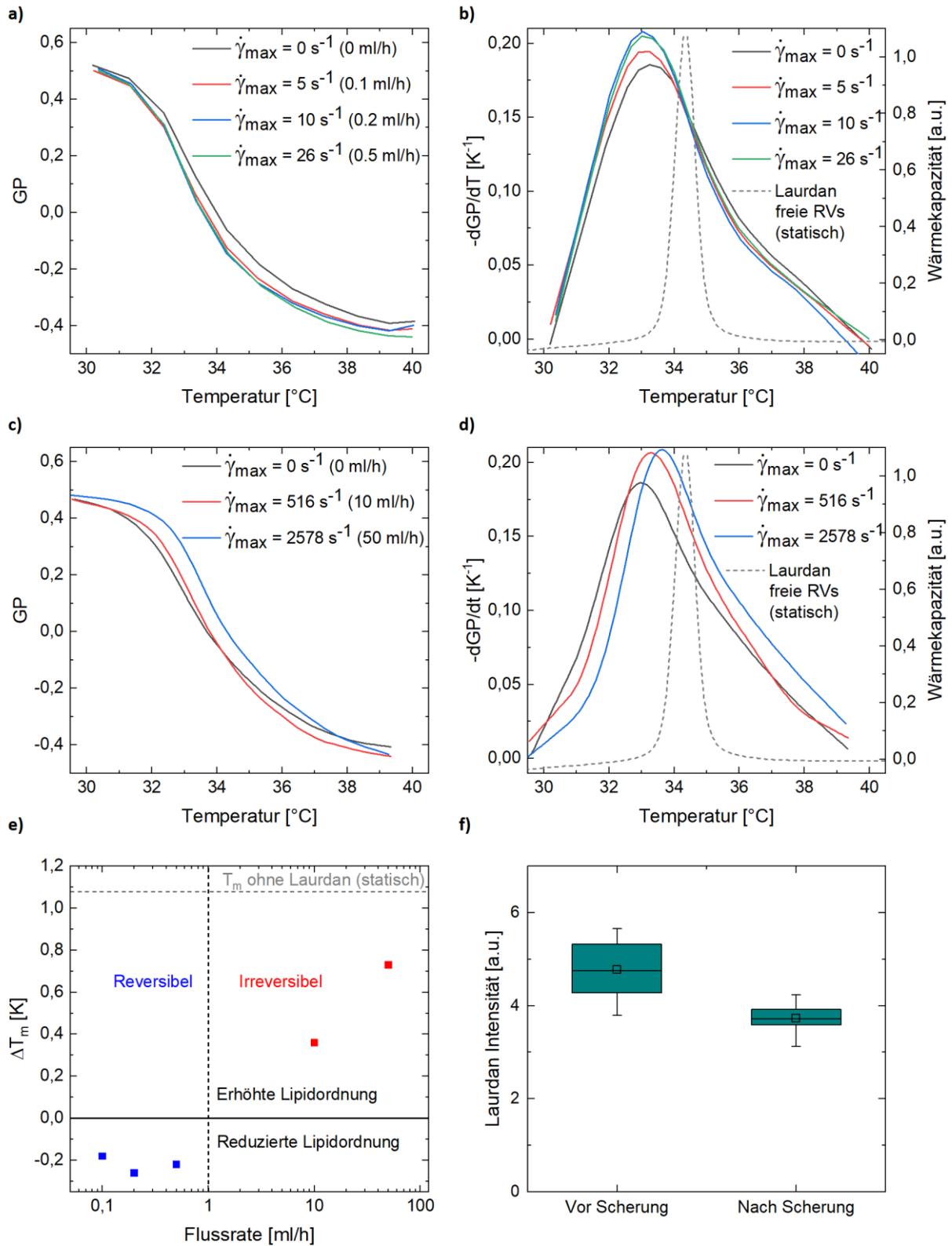


Abbildung 47 Optische Analyse der Lipidordnung von 15:0 PC-unilamellaren Riesenvesikeln mittels membrangebundenem Laurdan bei verschiedenen Temperaturen und Schergeschwindigkeiten [96]. **a)** GP als Funktion der Temperatur gemessen bei verschiedenen Schergeschwindigkeiten. Der steile Abfall des GP-Werts bei etwa  $T = 32,5 \text{ }^\circ\text{C}$  indiziert den Phasenübergang der Vesikel. Mit zunehmender Schergeschwindigkeit werden vor allem die GP-Werte bei höheren Temperaturen reversibel verringert. **b)** Die negative Ableitung der GP-Profile aus a) als Funktion der Temperatur, deren Maximum die jeweilige Schmelztemperatur  $T_m$  indiziert. Der hohe Laurdan-Gehalt in den Membranen bewirkt eine Schmelzpunktverringering im

Vergleich zu einer Probe ohne Laurdan, deren Wärmekapazitätsprofil als gestrichelte Linie abgebildet ist. Mit zunehmender Schergeschwindigkeit verschiebt sich die Schmelztemperatur reversibel zu niedrigeren Temperaturen. c) GP als Funktion der Temperatur während der Exposition zu höheren Schergeschwindigkeiten als in a) Die induzierte Erhöhung der GP-Werte ist im Gegensatz zu nicht reversibel. d) Die negative Ableitung der GP-Profile aus c) als Funktion der Temperatur. Die Scherkraft-induzierte Schmelzpunkterhöhung in Richtung der Laurdan-freien kalorimetrischen Messung ist irreversibel. e) Optisch gemessene Phasenübergangstemperaturen  $T_m$  als Funktion der maximalen Schergeschwindigkeit im Schlauch  $\dot{\gamma}_{max}$ . Niedrige Schergeschwindigkeiten verursachen eine reversible Schmelzpunktreduktion, während höhere Schergeschwindigkeiten wahrscheinlich aufgrund des Verlusts von membrangebundenem Laurdan eine irreversible Verschiebung zu höheren Temperaturen bewirken. f) Boxplot der Laurdanintensität einer Vesikelprobe vor und nach der Exposition zu einer Schergeschwindigkeit von  $\dot{\gamma}_{max} = 516 \text{ s}^{-1}$ . Das Kästchen und die horizontale Linie in den Boxen repräsentieren den Mittelwert und den Median von etwa 1600 Spektren. Die Abnahme der Intensität deutet auf einen Verlust von membrangebundenem Laurdan hin.

#### 4.5.3. Permeabilität unter Scherfluss abseits des Phasenübergangs

Die mechanischen Eigenschaften von Lipidmembranen können sich am Phasenübergang sprunghaft als Funktion thermodynamischer Variablen wie der Temperatur oder des pH-Werts ändern. Das Alles-oder-Nichts-Verhalten der Membranpermeabilität von Vesikeln unter Scherfluss indiziert ebenfalls eine solche nicht-lineare Abhängigkeit von der Scherkraft. Demnach könnte das Verhalten der Vesikel bestehend aus 14:0 PC und 15:0 PC durch die Nähe zur Schmelztemperatur bedingt sein. Um zu überprüfen, ob das Alles-oder-Nichts-Verhalten der Membranpermeabilität auch weit abseits des Phasenübergangs beobachtet werden kann, wurden Messungen analog zu denen aus Kapitel 4.5.1 an Vesikeln bestehend aus dem Lipid DOPC durchgeführt, deren Schmelztemperatur bei etwa  $T_m = -18 \text{ °C}$  liegt. So befanden sich die Vesikel bei einer Raumtemperatur von  $T = 22 \text{ °C}$  weit in der fluiden Phase.

Die Verteilung der FITC-Dextran-Intensitäten zweier Vesikelproben, welche durch den Schlauch bei Schergeschwindigkeiten von  $\dot{\gamma}_{max} = 516 \text{ s}^{-1}$  und  $\dot{\gamma}_{max} = 2578 \text{ s}^{-1}$  gepumpt wurden, und einer Kontrollmessung, welche keinem Scherfluss ausgesetzt wurde, sind in Abbildung 48 a) dargestellt. Ähnlich zu den Ergebnissen aus Abbildung 44 a) bewirken Scherkräfte die Reduktion der intravesikulären FITC-Dextran-Intensität, also eine Permeabilisierung der Vesikel. Im Gegensatz zum Experiment mit 15:0 PC-Vesikeln in der Nähe der Phasenumwandlung bilden sich in den Intensitätsverteilungen der DOPC-Vesikel jedoch keine zwei Populationen mit hohen und niedrigen Intensitätswerten aus. Deswegen wurde als Maß für die Permeabilisierung in Abbildung 48 b) lediglich der mittlere Intensitätsverlust berechnet, da eine intuitive Klassifizierung in leere und volle Vesikel nicht möglich war. Der Intensitätsverlust im Vergleich zur Kontrollmessung fällt für die höhere Schergeschwindigkeit größer aus.

Das unterschiedliche Verhalten der Permeabilität von Vesikeln unter Scherfluss in Abhängigkeit der Nähe vom Membranschmelzpunkt ist auch auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 48 c) und d) deutlich zu erkennen. Während Vesikel bestehend aus 15:0 PC-Lipiden entweder kaum FITC-Dextran-Intensität aufweisen oder aber hell leuchten, zeigen die DOPC-Vesikel eine kontinuierlich Intensitätsverteilung. Demnach ist das Alles-oder-Nichts-Verhalten der Permeabilität von unilamellaren Riesenvesikeln durch die Nähe zum Phasenübergang bedingt.

Die mittels optischer Analyse nachgewiesene reversible Reduktion der Schmelztemperatur deckt sich mit der Messung einer verringerten Lipidordnung von Zellmembranen unter Scherfluss aus der Literatur [90]. Basierend auf den Resultaten aus den Kapiteln 4.3 und 4.4 würde daraus eine Reduktion des porösen und endozytotischen Membrantransports resultieren. Demnach bewirken Scherkräfte einerseits eine Erhöhung der Membranpermeabilität, weil sie Porenbildung begünstigen, andererseits erfolgt eine Reduktion der Lipidordnung, wodurch die Permeabilität reduziert wird. Ein ähnlicher Effekt der dämpfenden Wirkung der Lipidordnung wurde bei der Variation der Temperatur in Kapitel 4.3

beobachtet. Eine Temperaturerhöhung führt zunächst zu erhöhtem porösen Membrantransport, reduziert jedoch gleichzeitig die Lipidordnung, wodurch der Transport wiederum reduziert wird.

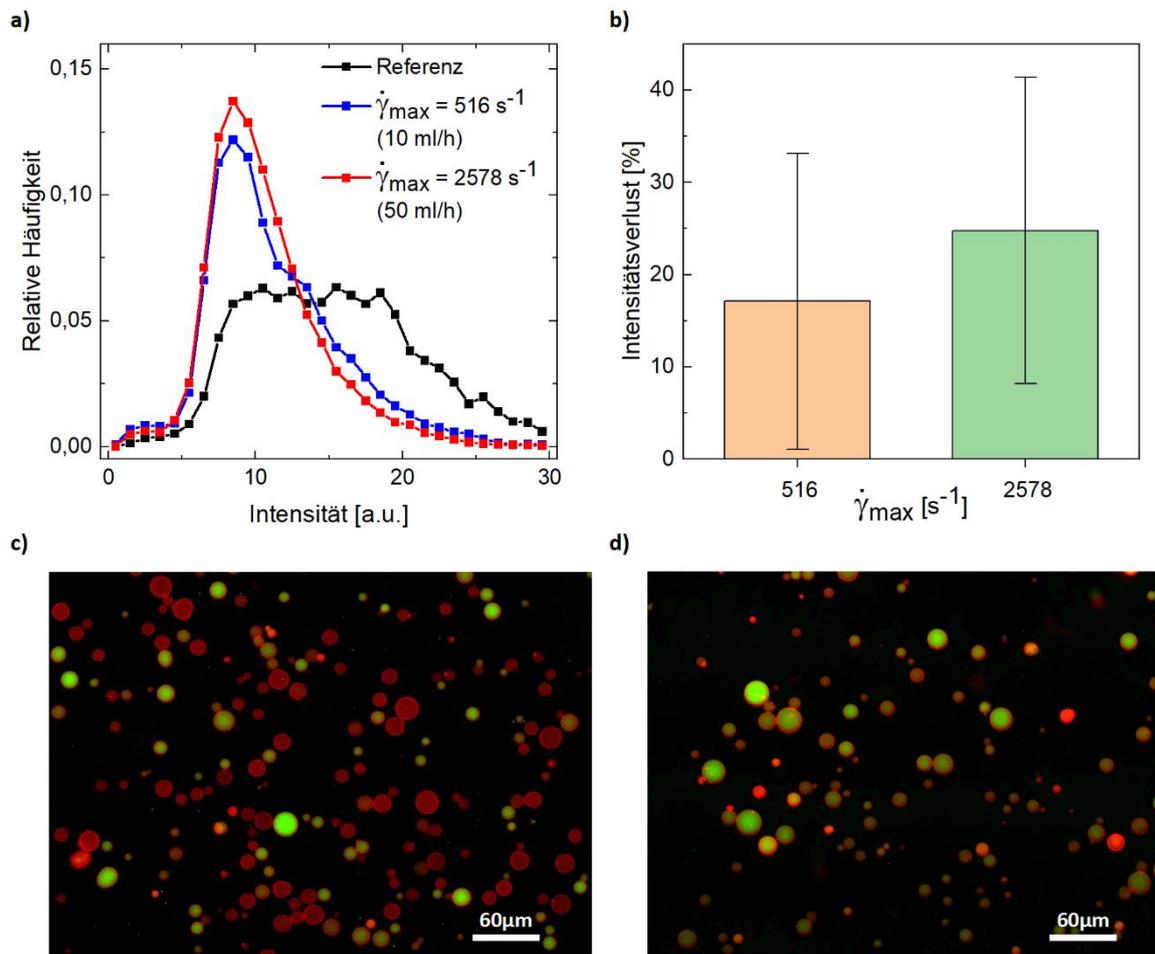


Abbildung 48 Permeabilität von unilamellaren Riesenvesikeln bestehend aus DOPC bei Raumtemperatur ( $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$ ) unter Scherfluss [96]. **a)** Histogramm der Intensitäten von intravesikulärem FITC-Dextran von DOPC-Vesikeln nach der Exposition zu Scherkräften bei Schergeschwindigkeiten von  $\dot{\gamma}_{max} = 516 \text{ s}^{-1}$  und  $\dot{\gamma}_{max} = 2578 \text{ s}^{-1}$  sowie einer statischen Kontrolle, welche keinen Scherkräften ausgesetzt war. Im Gegensatz zu Vesikeln, welche nahe der Phasenübergangstemperatur Scherkräften ausgesetzt werden (siehe Abbildung 44 a), bilden sich keine scharf getrennten Populationen leerer und voller Vesikel aus. Es ist eine kontinuierliche Verschiebung der Verteilung zu niedrigeren Intensitätswerten zu erkennen. **b)** Der Intensitätsverlust von intravesikulärem FITC-Dextran im Vergleich zur statischen Kontrolle zeigt eine zunehmende Permeabilisierung durch Scherkräfte mit steigender Schergeschwindigkeit. **c)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Messung von 15:0 PC-Vesikeln aus Abbildung 44. Scherkräfte bewirken nahe der Schmelztemperatur ein Alles-oder-Nichts-Verhalten der Membranpermeabilität. **d)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von DOPC-Vesikeln, welche weit abseits des Phasenübergangs Scherkräften ausgesetzt waren. Der Verlust von intravesikulärem FITC-Dextran erfolgt kontinuierlicher als in c).

Die nicht-lineare Abhängigkeit der Membranpermeabilität von Scherkräften nahe der Schmelztemperatur, welche bei Vesikeln ein Alles-oder-Nichts-Verhalten bedingt, ist auch für biologische Membranen relevant, weil sich diese unter physiologischen Bedingungen direkt im Schmelzregime befinden (siehe Abbildung 27 a)). Die Abhängigkeit der Permeabilität biologischer Membranen wird wahrscheinlich nicht derart extrem variieren wie bei den Vesikeln in Abbildung 44 a), weil der Phasenübergang von Zellmembranen deutlich breiter als der von synthetischen Membranen ist (siehe Abbildung 22 c)). Dennoch ist eine starke Abhängigkeit der Reaktion auf Scherkräfte von der Lipidordnung zellulärer Membranen zu erwarten.

Die Beobachtung des Alles-oder-Nichts-Verhaltes der Permeabilität nahe von Phasenübergängen trägt außerdem zum Verständnis des Wirkmechanismus von thermo-responsiven Liposomen bei. Deren

Lipidkomposition wird gerade so gewählt, dass sie sich im Körper nahe der Schmelztemperatur befinden. Die Freisetzung des transportierten Wirkstoffs wird daher ebenso binär erfolgen, wie in Abbildung 44 c).

#### 4.5.4. Fazit

Aus den Messungen der Membranpermeabilität und der Lipidordnung von unilamellaren Riesenvesikeln bei verschiedenen Temperaturen und variierenden Schergeschwindigkeiten, können folgende Schlussfolgerungen abgeleitet werden:

- Nahe des Phasenübergangs bewirken Scherkräfte ein Alles-oder-Nichts-Verhalten der Membranpermeabilität.
- Am Phasenübergang induzierte Membranporen sind auch abseits der Schmelztemperatur für eine begrenzte Zeit stabil.
- In der Gelphase sind höhere Scherkräfte zur Bildung von Poren erforderlich als in der fluiden Phase.
- Vesikel sind hinsichtlich ihrer Morphologie in der Gelphase stabiler als in der fluiden Phase.
- Scherkräfte bewirken eine reversible Schmelzpunktreduktion von Vesikelmembranen, also eine Verringerung der Lipidordnung.
- Laurdan kann durch hohe Scherkräfte aus Lipidmembranen gelöst werden.
- Abseits des Phasenübergangs bewirken Scherkräfte eine kontinuierliche Permeabilisierung von Vesikelmembranen.

## 4.6. Alternative polaritätssensitive membrangebundene Fluoreszenzfarbstoffe

Die spektrale Polaritätssensitivität von Fluorophoren mit stark erhöhtem Dipolmoment im optisch angeregten Zustand ist schon seit den 1950er Jahren bekannt [105]. Die Synthese von Laurdan und ähnlichen Naphtalin-Derivaten, wie Prodan und Acdan, wurde erstmals 1979 veröffentlicht [106]. Die Internalisierung dieser Farbstoffe und das daraus resultierende Fluoreszenzsignal von inneren Membranen erschwerte lange Zeit eine gezielte Untersuchung der Plasmamembran. Diese ist jedoch gerade für zelluläre Funktionen wie dem Stofftransport von zentraler Bedeutung.

Die Selektivität der Fluorophore verbesserte sich erst durch die Entwicklung von Farbstoffen wie di-4-ANEPPDHQ (2006) oder SL2 (2010), welche eine erhöhte Affinität für die Plasmamembran, jedoch eine geringere Sensitivität gegenüber Temperatur-induzierten Änderungen der Lipidordnung zeigen [107–109]. In diesem Kapitel werden zwei der neuesten polaritätssensitiven Farbstoffe, Pro12A und NR4A, mit erhöhter Selektivität für die Plasmamembran als Alternative für das lang etablierte Fluorophor Laurdan untersucht [110,111]. Sollten sich diese als ähnlich sensitiv gegenüber der Lipidordnung wie Laurdan erweisen, könnten zukünftige Studien von deren Affinität gegenüber der äußeren Membran profitieren.

Unterschiede in der Färbung zellulärer Membranen durch die Farbstoffe Laurdan, Pro12A und NR4A werden durch Vergleich der intrazellulären Intensität in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 49 a) bis c) ersichtlich. Der beispielhafte Intensitätsverlauf innerhalb einer Zelle ist für die jeweiligen Farbstoffe in Abbildung 49 d) bis f) gezeigt. Die Datensätze sind auf die maximale Intensität am Rand der Zelle normiert. Während die Fluoreszenzintensität von Laurdan auf etwa 75 % im Zellinneren sinkt, ist das Signal der Plasmamembran-selektiven Farbstoffe im Zellzentrum auf etwa 45 % reduziert. Demnach scheint die im Vergleich zu Laurdan höhere Affinität für die äußere Membran von Pro12A und NR4A bestätigt.

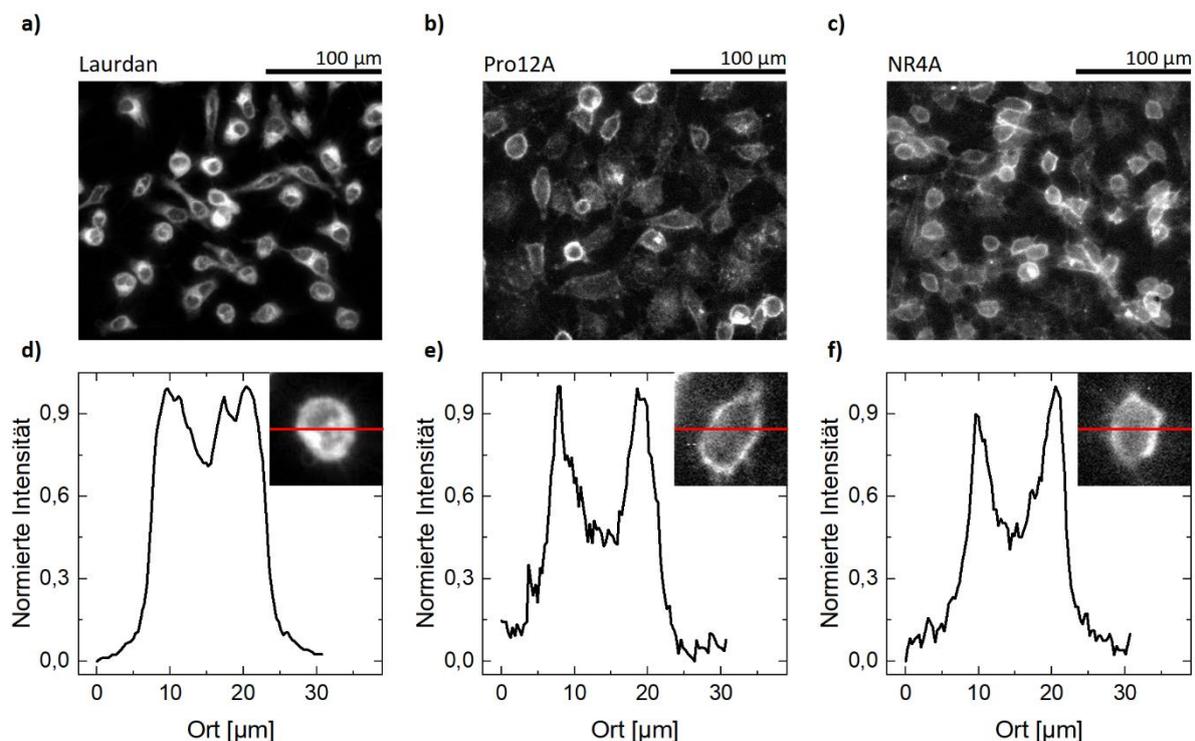


Abbildung 49 Vergleich der intrazellulären Fluoreszenzintensität der Farbstoffe Laurdan, Pro12A und NR4A. a)-c) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Farbstoffe Laurdan, NR4A und Pro12A. d)-f) Intrazelluläre Fluoreszenzintensität der jeweiligen

Farbstoffe aus a)-c) als Funktion des Ortes, welcher als rote Linie in den jeweiligen Beispielzellen abgebildet ist. Die Intensität der Farbstoffe Pro12A und NR4A ist im Zellzentrum im Vergleich zu Laurdan reduziert.

Die in Kapitel 4.6 diskutierten experimentellen Daten entstanden im Rahmen der Masterarbeit von Sophie Mauritz.

#### 4.6.1. Sensitivität gegenüber der Lipidordnung synthetischer Membranen

Vor der Analyse der komplexen Lipidsysteme zellulärer Membranen wird die Sensitivität der verschiedenen Farbstoffe gegenüber der Lipidordnung an wohldefinierten synthetischen Membranen verglichen. Dazu wurden multilamellare Vesikel bestehend aus 14:0 PC und 15:0 PC nach der Synthese mit dem jeweiligen in DMSO gelösten Farbstoff gefärbt (siehe Kapitel 3.2.1). Die verschiedenen Emissionsspektren in der Gelphase (15:0 PC bei  $T = 5\text{ °C}$ ) und in der fluiden Phase (15:0 PC bei  $T = 65\text{ °C}$ ) sind in Abbildung 50 a) dargestellt und wurden mit dem in Abbildung 13 dargestellten Versuchsaufbau gemessen.

Die spektrale Verschiebung des Emissionsmaximums von Pro12A fällt mit  $\Delta\lambda_{\max} = 13\text{ nm}$  deutlich geringer aus als die Änderung von  $\Delta\lambda_{\max} = 46\text{ nm}$  für Laurdan, obwohl Pro12A eine höhere Sensitivität gegenüber der Lipidordnung zugeschrieben wird [110]. Im Gegensatz zu den beiden Naphtalin-Derivaten, Laurdan und Pro12A, emittiert NR4A, ein Derivat des Farbstoffs *Nile Red*, in einem rötlichen Wellenlängenbereich. Seine spektrale Verschiebung fällt mit  $\Delta\lambda_{\max} = 9\text{ nm}$  am geringsten aus. Zur Berechnung der GP-Werte wurden für Laurdan und Pro12A die Intensitäten desselben Wellenlängenbereichs ausgewertet ( $\lambda = 440\text{ nm}$  und  $\lambda = 490\text{ nm}$ ), weil beide Moleküle die gleiche optisch aktive Einheit aufweisen. Die Analyse der NR4A-Spektren erfolgte durch Auswertung der Intensitäten bei  $\lambda = 600\text{ nm}$  und  $\lambda = 650\text{ nm}$ .

Der Laurdan-GP-Wert und dessen negative Ableitung nach der Temperatur von multilamellaren Vesikeln bestehend aus den Lipiden 14:0 PC und 15:0 PC ist in Abbildung 50 b) als Funktion der Temperatur dargestellt. Zusätzlich sind die kalorimetrisch bestimmten Schmelztemperaturen der Vesikel als gestrichelte Linie abgebildet. Am jeweiligen Phasenübergang fällt der GP-Wert steil ab, weshalb bei selbiger Temperatur ein Maximum der GP-Ableitung erkennbar ist. Insgesamt nehmen die GP-Werte über den gesamten Temperaturbereich von 60 K einen Wertebereich von  $\Delta GP_{14:0\text{ PC}} = 0,55$  und  $\Delta GP_{15:0\text{ PC}} = 0,65$  an. Die Maximalwerte der negativen Ableitung als Maß für die Sensitivität des Farbstoffs gegenüber der Änderung der Lipidordnung am Phasenübergang betragen für 14:0 PC-Vesikel  $-dGP/dT_{\max, 14:0\text{ PC}} = 0,07\text{ K}^{-1}$  und für 15:0 PC-Vesikel  $-dGP/dT_{\max, 15:0\text{ PC}} = 0,13\text{ K}^{-1}$ .

Analog zur Messung mit Laurdan ist in Abbildung 50 c) die Analyse der Lipidsysteme mit Pro12A dargestellt. Zunächst fällt auf, dass GP über den gesamten Temperaturbereich eine etwas geringere Abnahme von  $\Delta GP_{14:0\text{ PC}} = 0,46$  und  $\Delta GP_{15:0\text{ PC}} = 0,37$  aufweist. An der jeweiligen Schmelztemperatur ist die stärkste Reduktion des GP-Werts erkennbar. Die Maxima der Ableitungen nach der Temperatur nehmen am Phasenübergang Werte von  $-dGP/dT_{\max, 14:0\text{ PC}} = 0,017\text{ K}^{-1}$  und  $-dGP/dT_{\max, 15:0\text{ PC}} = 0,02\text{ K}^{-1}$  an. Die Sensitivität von Pro12A gegenüber der Änderung der Lipidordnung am Phasenübergang ist daher um einen Faktor 2 bzw. 6 reduziert. Außerdem ist ein deutlich höheres Rauschen der Pro12A-GP-Werte zu beobachten, welches auf eine geringere Fluoreszenzintensität des Farbstoffs trotz gleicher Farbstoffkonzentration zurückgeführt werden kann. Deshalb wurden die  $-dGP/dT$ -Werte mittels gleitendem Durchschnitt (Fensterbreite: 5 Punkte) geglättet. Des Weiteren fällt die Temperaturabhängigkeit der GP-Werte von Pro12A in der fluiden Phase höher aus als in der fluiden Phase, sodass die Ableitung Ähnlichkeit zu einer Stufenfunktion aufweist.

Die Vermessung des temperaturabhängigen Phasenzustands mit NR4A ist Abbildung 50 d) dargestellt. Mit  $\Delta GP_{14:0 PC} = \Delta GP_{15:0 PC} = 0,2$  fällt die GP-Änderung über 60 K am kleinsten aus. Analog dazu sind auch die Maximalwerte der GP-Ableitungen am Phasenübergang  $-dGP/dT_{\max, 14:0 PC} = 0,013 K^{-1}$  und  $-dGP/dT_{\max, 15:0 PC} = 0,011 K^{-1}$  im Vergleich zu Pro12A und Laurdan reduziert. Wie Pro12A zeigt NR4A eine erhöhte Temperaturabhängigkeit von GP in der fluiden Phase, sodass der Verlauf im Gegensatz zu Laurdan einer Stufenfunktion ähnelt. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist bei NR4A klar erkennbar am kleinsten. Sowohl bei Pro12A als auch bei NR4A ist dies durch eine verringerte Fluoreszenzintensität bedingt. Diese resultiert wiederum sehr wahrscheinlich aus dem Umstand, dass beide Farbstoffe lediglich die äußerste Membran der multilamellaren Vesikel färben, während sich Laurdan auch in die inneren Membranen einbettet und dadurch mehr Moleküle zum Fluoreszenzsignal beitragen.

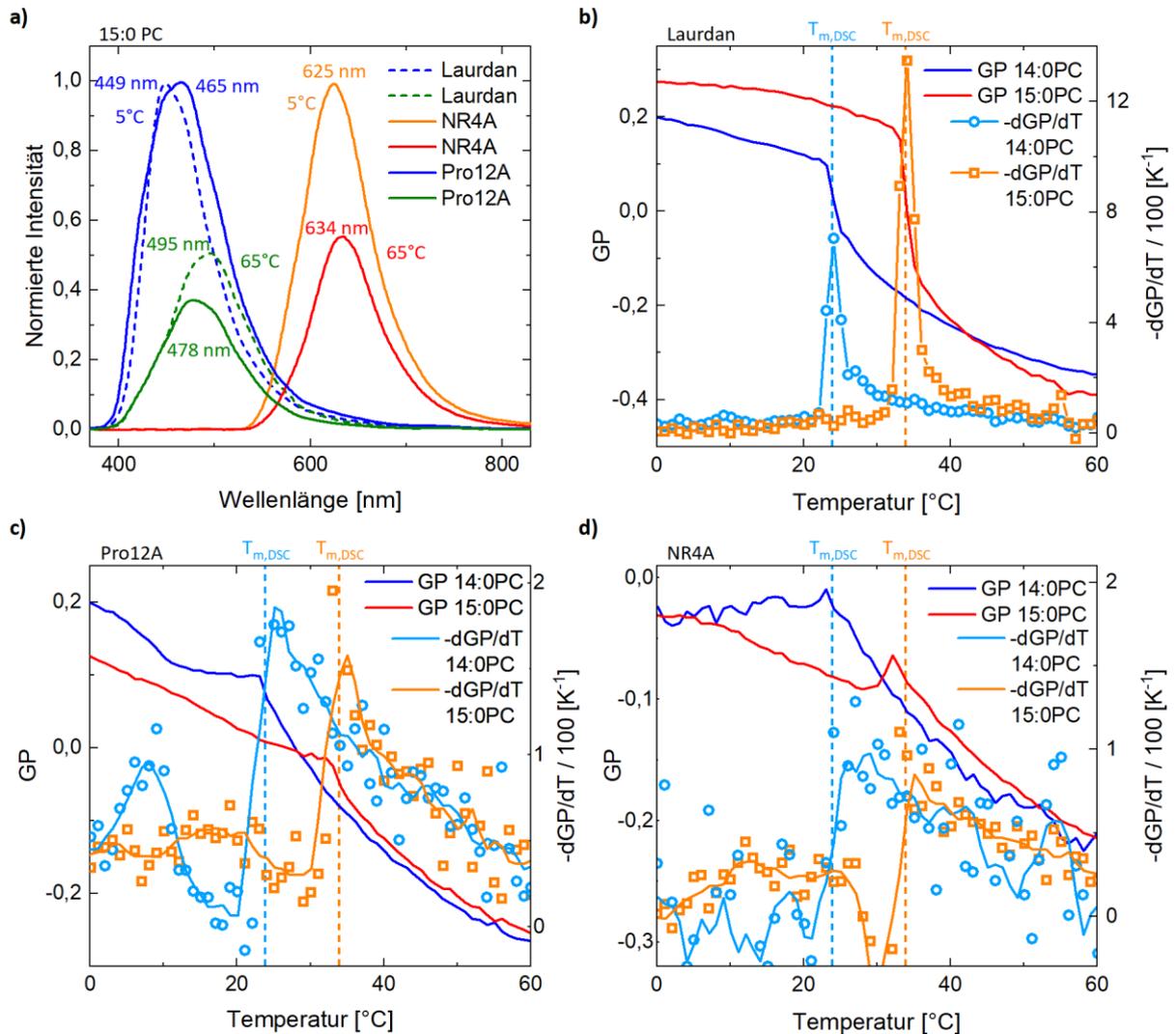


Abbildung 50 Optische Analyse der temperaturabhängigen Lipidordnung von multilamellaren Vesikeln mit den Farbstoffen Laurdan, Pro12A und NR4A. **a)** Emissionsspektren multilamellarer 15:0 PC-Vesikel nach der Färbung mittels der in DMSO-gelösten Farbstoffe Laurdan, Pro12A und NR4A bei den Temperaturen  $T = 5^\circ C$  (Gelphase) und  $T = 65^\circ C$  (fluide Phase). Ebenfalls indiziert sind die Emissionsmaxima zur Berechnung der spektralen Verschiebung  $\Delta\lambda_{\max}$  durch Reduktion der Lipidordnung beim Übergang von der Gelphase in die fluide Phase. **b)** GP berechnet aus den Intensitäten des Spektrums von Laurdan bei den Wellenlängen  $\lambda = 440 \text{ nm}$  und  $\lambda = 490 \text{ nm}$  als Funktion der Temperatur für 14:0 PC- und 15:0 PC-Vesikel. Bei den Schmelztemperaturen ist eine Reduktion des GP-Werts und ein Maximum der negativen Ableitung  $-dGP/dT$  zu erkennen. **c)** GP berechnet aus den Intensitäten des Spektrums von Pro12A bei den Wellenlängen  $\lambda = 440 \text{ nm}$  und  $\lambda = 490 \text{ nm}$  als Funktion der Temperatur für 14:0 PC- und 15:0 PC-Vesikel. Die Reduktion von GP am Phasenübergang fällt geringer aus als bei Laurdan. Der Verlauf von  $-dGP/dT$  ähnelt einer Stufenfunktion. **d)** GP berechnet aus den Intensitäten des Spektrums von NR4A bei den Wellenlängen  $\lambda = 600 \text{ nm}$  und  $\lambda = 650 \text{ nm}$  als Funktion der Temperatur für 14:0 PC- und 15:0 PC-Vesikel. Die GP-Wertänderungen fallen noch geringer aus für Pro12A aus.

Die spektralen Verschiebungen der Emissionsmaxima von Pro12A und NR4A sind deutlich geringer als die von Laurdan. Infolgedessen fallen die Reduktion von GP am Phasenübergang und das Maximum der Ableitung  $-dGP/dT$  auch vermindert ausgeprägt aus. Demnach weisen beide Farbstoffe im Vergleich zu Laurdan eine geringere Sensitivität gegenüber der Lipidordnung auf, weshalb sie bei der optischen Analyse synthetischer Membranen keinen Vorteil bieten. Ob durch ihre Verwendung zur optischen Analyse der Lipidordnung innerhalb von zellulären Plasmamembranen zusätzliche Erkenntnisse zu den Messungen mit Laurdan gewonnen werden können, wird im nächsten Kapitel diskutiert.

#### 4.6.2. Phasenübergänge in zellulären Plasmamembranen

Durch den Vergleich der temperaturabhängigen Emissionsspektren einerseits gemessen mit dem Farbstoff Laurdan, welcher innere und äußere Membranen färbt, und andererseits mit den Farbstoffen Pro12A und NR4A (siehe Kapitel 3.1.3), die hauptsächlich von der Plasmamembran aufgenommen werden, kann eine intrazellulär aufgelöste Analyse der Lipidordnung innerhalb einer Zellsuspension durchgeführt werden. Eine ähnliche Analyse wurde in Kapitel 4.2.4 beschrieben, wobei die Lipidordnung räumlich mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgelöst wurde. Dabei konnte eine Variation des GP-Werts vom Zellzentrum bis zur äußeren Membran von bis zu  $\Delta GP = 0,2$  gemessen werden. Außerdem wurde eine leicht erhöhte Sensitivität der Lipidordnung der äußeren Membran gegenüber Temperaturänderungen beobachtet: Über ein Temperaturintervall von  $T = 10\text{ °C}$  bis  $T = 40\text{ °C}$  änderte sich der GP-Wert innen um  $\Delta GP = 0,34$  und außen um  $\Delta GP = 0,38$ .

Zunächst werden in Abbildung 51 a) die temperaturabhängigen GP-Werte von HeLa-Zellmembranen der Messung nach erstmaligem Heizen auf  $T = 90\text{ °C}$  verglichen. Analog zur Auswertung in Kapitel 4.1 werden so nur reversible Änderungen der Lipidordnung berücksichtigt, da die Denaturierung von Membranproteinen schon erfolgt ist. Die jeweiligen GP-Profile wurden im Gegensatz zu Kapitel 4.1 nicht durch sigmoidale Funktionen approximiert, weil so nur das Verhalten von Laurdan im Rahmen der Messung denaturierter Membranen treffend nachgebildet werden kann. Besonders die Temperaturabhängigkeit beim Heizen intakter Membranen in Abbildung 51 b) weicht von einem sigmoidalen Verlauf deutlich ab. Stattdessen wurden die GP-Werte mittels lokal gewichteter Streudiagrammglättung approximiert und diese zur Berechnung der negativen Ableitung nach der Temperatur  $-dGP/dT$  verwendet.

Innerhalb desselben Temperaturintervalls fällt die GP-Wertänderung von Pro12A  $\Delta GP_{\text{Pro12A}} = 0,68$  verglichen mit Laurdan  $\Delta GP_{\text{Pro12A}} = 0,83$  etwas geringer aus. Diese spiegelt sich auch in der Ableitung in Abbildung 51 b) wider, deren Maximalwert für Pro12A  $-dGP/dT_{\text{max, Pro12A}} = 0,01\text{ K}^{-1}$  gegenüber Laurdan  $-dGP/dT_{\text{max, Pro12A}} = 0,013\text{ K}^{-1}$  verringert ist, was auf die reduzierte Sensitivität gegenüber der Lipidordnung, welche auch an synthetischen Membranen beobachtet wurde (siehe Abbildung 50 c)), zurückgeführt werden kann. Die Maximalwerte der Ableitungen, welche als Schmelztemperatur der Membran interpretiert werden können, liegen für Laurdan bei etwa  $T_m = 16\text{ °C}$  für Pro12A  $T_m = 25\text{ °C}$ . Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.2.4, dass die äußere Membran geordneter ist.

Wie schon an synthetischen Membranen beobachtet (siehe Abbildung 50 d)), zeigt NR4A die geringste GP-Wertänderung von  $\Delta GP_{\text{NR4A}} = 0,39$  in Abbildung 51 a). Außerdem ist eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit von GP unterhalb von  $T = 0\text{ °C}$  zu beobachten, welche eine starke Zunahme von  $-dGP/dT$  in Abbildung 51 b) bewirkt. Abgesehen davon zeigt sich ein lokales Maximum der Steigung  $-dGP/dT_{\text{max, NR4A}} = 0,004\text{ K}^{-1}$  bei etwa  $T = 55\text{ °C}$ ; insgesamt ist jedoch kein eindeutiger Übergang wie bei Laurdan oder Pro12A zu beobachten.

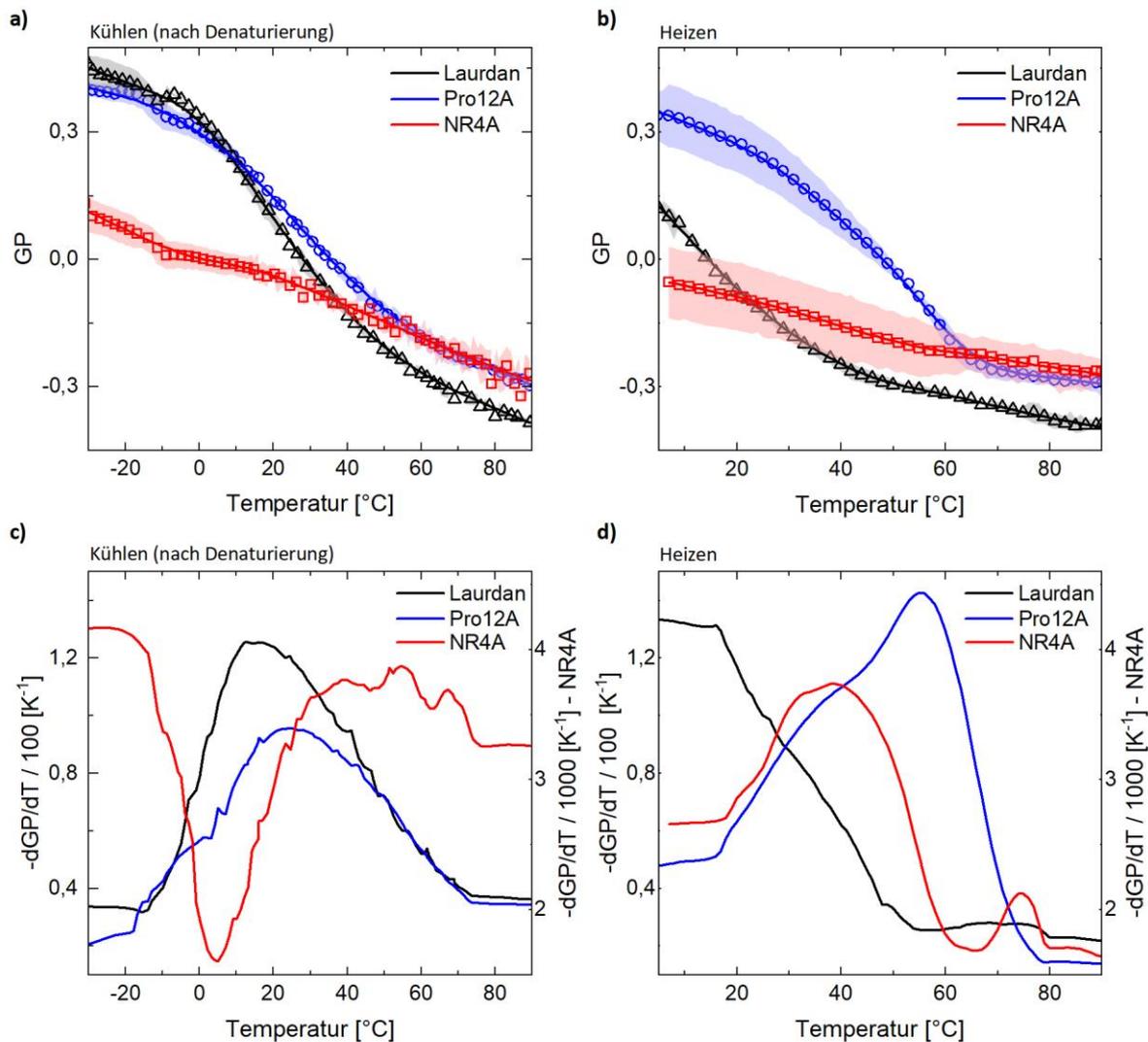


Abbildung 51 Optische Analyse der temperaturabhängigen Lipidordnung von suspendierten HeLa-Zellmembranen beim Kühlen und Heizen mit den Farbstoffen Laurdan, Pro12A und NR4A. a) GP als Funktion der Temperatur nach der Denaturierung durch Heizen auf  $T = 90\text{ °C}$  gemessen mittels optischer Analyse der verschiedenen Farbstoffe. Ein Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert dreier unabhängig durchgeführter Experimente. Die farbigen Bänder indizieren die Standardabweichung. Die Datenpunkte wurden mittels lokal gewichteter Streudiagrammglättung approximiert (durchgezogene Linie). Während GP gemessen mittels Laurdan auch die Lipidordnung innerer Membranen berücksichtigt, zeigen sich Pro12A und NR4A hauptsächlich sensitiv gegenüber der Lipidordnung der Plasmamembranen. b) GP als Funktion der Temperatur beim erstmaligen Heizen der suspendierten Zellen. Im Gegensatz zu den Messungen aus a) können irreversible Änderungen der Lipidordnung beobachtet werden. Die Darstellung der Daten folgt dem Schema aus a). c) Ableitung der mittels lokal gewichteter Streudiagrammglättung approximierten Daten aus a). Aufgrund der vergleichsweise geringen Werte für den Farbstoff NR4A wird eine zweite  $-dGP/dT$ -Achse mit angepasstem Wertebereich verwendet. d) Ableitung der mittels lokal gewichteter Streudiagrammglättung approximierten Daten aus b). Vor allem die Kooperativität von Pro12A ist gegenüber der Kühl-Messung in c) deutlich erhöht.

Die temperaturabhängigen Änderungen des GP-Werts während des Abkühlens von  $T = 90\text{ °C}$  auf  $T = -30\text{ °C}$  in Abbildung 51 a) resultieren aus reversiblen Änderungen der Lipidordnung, da irreversible Denaturierungsprozesse bereits stattgefunden haben. Die Sensitivität der Farbstoffe Laurdan, Pro12A und NR4A gegenüber Denaturierungseffekten wird durch Messung des jeweiligen GP-Werts beim Erwärmen von etwa  $T = 5\text{ °C}$  zu  $T = 90\text{ °C}$  in Abbildung 51 b) ersichtlich. Der Temperaturbereich wurde dabei bewusst so gewählt, dass ein Einfrieren der Zellsuspensionen vermieden wurde, um strukturelle Veränderungen der Membran durch Kristallisation des Lösemittels zu vermeiden.

Laurdan und Pro12A, deren GP-Werte aufgrund des gleichen Fluoreszenzmechanismus und der identischen Wellenlängenauswertung gut vergleichbar sind, zeigen, dass die Lipidordnung intakter

Zellmembranen in einem physiologischen Temperaturbereich im Zellinneren gegenüber der Plasmamembran deutlich reduziert ist. Dieser Effekt ist beim Vergleich der denaturierten Membranen in Abbildung 51 a) deutlich geringer ausgeprägt. Der Unterschied zwischen beiden Messungen ist vor allem auf die starke GP-Wertänderung von Pro12A zurückzuführen, welche auf eine erhöhte Sensitivität gegenüber strukturellen Änderungen von Proteinen hindeutet.

Abgesehen von Unterschieden der absoluten GP-Werte kann beobachtet werden, dass Laurdan die stärkste GP-Änderung bei tiefen Temperaturen zeigt, während GP im Rahmen der Messung mit Pro12A bei etwa  $T = 55\text{ °C}$  am stärksten abnimmt. Dies äußert sich durch einen Maximalwert der GP-Ableitung von Pro12A in Abbildung 51 d) von  $-dGP/dT_{\max, \text{Pro12A}} = 0,014\text{ K}^{-1}$ , was einer Zunahme der Kooperativität von 40 % gegenüber der Messung beim Abkühlen in Abbildung 51 c) entspricht. Selbiger Vergleich zeigt außerdem eine Verschiebung der Schmelztemperatur von  $T_m = 25\text{ °C}$  nach  $T_m = 55\text{ °C}$ . Somit kann auch aus der Analyse der Temperaturabhängigkeit geschlossen werden, dass Pro12A empfindlich auf die Denaturierung von Lipiden reagiert.

Im Gegensatz zu Pro12A und NR4A zeigen die Messungen mittels Laurdan in Abbildung 51 d) keinen vollständigen Phasenübergang. Dieser liegt wahrscheinlich außerhalb des Messbereichs bei tieferen Temperaturen. Der Maximalwert der GP-Ableitung  $-dGP/dT_{\max, \text{NR4A}} = 0,004\text{ K}^{-1}$  von NR4A entspricht der Messung der denaturierten Membran und indiziert eine Schmelztemperatur von etwa  $T_m = 38\text{ °C}$ . Die Sensitivität von NR4A gegenüber der strukturellen Veränderung von Proteinen scheint daher geringer zu sein als die von Pro12A.

Die Messungen an synthetischen Lipidmembranen mittels der verschiedenen polaritätssensitiven Farbstoffe in Abbildung 50 zeigte, dass die Sensitivität von Pro12A und NR4A verglichen mit Laurdan geringer ausfällt. Bei der Analyse von denaturierten und intakten zellulären Membranen wurde eine starke Sensitivität von Pro12A gegenüber strukturellen Änderungen von Proteinen festgestellt. Insbesondere die starke GP-Änderung bei  $T = 55\text{ °C}$  in Abbildung 51 d) deutet auf das Denaturieren von Membranproteinen hin, da die stärksten Änderungen der Lipidordnung in Zellmembranen deutlich unterhalb der Wachstumstemperatur von  $T = 37\text{ °C}$  detektiert wurden [63]. Zur Untersuchung der Abhängigkeit zellulärer Funktionen vom Zustand der Lipide scheint Laurdan daher besser geeignet. NR4A zeigte von allen Farbstoffen die geringste Sensitivität gegenüber Phasenzustandsänderungen synthetischer und zellulärer Membranen, weshalb sich auch dieser Farbstoff nicht als gute Alternative zu Laurdan erwies. Für detailliertere Studien der Abhängigkeit zellulärer Funktionen von der Plasmamembran empfiehlt sich daher die optische Analyse von Laurdan mittels Konfokalmikroskopie, im Rahmen derer prinzipbedingt weniger Fluoreszenzintensität aus anderen Fokusebenen gemessen wird als bei Messungen mittels Epifluoreszenz.

#### 4.6.3. Fazit

Die wichtigsten Ergebnisse der optischen Analyse der Lipidordnung in synthetischen und zellulären Membranen mittels der fluoreszenten Analyse der Farbstoffe Laurdan, Pro12A und NR4A sind:

- Im Vergleich zu Laurdan bewirkt die erhöhte Affinität von Pro12A und NR4A für die Plasmamembran eine Reduktion der intrazellulären Fluoreszenzintensität.
- Die Sensitivität von Pro12A und NR4A gegenüber der Temperaturabhängigkeit der Lipidordnung synthetischer Membranen ist deutlich geringer als die von Laurdan.
- Die mittels Pro12A und NR4A detektierten Phasenübergänge weisen eine höhere Schmelztemperatur auf, wonach die Lipidordnung der Plasmamembran gegenüber inneren Membranen erhöht ist.
- Alle drei Farbstoffe reagieren unterschiedlich sensibel auf strukturelle Änderungen der Membranproteine.

## 5. Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Studie sollte die Rolle der Lipidordnung für zelluläre Funktionen untersucht werden. Dafür wurde zunächst ein Versuchsaufbau entwickelt, mit welchem durch spektrale Analyse des Membranfarbstoffs Laurdan die Lipidordnung in zellulären Membranen über einen Temperaturbereich von  $T = -40\text{ °C}$  bis  $T = 95\text{ °C}$  gemessen werden konnte. Dabei wurde aufgezeigt, dass Zellmembranen ähnlich zu synthetischen Lipidvesikeln Phasenübergänge durchlaufen können. Der Phasenzustand der Membran hängt dabei neben der Temperatur auch von Parametern wie dem pH-Wert, dem Cholesterol- oder dem Proteingehalt der Membran ab.

Die mikroskopische Analyse auf Einzelzellniveau zeigte, dass die Lipidordnung von Zelle zu Zelle aber auch innerhalb einer Zellmembran stark variiert. Die interzelluläre Variation der Lipidordnung wurde genutzt, um herauszufinden, ob abhängig vom Ordnungszustand der Zellmembran der poröse Stofftransport von Rhodamin B als Permeabilitätssonde ebenfalls variiert. Dabei wurde eine Korrelation in der Form beobachtet, dass die Membranpermeabilität mit zunehmender Lipidordnung höher ausfällt. Selbige Abhängigkeit zeigte sich bei der Untersuchung des Stofftransports von Kieselgel-Nanopartikeln.

Aufgrund dieser Korrelation wirken sich Umwelteinflüsse, welche die Lipidordnung von Zellmembranen verändern, auch auf den Membrantransport aus: Es wurde beobachtet, dass eine Reduktion der Lipidordnung durch Adaptation an eine verringerte Wachstumstemperatur zu einer reduzierten Membranpermeabilität führte. Dagegen bewirkt eine lokal erhöhte Zelldichte eine Zunahme der Lipidordnung und infolgedessen einen erhöhten diffusiven Membrantransport.

Der Transport von Therapeutika in vivo findet nach oraler Einnahme und anschließender Resorption im Magen oder nach venöser Applikation über das Blutsystem statt. Die Untersuchung von synthetischen Membranen unter solch dynamischen Bedingungen zeigte, dass nicht nur die Lipidordnung, sondern auch die Permeabilität von Membranen, welche sich in der Nähe der Schmelztemperatur befinden, durch Scherkräfte stark beeinflusst werden. Weil sich Zellmembranen unter physiologischen Bedingungen mitten im Schmelzregime befinden und deren Membrantransport mit der Lipidordnung korreliert, kann geschlossen werden, dass Scherkräfte auch einen starken Einfluss auf deren Stofftransport nehmen. Eine detailliertere Untersuchung des Stofftransports an Zellmembranen unter Scherfluss erscheint daher sinnvoll.

Zur Untersuchung dieser und anderer Fragestellungen im Rahmen zukünftiger Studien, welche sich mit der Abhängigkeit zellulärer Funktionen von der Lipidordnung auseinandersetzen, wurden bereits neue Alternativen zum polaritätssensitiven Farbstoff Laurdan getestet. Ihre erhöhte Selektivität für die äußere Membran könnte sich gerade bei der Untersuchung von zellulären Funktionen, welche hauptsächlich durch die äußere Membran getragen werden, als nützlich erweisen. Dabei wurde beobachtet, dass ihre Spezifität mit einer reduzierten Sensitivität einhergeht. Eine bessere Alternative könnten Untersuchungen mittels Konfokalmikroskopie sein.

Zusammenfassend konnten die eingangs aufgestellten Hypothesen experimentell bestätigt werden: Zellmembranen zeigen kooperative Phasenübergänge der Lipidordnung und der Stofftransport über die Membran hinweg steht im direkten Zusammenhang mit dem Ordnungszustand der Lipidmoleküle. Die Lipidordnung stellt daher eine regulatorische Größe für die Zellfunktion des Stofftransports dar. Diese Erkenntnisse tragen zum Verständnis grundlegender Stoffwechselprozesse auf zellulärer Ebene bei, wodurch neue Therapieansätze membranassoziierter Krankheitsbilder entwickelt werden können.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] C. Nägeli, Die Stärkekörner: Morphologische, Physiologische, Chemisch-Physicalische Und Systematisch-Botanische Monographie, Schulthess, 1858.
- [2] W. Pfeffer, Osmotische Untersuchungen: Studien Zur Zellmechanik, W. Engelmann, 1877.
- [3] E. Gorter, F. Grendel, *J. Exp. Med.* 41 (1925) 439.
- [4] J.F. Danielli, H. Davson, *J. Cell. Comp. Physiol.* 5 (1935) 495–508.
- [5] S.J. Singer, G.L. Nicolson, *Science* (80-. ). 175 (1972) 720–731.
- [6] O.G. Mouritsen, M. Bloom, *Biophys. J.* 46 (1984) 141–153.
- [7] K. Gaus, E. Chklovskaya, B. Fazekas De St. Groth, W. Jessup, T. Harder, *J. Cell Biol.* 171 (2005) 121–131.
- [8] D.M. Owen, S. Oddos, S. Kumar, D.M. Davis, M.A.A. Neil, P.M.W. French, M.L. Dustin, A.I. Magee, M. Cebecauer, *Mol. Membr. Biol.* 27 (2010) 178–189.
- [9] G.D.R. M., C. Elena, H.J. M., A.L. O., H.J.E. K., *J. Virol.* 77 (2003) 8237–8248.
- [10] D.B. Iaea, F.R. Maxfield, *PLoS One* 12 (2017) 6–13.
- [11] P. Scheiffele, A. Rietveld, T. Wilk, K. Simons, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 2038–2044.
- [12] K. Gaus, S. Le Lay, N. Balasubramanian, M.A. Schwartz, *J. Cell Biol.* 174 (2006) 725–734.
- [13] S. Braig, B.U. Sebastian Schmidt, K. Stoiber, C. Händel, T. Möhn, O. Werz, R. Müller, S. Zahler, A. Koeberle, J.A. Käs, A.M. Vollmar, *New J. Phys.* 17 (2015) 83007.
- [14] J. Steinkühler, E. Sezgin, I. Urbančič, C. Eggeling, R. Dimova, *Commun. Biol.* 2 (2019) 337.
- [15] A.L. Hodgkin, A.F. Huxley, *J. Physiol.* 117 (1952) 500.
- [16] T. Heimburg, A.D. Jackson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 9790–9795.
- [17] T. Heimburg, A.D. Jackson, *Biophys. J.* 92 (2007) 3159–3165.
- [18] T. Heimburg, *Thermal Biophysics of Membranes*, John Wiley & Sons, 2008.
- [19] IStock, Tier. Zellstruktur (2022) [www.istockphoto.com](http://www.istockphoto.com).
- [20] H. Ebel, P. Grabitz, T. Heimburg, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 7353–7360.
- [21] H. Trauble, H. Eibl, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71 (1974) 214–219.
- [22] R.A. Böckmann, A. Hac, T. Heimburg, H. Grubmüller, *Biophys. J.* 85 (2003) 1647–1655.
- [23] T. Heimburg, *Biophys. J.* 103 (2012) 918–929.
- [24] J. V. Busto, A.B. García-Arribas, J. Sot, A. Torrecillas, J.C. Gómez-Fernández, F.M. Goñi, A. Alonso, *Biophys. J.* 106 (2014) 621–630.
- [25] R.N. McElhaney, *BBA - Rev. Biomembr.* 864 (1986) 361–421.
- [26] T. Mužić, F. Tounsi, S.B. Madsen, D. Pollakowski, M. Konrad, T. Heimburg, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1861 (2019) 183026.
- [27] E.F. DeLong, A.A. Yayanos, *Science* (80-. ). 228 (1985) 1101–1103.

- [28] P. Jurkiewicz, A. Olżyńska, M. Langner, M. Hof, *Langmuir* 22 (2006) 8741–8749.
- [29] T. Parasassi, F. Conti, E. Gratton, *Cell. Mol. Biol.* 32 (1986) 103–108.
- [30] T. Parasassi, E. Gratton, *J. Fluoresc.* 2 (1992) 167–174.
- [31] E. Parasassi, T and De Stasio, G and Ravagnan, G and Rusch, RM and Gratton, *Biophys. J.* 60 (1991) 179–189.
- [32] S.S.W. Leung, J. Brewer, L.A. Bagatolli, J.L. Thewalt, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1861 (2019) 183053.
- [33] A. Blicher, K. Wodzinska, M. Fidorra, M. Winterhalter, T. Heimburg, *Biophys. J.* 96 (2009) 4581–4591.
- [34] F.G. Strobl, F. Seitz, C. Westerhausen, A. Reller, A.A. Torrano, C. Bräuchle, A. Wixforth, M.F. Schneider, *Beilstein J. Nanotechnol.* 5 (2014) 2468–2478.
- [35] K.H. De Haas, C. Blom, D. Van den Ende, M.H.G. Duits, J. Mellema, *Phys. Rev. E* 56 (1997) 7132.
- [36] I. Hanasaki, J.H. Walther, S. Kawano, P. Koumoutsakos, *Phys. Rev. E* 82 (2010) 51602.
- [37] G.H. Folch, J. and Lees, M. and Sloane Stanley, *J Biol Chem* 226 (1957) 497–509.
- [38] F. Feijó Delgado, N. Cermak, V.C. Hecht, S. Son, Y. Li, S.M. Knudsen, S. Olcum, J.M. Higgins, J. Chen, W.H. Grover, S.R. Manalis, *PLoS One* 8 (2013).
- [39] J. Zhao, J. Wu, H. Shao, F. Kong, N. Jain, G. Hunt, G. Feigenson, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1768 (2007) 2777–2786.
- [40] A.G. Ayuyan, F.S. Cohen, *Biophys. J.* 91 (2006) 2172–2183.
- [41] S. Himbert, R.J. Alsop, M. Rose, L. Hertz, A. Dhaliwal, J.M. Moran-Mirabal, C.P. Verschoor, D.M.E. Bowdish, L. Kaestner, C. Wagner, M.C. Rheinstädter, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–14.
- [42] M.I. Angelova, S. Soléau, P. Méléard, F. Faucon, P. Bothorel, in: C. Helm, M. Lösche, H. Möhwald (Eds.), *Steinkopff, Darmstadt*, 1992, pp. 127–131.
- [43] G. Hohne, W.F. Hemminger, H.J. Flammersheim, *Differential Scanning Calorimetry*, Springer Berlin, 2003.
- [44] M. Bacalum, B. Zorila, M. Radu, *Anal. Biochem.* 440 (2013) 123–129.
- [45] C. Stringer, T. Wang, M. Michaelos, M. Pachitariu, *Nat. Methods* 18 (2021) 100–106.
- [46] S. Preibisch, S. Saalfeld, P. Tomancak, *Bioinformatics* 25 (2009) 1463–1465.
- [47] L. Redondo-Morata, M.I. Giannotti, F. Sanz, *Langmuir* 28 (2012) 12851–12860.
- [48] Z. Huang, E. London, *Chem. Phys. Lipids* 199 (2016) 11–16.
- [49] N. Färber, C. Westerhausen, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1864 (2022) 183794.
- [50] W. Yu, P.T. So, T. French, E. Gratton, *Biophys. J.* 70 (1996) 626–636.
- [51] Y.L. Zhang, J.A. Frangos, M. Chachisvilis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347 (2006) 838–841.
- [52] T. Parasassi, E. Gratton, W.M. Yu, P. Wilson, M. Levi, *Biophys. J.* 72 (1997) 2413–2429.
- [53] B. Fichtl, S. Shrivastava, M.F. Schneider, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–9.

- [54] B. Fichtl, I. Silman, M.F. Schneider, *Langmuir* 34 (2018) 4914–4919.
- [55] H. Meyer, *Arch. Für Exp. Pathol. Und Pharmakologie* 42 (1899) 109–118.
- [56] C.E. Overton, *Studien Über Die Narkose: Zugleich Ein Beitrag Zur Allgemeinen Pharmakologie*, G. Fischer, 1901.
- [57] S. Buchegger, A. Kamenac, S. Fuchs, R. Herrmann, P. Houdek, C. Gorzelanny, A. Obermeier, S. Heller, R. Burgkart, B. Stritzker, A. Wixforth, C. Westerhausen, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–10.
- [58] R.J. Labotka, A. Omachi, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 1166–1173.
- [59] N. Färber, J. Reitler, C. Westerhausen, *To Be Publ.* (2022).
- [60] D.M. Owen, C. Rentero, A. Magenau, A. Abu-Siniyeh, K. Gaus, *Nat. Protoc.* 7 (2012) 24–35.
- [61] S. Mazeres, E. Joly, A. Lopez, C. Tardin, *F1000Research* 3 (2014).
- [62] Z. Mamdouh, M.-C. Giocondi, C. Le Grimellec, *Eur. Biophys. J.* 27 (1998) 341–351.
- [63] C.S. Fedosejevs, M.F. Schneider, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 119 (2022) e2117521119.
- [64] E. Sezgin, I. Levental, S. Mayor, C. Eggeling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18 (2017) 361–374.
- [65] N. Färber, J. Reitler, J. Schäfer, C. Westerhausen, *Under Rev.* (2022).
- [66] C. Gosse, C. Bergaud, L. Peter, *Molecular Probes for Thermometry in Microfluidic Devices for Thermometry in Microfluidic Devices*, 2014.
- [67] M.P. Dinca, M. Gheorghe, M. Aherne, J. Martinez-quijada, T. Ma, G.H. Hall, M. Reynolds, (n.d.).
- [68] D. Liljequist, B. Elfving, K. Skavberg Roaldsen, *PLoS One* 14 (2019) e0219854.
- [69] L. Weng, F. Ellett, J. Edd, K.H.K. Wong, K. Uygun, D. Irimia, S.L. Stott, M. Toner, *Lab Chip* 17 (2017) 4077–4088.
- [70] J.B. Fleury, *RSC Adv.* 10 (2020) 19686–19692.
- [71] M.E. Lalande, V. Ling, R.G. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78 (1981) 363 LP – 367.
- [72] B. Snijder, R. Sacher, P. Rämö, E.-M. Damm, P. Liberali, L. Pelkmans, *Nature* 461 (2009) 520–523.
- [73] M. Frechin, T. Stoeger, S. Daetwyler, C. Gehin, N. Battich, E.-M. Damm, L. Stergiou, H. Riezman, L. Pelkmans, *Nature* 523 (2015) 88–91.
- [74] N. Färber, J. Reitler, M. Saule, C. Westerhausen, *To Be Publ.* (2022).
- [75] C. Westerhausen, F.G. Strobl, R. Herrmann, A.T. Bauer, S.W. Schneider, A. Reller, A. Wixforth, M.F. Schneider, *Biophys. J.* 102 (2012) 1032–1038.
- [76] S. Ahmed, R.R. Madathingal, S.L. Wunder, Y. Chen, G. Bothun, *Soft Matter* 7 (2011) 1936–1947.
- [77] S. Zhang, A. Nelson, P.A. Beales, *Langmuir* 28 (2012) 12831–12837.
- [78] S. Jacob, A.B. Nair, J. Shah, S. Gupta, S.H.S. Boddu, N. Sreeharsha, A. Joseph, P. Shinu, M.A. Morsy, *Pharmaceutics* 14 (2022) 533.
- [79] N. Santanam, S. Ramachandran, S. Parthasarathy, in: *Semin. Reprod. Endocrinol.*, Copyright© 1998 by Thieme Medical Publishers, Inc., 1998, pp. 275–280.

- [80] L.S. Chia, J.E. Thompson, M.A. Moscarello, *FEBS Lett.* 157 (1983) 155–158.
- [81] C. Richter, *Chem. Phys. Lipids* 44 (1987) 175–189.
- [82] K. Shapero, F. Fenaroli, I. Lynch, D.C. Cottell, A. Salvati, K.A. Dawson, *Mol. Biosyst.* 7 (2011) 371–378.
- [83] Q. Gan, D. Dai, Y. Yuan, J. Qian, S. Sha, J. Shi, C. Liu, *Biomed. Microdevices* 14 (2012) 259–270.
- [84] B. Halamoda-Kenzaoui, M. Ceridono, P. Colpo, A. Valsesia, P. Urbán, I. Ojea-Jiménez, S. Gioria, D. Gilliland, F. Rossi, A. Kinsner-Ovaskainen, *PLoS One* 10 (2015) e0141593.
- [85] X. Liu, B. Sui, J. Sun, *Biomaterials* 121 (2017) 64–82.
- [86] R. Cornu, C. Chrétien, Y. Pellequer, H. Martin, A. Béduneau, *Arch. Toxicol.* 94 (2020) 1191–1202.
- [87] Y. Ye, L. Hui, K.L. Lakpa, Y. Xing, H. Wollenzien, X. Chen, J.X. Zhao, J.D. Geiger, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 97 (2018) 297–305.
- [88] J.Y. Liu, C.M. Sayes, *Toxicol. Res. (Camb.)* (2022) tfac038.
- [89] M. Vallet-Regí, F. Schüth, D. Lozano, M. Colilla, M. Manzano, *Chem. Soc. Rev.* (2022).
- [90] K. Yamamoto, J. Ando, *J. Cell Sci.* 126 (2013) 1227–1234.
- [91] B.R. Blackman, K.A. Barbee, L.E. Thibault, *Ann. Biomed. Eng.* 28 (2000) 363–372.
- [92] M.C. LaPlaca, V.M.-Y. Lee, L.E. Thibault, *J. Neurotrauma* 14 (1997) 355–368.
- [93] D.M. Hallow, R.A. Seeger, P.P. Kamaev, G.R. Prado, M.C. LaPlaca, M.R. Prausnitz, *Biotechnol. Bioeng.* 99 (2008) 846–854.
- [94] N. Salari, S. Rasoulpoor, E. Valipour, K. Mansouri, Y. Bartina, S. Dokaneheifard, M. Mohammadi, F. Abam, *Anticancer. Drugs* 33 (2022) e9–e20.
- [95] M. Chaudhry, P. Lyon, C. Coussios, R. Carlisle, *Expert Opin. Drug Deliv.* (2022).
- [96] N. Färber, J. Reitler, A. Kamenac, C. Westerhausen, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-General Subj.* 1866 (2022) 130199.
- [97] B. Wunderlich, C. Leirer, A.-L. Idzko, U.F. Keyser, A. Wixforth, V.M. Myles, T. Heimbürg, M.F. Schneider, *Biophys. J.* 96 (2009) 4592–4597.
- [98] D. Papahadjopoulos, K. Jacobson, S. Nir, I. Isac, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 311 (1973) 330–348.
- [99] V.F. Antonov, A.A. Anosov, V.P. Norik, E. Smirnova, *Biofizika* 50 (2005) 867–877.
- [100] O. Sandre, L. Moreaux, F. Brochard-Wyart, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96 (1999) 10591–10596.
- [101] R.B. Lira, F.S.C. Leomil, R.J. Melo, K.A. Riske, R. Dimova, *Adv. Sci.* 8 (2021) 2004068.
- [102] T.G. Papaioannou, E.N. Karatzis, M. Vavuranakis, J.P. Lekakis, C. Stefanadis, *Int. J. Cardiol.* 113 (2006) 12–18.
- [103] J. Strony, A. Beaudoin, D. Brands, B. Adelman, *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 265 (1993) H1787–H1796.
- [104] R. Dimova, K.A. Riske, S. Aranda, N. Bezlyepkina, R.L. Knorr, R. Lipowsky, *Soft Matter* 3 (2007) 817–827.

- [105] E. von Lippert, *Zeitschrift Für Elektrochemie, Berichte Der Bunsengesellschaft Für Phys. Chemie* 61 (1957) 962–975.
- [106] G. Weber, F.J. Farris, *Biochemistry* 18 (1979) 3075–3078.
- [107] L. Jin, A.C. Millard, J.P. Wuskell, X. Dong, D. Wu, H.A. Clark, L.M. Loew, *Biophys. J.* 90 (2006) 2563–2575.
- [108] C.S. Lim, H.J. Kim, J.H. Lee, Y.S. Tian, C.H. Kim, H.M. Kim, T. Joo, B.R. Cho, *ChemBioChem* 12 (2011) 392–395.
- [109] E. Sezgin, T. Sadowski, K. Simons, *Langmuir* 30 (2014) 8160–8166.
- [110] D.I. Danylchuk, E. Sezgin, P. Chabert, A.S. Klymchenko, *Anal. Chem.* 92 (2020) 14798–14805.
- [111] D.I. Danylchuk, S. Moon, K. Xu, A.S. Klymchenko, *Angew. Chemie* 131 (2019) 15062–15066.

## 7. Anhang

Die Prozessierung von Fluoreszenzspektren und mikroskopischer Bilddaten wurde automatisiert unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten Skripte durchgeführt, welche auch unter <https://github.com/nicolasfaerberaux/PhD-Thesis> hinterlegt sind.

### 7.1. Python Skript zur Analyse spektraler Daten

```
# Sollen die GP-Daten gespeichert werden? 1 = Ja 0 = Nein
savedata = 0
# Sollen die Ergebnis-Graphen gespeichert werden? 1 = Ja 0 = Nein
savegraphs = 0
# Sollen die Entwicklung der GP-Graphen für ein Video gespeichert werden? 1 = Ja 0 = Nein
save_gp_evolution = 0
# Sollen die Fit-Daten gespeichert werden? 1 = Ja 0 = Nein
savefits = 0
# Sollen die Daten als Funktion der Zeit oder als Funktion der Temperatur geplottet werden?
# 1 = Temperatur, 0 = Zeit
time_or_temperature = 1
# Name des Ordners angeben, der die Spektren enthält
#Dateiname der Spektren in der Form: „123456sec-12,34°C-abc...xyz.txt“
sample = "Parameter_XY"
# Pfad des Experimentordners angeben
path = "C:\\Users\\...\\Experiment_XY\\"
# Wellenlängenbereich in nm für den spektralen Fit angeben
min_wavelength = 380 #default:380
max_wavelength = 670 #default:670
# Wellenlängenbereich in nm für Berechnung von GP angeben
min_blue_wavelength = 420 # 40nm Bandbreite um 440 nm zentriert
max_blue_wavelength = 460
min_green_wavelength = 470 # 40nm Bandbreite um 490 nm zentriert
max_green_wavelength = 510
#Benötigte Pakete einbinden
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
import os
from scipy.optimize import curve_fit
import scipy.integrate as integrate
#Datentyp der Spektralen Daten festlegen
dt = np.dtype([('wavelength', float), ('intensity', float)])
#Modellparameter nach Bacalum et al. [44]:
def gel_vmin(vm): #vm in nm
    return 1150.7+0.877*vm
def gel_vmax(vm):
    return -99.3+1.058*vm
def gel_rho(vm):
    return (vm-gel_vmin(vm))/(gel_vmax(vm)-vm)
def gel_a(vm):
    return vm+((gel_vmax(vm)-gel_vmin(vm))*gel_rho(vm))/(gel_rho(vm)**2-1)
```

```

def gel_lognorm(v, im, vm):
    return im*np.exp(-(np.log(2)/np.log(gel_rho(vm))**2)*np.log((gel_a(vm)-v)/(gel_a(vm)-vm))**2)
def fluid_vmin(vm): #vm in nm
    return -958.4+0.966*vm
def fluid_vmax(vm):
    return 1688.8+0.986*vm
def fluid_rho(vm):
    return (vm-fluid_vmin(vm))/(fluid_vmax(vm)-vm)
def fluid_a(vm):
    return vm+((fluid_vmax(vm)-fluid_vmin(vm))*fluid_rho(vm))/(fluid_rho(vm)**2-1)
def fluid_lognorm(v, im, vm):
    return im*np.exp(-(np.log(2)/np.log(fluid_rho(vm))**2)*np.log((fluid_a(vm)-v)/(fluid_a(vm)-vm))**2)
def _2lognorm(v, gel_int, gel_vm, fluid_int, fluid_vm):
    return gel_lognorm(v, gel_int, gel_vm)+fluid_lognorm(v, fluid_int, fluid_vm)
# Dateinamen der Spektren aus Experimentordner einlesen
spectrum_data = sorted(os.listdir(path+sample+"\\"))
# Temperaturen aus Dateinamen lesen, default: i[10:15]
temperature = [float(i[10:15].replace(',','.')) for i in spectrum_data]
# Zeiten aus Dateinamen lesen, default: i[0:6], für oceanview: i[6:11]
time = [float(i[0:6].replace(',','.')) for i in spectrum_data]
# Arrays für zu berechnende Größen initialisieren
gp_by_intensity = np.empty(len(spectrum_data))
gel_area = np.empty(len(spectrum_data))
fluid_area = np.empty(len(spectrum_data))
gp_by_fit = np.empty(len(spectrum_data))
overall_area = np.empty(len(spectrum_data))
# Über alle Spektren im Ordner "Parameter_XY" iterieren
for i in range(0,len(spectrum_data)):
    # Spektren im vorgegebenen Spektralbereich einlesen
    matrix = open(path+sample+"\\"+spectrum_data[i])
    data = np.loadtxt((line.replace(',','.') for line in matrix), dtype = dt, skiprows = 14)
    data = np.delete(data, np.where(data['wavelength'] < min_wavelength))
    data = np.delete(data, np.where(data['wavelength'] > max_wavelength))

    # GP aus Intensitätsverhältnis von Grün und Blau berechnen
    blue_wavelengths = np.delete(data, np.where(data['wavelength'] < min_blue_wavelength))
    blue_wavelengths = np.delete(blue_wavelengths, np.where(blue_wavelengths['wavelength'] >
        max_blue_wavelength))
    blue_intensity = np.sum(blue_wavelengths['intensity'])
    green_wavelengths = np.delete(data, np.where(data['wavelength'] < min_green_wavelength))
    green_wavelengths = np.delete(green_wavelengths, np.where(
        green_wavelengths['wavelength'] > max_green_wavelength))
    green_intensity = np.sum(green_wavelengths['intensity'])
    gp_by_intensity[i] = (blue_intensity-green_intensity)/(blue_intensity+green_intensity)
# Wellenzahl in inversen cm für Fitfunktion bestimmen und Spektrum plotten
wavenumber = (1/(data['wavelength']))*10000000
plt.plot(data['wavelength'], data['intensity'], '.k')

# Spektrum fitten, Startwerte für Fit-Parameter angeben und deren Grenzen angeben
popt, pcov = curve_fit(_2lognorm, wavenumber, data['intensity'],
    p0=[30000, 22222, 8000, 20408], bounds=([0, 21276, 0, 19607],

```

```

        [np.inf, 23255, np.inf, 21276]))
perr = np.sqrt(np.diag(pcov))
# Speichern Fit-Daten, wenn gewünscht
if(savefits == 1):
    fitdata = np.empty([5, len(data)])
    fitdata[0] = data['wavelength']
    fitdata[1] = data['intensity']
    fitdata[2] = _2lognorm(wavenumber, *popt)
    fitdata[3] = gel_lognorm(wavenumber, *popt[0:2])
    fitdata[4] = fluid_lognorm(wavenumber, *popt[2:4])
    if not os.path.exists(path+"spektren_fits"):
        os.mkdir(path+"spektren_fits")
    np.savetxt((path+"spektren_fits\\"+str(temperature[i])+".txt"), np.transpose(fitdata),
               header="Wavelength Intensity Fit Blue Green", comments=")
# Plotten der approximierten Spektren
plt.plot(data['wavelength'], _2lognorm(wavenumber, *popt), 'r')
plt.plot(data['wavelength'], gel_lognorm(wavenumber, *popt[0:2]), 'b')
plt.fill_between(data['wavelength'], gel_lognorm(wavenumber, *popt[0:2]).min(),
                 gel_lognorm(wavenumber, *popt[0:2]), facecolor="blue", alpha=0.5)
plt.plot(data['wavelength'], fluid_lognorm(wavenumber, *popt[2:4]), 'g')
plt.fill_between(data['wavelength'], fluid_lognorm(wavenumber, *popt[2:4]).min(),
                 fluid_lognorm(wavenumber, *popt[2:4]), facecolor="green", alpha=0.5)

plt.grid()
plt.xlabel('Wavelength [nm]')
plt.ylabel('Intensity [counts]')
plt.title(spectrum_data[i])
# GP-Graphen für ein Video speichern, wenn gewünscht
if(savegraphs == 1):
    plt.savefig(path+sample+"-"+spectrum_data[i]+".png")
plt.show()
# Nützliche Größen in arrays speichern
gel_area[i] = integrate.trapz(gel_lognorm(wavenumber, *popt[0:2]), x=data['wavelength'])
fluid_area[i] = integrate.trapz(fluid_lognorm(wavenumber, *popt[2:4]), x=data['wavelength'])
overall_area[i] = fluid_area[i]+gel_area[i]
gp_by_fit[i] = (gel_area[i]-fluid_area[i])/(gel_area[i]+fluid_area[i])
# Entwicklung der GP-Graphen für ein Video speichern, falls gewünscht
if(save_gp_evolution == 1):
    plt.subplots_adjust(wspace=0.3,hspace=0.5)
    fig = plt.figure(figsize=(10,5))
    fig.text(0.35,0.74, str(round(temperature[i], 1))+ '°C', style='italic', backgroundcolor = 'w',
            fontsize=15)
    plt.subplot(121)
    plt.xlim([380,670])
    plt.xticks(range(400,651,50))
    plt.ylim([0,21000])
    plt.yticks(range(0,20001,4000))
    plt.plot(data['wavelength'], data['intensity'], '.k')
    plt.plot(data['wavelength'], _2lognorm(wavenumber, *popt), 'r')
    plt.plot(data['wavelength'], gel_lognorm(wavenumber, *popt[0:2]), 'b')
    plt.fill_between(data['wavelength'], gel_lognorm(wavenumber, *popt[0:2]).min(),
                    gel_lognorm(wavenumber, *popt[0:2]), facecolor="blue", alpha=0.5)
    plt.plot(data['wavelength'], fluid_lognorm(wavenumber, *popt[2:4]), 'g')

```

```

plt.fill_between(data['wavelength'], fluid_lognorm(wavenumber, *popt[2:4]).min(),
                 fluid_lognorm(wavenumber, *popt[2:4]), facecolor="green", alpha=0.5)
plt.grid()
plt.xlabel('Wavelength [nm]')
plt.title('Intensity [counts]')
plt.subplot(122)
plt.plot(temperature[0:i], gp_by_fit[0:i], label='by Fit')
plt.xlim([-45,95])
plt.xticks(range(-40,90,20))
plt.ylim([-0.7, 1.1])
plt.yticks([-0.5, -0.25, 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1])
plt.xlabel('Temperature [°C]')
plt.title('Generalized polarization')
plt.grid()
plt.savefig(path+"video\\"+"spectrum_data[i]+".png")
plt.show()
# GP als Funktion der Zeit oder Temperatur plotten
if(time_or_temperature == 1):
    x_data = temperature
    x_label = 'Temperature [°C]'
else:
    x_data = time
    x_label = 'Time [s]'
#GP-Daten plotten
plt.plot(x_data, gp_by_fit, label='by Fit')
plt.xlabel(x_label)
plt.ylabel('Generalized Polarization by Fit')
plt.plot(x_data, gp_by_intensity, label='by intensity ratio')
plt.legend()
plt.title('Phase state parameters')
plt.grid()
plt.show()
#GP-Daten speichern, wenn gewünscht
result = np.empty([5,len(spectrum_data)])
result[0] = temperature
result[1] = time
result[2] = gp_by_fit
result[3] = gp_by_intensity
result[4] = overall_area # entspricht der Fluoreszenzintensität
#GP-Daten speichern, wenn gewünscht
if(savedata == 1):
    np.savetxt((path+sample+"-doublelognormalfit_result.txt"), np.transpose(result),
               header="Temperature Time Fit_GP Int_ratio_GP Overall_int", comments=")

```

## 7.2. Fiji-Skript zum Zusammenfügen einzelner Bilddateien und zur Vesikelanalyse

```
//Am Mikroskop können XY-Scans der Breite X und der Länge Y aufgenommen werden, welche mit
diesem Skript zu einem großen Bild zusammengesetzt werden können
//Dialog zur Ordnerauswahl erzeugen, Im Ordner sollten Unterordner liegen, die nach dem Schema
Name_Scan_BreitexScan_Länge benannt sind. Beispiel: Experiment1_10x11, Experi-
ment2_13x14,...
//Im jeweiligen Ordner liegen die Bilddateien benannt nach dem Schema
Bildname_12345_Kanalnummer. Beispiel: Image1_00001_1, Image1_00001_2, Image1_00002_1,...
_1 entspricht beispielsweise dem TexasRed-Kanal und _2 entspricht dem FITC-Kanal
dir = getDirectory("Experiment auswählen");
//Dateinamen auslesen,
images = getFileList(dir);
//Standardparameter erzeugen
//Abmessungen des Scans
x = 10;
y = 12;
//Kanalanzahl
number_of_channels = 2;
//Wie heißen die Kanäle?
channel = newArray("490", "440", "TexasRed", "Cy5", "BrightField");
//Auf welchem Kanal soll die Intensität gemessen werden?
measurement_channel = newArray("Fitc", "TexasRed", "Cy5", "DAPI");
//Wie viele Scans wurden pro Experiment ausgeführt?
number_of_scans = 1;
//Pfad für segmentiertes Bild, falls bereits berechnet
maskpath = "path";
//Rolling Ball Radius für zu segmentierendes Bild
radius_binarize = 50;
//Rolling Ball Radius für zu messendes Bild
radius_measure = 50;
//Größenangabe für zu detektierende Objekte z.B. Vesikel
min = 50;
max = 500;
//Maß für die Rundheit der zu detektierende Objekte z.B. Vesikel
roundmin = 0;
roundmax = 1.0;
//Pixel/µm-Umrechnung
factor = 1.704;
//Intensitätsschwellwert
thrshvalue = 0;
//Anzahl der Experimente
number_of_measurements = 1;
//Dialoge erzeugen, um die Standard Parameter zu ändern
Dialog.create("Awesome Data analysis program");
Dialog.addString("X-Abmessungen des scans:" ,x);
Dialog.addString("Y-Abmessungen des scans:" ,y);
Dialog.addNumber("Anzahl der Kanäle:", number_of_channels);
Dialog.addString("Anzahl der scans:" ,number_of_scans);
Dialog.show();
x = Dialog.getString();
y = Dialog.getString();
```

```

number_of_channels = Dialog.getNumber();
number_of_scans = Dialog.getString();
Dialog.create("Awesome Data analysis program");
for (i = 0; i < number_of_channels; i++) {
    Dialog.addString("name of channel "+toString(i+1)+":", channel[i]);
Dialog.show();
for (i = 0; i < number_of_channels; i++) {
    channel[i] = Dialog.getString();
}
Dialog.create("Awesome Data analysis program");
//Sollen die Einzelbilder zusammengefügt werden?
Dialog.addCheckbox("Stitch pictures", true);
//Sollen die Pixel/µm Konvertierung durchgeführt werden?
Dialog.addCheckbox("Set scale", false);
//Welches Objektiv wurde verwendet bzw. welche Px/µm Konvertierung soll durchgeführt werden?
Dialog.addMessage("2.5x: 2.398 µm/px\n4x: 1.704 µm/px\n5x: 1.248 µm/px\n10x: 0.627
µm/px\n20x: 0.309 µm/px\n40x: 0.155 µm/px")
// Alternative Px/µm Konvertierung verwenden?
Dialog.addString("Scale factor [µm/px]:", factor);
//Mehrere zusammengefügte Bilder zu einem Stack zusammenfassen?
Dialog.addCheckbox("Create stack for each channel", false);
//Bildsegmentierung durchführen?
Dialog.addCheckbox("Binarize stack", false);
//Vesikel detektieren und Permeabilität messen?
Dialog.addCheckbox("Analyze particles in binarized stack and measure", false);
Dialog.show();
stitch = Dialog.getCheckbox();
setscale = Dialog.getCheckbox();
factor = Dialog.getString();
create_stack = Dialog.getCheckbox();
binarize = Dialog.getCheckbox();
analyze = Dialog.getCheckbox();
//Optionen für die Segmentierung
if (binarize == true) {
    Dialog.create("Binarization options");
    //Es kann entweder nur ein Intensitätsschwellwert verwendet werden, oder bei schlechtem
    Kontrastzusätzlich vorher der Gradient des Bildes berechnet werden
    Dialog.addChoice("binarize method:", newArray("find edges and threshold", "threshold
only"));
    //Kanal für Segmentierung festlegen
    Dialog.addChoice("channel to binarize:", channel);
    Dialog.show();
    method = Dialog.getChoice();
    channel_binarize = Dialog.getChoice();
    if (method == "threshold only") {
        Dialog.create("Awesome Data analysis program");
        //Hintergrundintensität vor Segmentierung korrigieren
        Dialog.addCheckbox("Subtract background before thresholding", false);
        Dialog.addString("Rolling ball radius in px:", radius_binarize);
        Dialog.show();
        bgsb_binarize = Dialog.getCheckbox();
        radius_binarize = Dialog.getString();

```

```

    }
}
//Optionen für die Vesikeldetektion festlegen: Größe, Rundheit, Anzahl der Messungen
if (analyze == true) {
    Dialog.create("Particle analysis options");
    Dialog.addString("Minimum particle size:" ,min);
    Dialog.addString("Maximum particle size:" ,max);
    Dialog.addString("Minimum particle roundness:" ,roundmin);
    Dialog.addString("Maximum particle roundness:" ,roundmax);
    Dialog.addNumber("number channels to measure afterwards:", number_of_measurements);
    Dialog.show();
    min = Dialog.getString();
    max = Dialog.getString();
    roundmin = Dialog.getString();
    roundmax = Dialog.getString();
    number_of_measurements = Dialog.getNumber();
    Dialog.create("Measurement options");
    for (i = 0; i < number_of_measurements; i++) {
        Dialog.addChoice("channels to measure:", measuremnt_channel);
    }
    Dialog.addCheckbox("Subtract image background before measurement", true);
    Dialog.addString("Rolling ball radius in px:" ,radius_measure);
    Dialog.show()
    for (i = 0; i < number_of_measurements; i++) {
        measuremnt_channel[i] = Dialog.getChoice();
    }
    bgsb_measure = Dialog.getCheckbox();
    radius_measure = Dialog.getString();
}
//Einzelbilder zusammensetzen
if (stitch == true){
    for (i = 0; i < number_of_channels; i++) {
        File.makeDirectory(dir+channel[i]);
    }
    for (j = 0; j < number_of_channels; j++) {
        for (i = 0; i < number_of_scans; i++) {
            image_name = substring(images[0], 0, 7) + "{iiii}" + toString(j+1) + ".tif";
            run("Grid/Collection stitching", "type=[Grid: row-by-row] order=[Left & Up]
            grid_size_x="+x+" grid_size_y="+ y + " tile_overlap=0
            first_file_index_i="+toString(i*parseInt(x)*parseInt(y)+1)+"
            directory="+dir+"file_names=" + image_name + "
            output_textfile_name=TileConfiguration.txt
            fusion_method=[Linear Blending] regression_threshold=0.30
            max/avg_displacement_threshold=2.50
            absolute_displacement_threshold=3.50 invert_x invert_y
            computation_parameters=[Save computation time (but use more RAM)]
            image_output=[Fuse and display] use");
            if (setscale == true) {
                run("Set Scale...", "distance=1 known="+factor+" pixel=1 unit=µm");
            }
            saveAs(dir + channel[j] + "/" + toString(i) + "-" + channel[j] + ".tif");
            close();
        }
    }
}

```

```

        }
    }
}
//Gesamtbilder zu Stacks zusammenfügen
if (create_stack == true) {
    for (j = 0; j < number_of_channels; j++) {
        run("Image Sequence...", "open="+dir + channel[j] + "/0-"+ channel[j] + ".tif sort");
        saveAs(dir + channel[j] + "/" + channel[j] + "-stack.tif");
        close();
    }
}
//Gesamtbilder segmentieren
if (binarize == true) {
    open(dir + channel_binarize + "/" + channel_binarize + "-stack.tif");
    if (method == "find edges and threshold") {
        run("Find Edges", "stack");
        run("Threshold...");
        waitForUser("Please adjust threshold and afterwards click OK");
        Dialog.create("DAPI-Threshold value");
        Dialog.addString("Which threshold value did you use?:" ,0);
        Dialog.show();
        thrshvalue = Dialog.getString();
        run("Fill Holes", "stack");
        run("Watershed", "stack");
        maskpath = dir + channel_binarize + "/" + channel_binarize + "-stack-find_edges-
            threshold("+thrshvalue+)-fill_holes-watershed.tif";
        saveAs(maskpath);
        close();
    } else {
        if (bgsb_binarize == true) {
            run("Subtract Background...", "rolling=" + radius_binarize + " stack");
        }
        run("Threshold...");
        waitForUser("Please adjust threshold, apply and click OK");
        Dialog.create("DAPI-Threshold value");
        Dialog.addString("Which treshold value did you use?:" ,0);
        Dialog.show();
        thrshvalue = Dialog.getString();
        run("Watershed", "stack");
        if (bgsb_binarize == true) {
            maskpath = dir + channel_binarize + "/" + channel_binarize + "-stack-
                bgsb("+radius_binarize+"px)-treshold("+thrshvalue+)-
                watershed.tif";
            saveAs(maskpath);
        } else {
            maskpath = dir + channel_binarize + "/" + channel_binarize + "-stack-
                threshold("+thrshvalue+)-watershed.tif";
            saveAs(maskpath);
        }
        close();
    }
}
}

```

```

//Vesikel detektieren und FITC-Dextran-Intensitäten messen
if (analyze == true) {
    for (i = 0; i < number_of_measurements; i++) {
        open(dir + measurement_channel[i] + "/" + measurement_channel[i] + "-stack.tif");
        if (bgsb_measure == true) {
            run("Subtract Background...", "rolling=" + radius_measure + " stack");
        }
        run("Set Measurements...", "mean centroid display
            redirect="+measurement_channel[i] + "-stack.tif"+" decimal=3");
        open(maskpath);
        run("Analyze Particles...", "size="+min+"-"+max+" circularity="+roundmin+"-
            "+roundmax+" exclude clear include add stack");
        roiManager("Measure");
        selectWindow("Results");
        saveAs(dir + measurement_channel[i] + "/" + measurement_channel[i] + ".txt");
        close("Results");
        close("*");
        close("ROI Manager");
    }
}

```

### 7.3. Python-Skript zur Zellanalyse

```
#Benötigte Pakete einbinden
import numpy as np
import time, os, sys
from urllib.parse import urlparse
import matplotlib.pyplot as plt
import matplotlib as mpl
from cellpose import utils, io
import cv2 as cv
from cellpose import models, io
from cellpose import plot
from tqdm import tqdm
import math
from PIL import Image, ImageDraw, ImageFont
import PIL.Image
# Maximale Bildgröße für PIL.Image Paket erweitern
PIL.Image.MAX_IMAGE_PIXELS = 186613760
# Eine Bildsegmentierung mit cellpose durchführen, 1 = Ja, 0 = Nein
create_binary_mask_with_cellpose = 0
# Kanal für die Segmentierung aussuchen _440 oder _490
channel_for_segmentation = '_490' # _440 or _490
# Schätzung für Zelldurchmesser angeben, adhärente HeLa Zellen mit 10x Objektiv: 38.79, None für
  automatisierte Schätzung
cell_pose_diameter = 38.79
# Mittleren GP-Wert für Zellen berechnen, erstellt außerdem Datei mit allen Pixelinformationen,
  1 = Ja, 0 = Nein
calculate_pixel_data_and_mean_values = 0
# dritten Kanal für Stofftransportmessungen auswerten, 1 = Ja, 0 = Nein
with_dye_uptake = 0
# Maximale Zellfläche in Pixeln angeben, standard: 5000 (10x Objektiv), zu große Werte erzeugen
  große Pixeldatendateien
cell_max_size = 5000
# Minimale Zellfläche in Pixeln angeben
cell_min_size = 1
# Konstanten Hintergrundwert abziehen, 1 = Ja, 0 = Nein
subtract_background = 0
background_value = 0
# Die Zahl nächster Nachbarn bestimmen, 1 = Ja, 0 = Nein
calculate_neighbours = 1
# Schwellwert für Nachbar-Klassifizierung angeben
nearest_neighbours_thres = 50 #def:50
# Farbbild aus 440/490/Stofftransport Bilder mit Segmentierung erzeugen, 1 = Ja, 0 = Nein
create_color_picture_with_outlines = 1
# Farbbild aus 440/490/Stofftransport Bilder mit Segmentierung und Nachbaranzahl erzeugen, 1 = Ja,
  0 = Nein
draw_number_of_neighbours_in_color_picture = 1
# Zwischen innerer und äußerer Zellmembran differenzieren, 1 = Ja, 0 = Nein
calculate_inner_outer_mean_gp = 0
# Schwellwert ab welchem Abstand vom Zellzentrum die äußere Membran beginnt
distance_from_centroid_trsh = 15 #px
# Stofftransport vs. GP und GP-Histogramm plotten, 1 = Ja, 0 = Nein
plot_data = 0
```

```

hist_range = (-0.4, 0.2)
# mehrere Datensätze zu Mittelwert, Stabwa und SE zusammenfassen, 1 = Ja, 0 = Nein
reduce_datasets = 0
# Die Zusammenfassungsvergrößerungen speichern, 1 = Ja, 0 = Nein
save_plots = 0
# Welche Datensätze zusammenfassen?
samples_to_reduce = ['Experiment_1', 'Experiment_2', 'Experiment_3']
# Experimentpfad angeben
    Im angegebenen Ordner müssen folgende Ordner vorhanden sein:
    "image_data": Hier müssen die auszuwertenden Bilder liegen. Beispiel 440/490-Messung mit
        Stofftransport im TexasRed-Kanal(TR)
        Die 440/490 wurden in ImageJ um einen konstanten Hintergrundintensitätswert
        korrigiert, Das TR-Bild wurde mit 100 Pixel Rolling Ball bearbeitet -> Benennung:
        Experiment_1_440-bgsb-constvalue.tif, Experiment_1_490-bgsb-constvalue.tif,
        Experiment_1_TR-bgsb100px.tif
    "cellpose_masks": Hier wird das segmentierte Bild als .png und als .npy gespeichert, Farbbilder und
        Farbbilder mit nächsten Nachbarn landen auch hier
    "mean_data": Hier werden die GP und Transport-Mittelwerte, die Radiale Auswertung und die
        innen vs. außen Analyse gespeichert.
    "pixel_data" .npy Dateien mit Zellpixeldaten
    "centroid_masks": Segmentierte Bilder mit Distanz zum Mittelpunkt- und Schwellwertdarstellung
    "plot_data": I(GP) und GP-Histogramme der zusammengefassten Datensätze
exp_path = "C:\\Users\\...\\Stofftransport_vs_Lipidordnung\\"
# Einzeln auszuwertende Experimente angeben
samples = ['Experiment_1', 'Experiment_2', 'Experiment_3']

# Funktion zum Zusammenfassen eines Datensatzes (z.B. I(GP)) aus N Punkten zu Wurzel(N) Werten
def reduce_gp_int_data(gp_data, intensity_data):
    number_of_cells = len(gp_data)
    number_of_data_points = int(np.sqrt(number_of_cells))
    data = np.zeros(number_of_cells, dtype = np.dtype([('gp', float), ('intensity', float)]))
    data['gp'] = gp_data
    data['intensity'] = intensity_data
    data = np.sort(data, axis = 0, order = 'gp')
    result = np.zeros(number_of_data_points, dtype = np.dtype([('gp', float), ('intensity', float),
('stdev', float), ('se', float)]))
    for i in range(0, number_of_data_points):
        result['gp'][i] = np.mean(data['gp'][i*number_of_data_points:(i+1)*number_of_data_points])
        result['intensity'][i] = np.mean(data['intensity'][i*number_of_data_points:(i+1)*num-
ber_of_data_points])
        result['stdev'][i] = np.std(data['intensity'][i*number_of_data_points:(i+1)*num-
ber_of_data_points])
        result['se'][i] = result['stdev'][i] / np.sqrt(number_of_data_points)
    return result

# Funktion zur Berechnung eines GP-Histogramms mit Bin-Breite 0,01
def calculate_gp_histogram(gp_data):
    hist, bin_edges = np.histogram(gp_data, bins = 200, range=(-1,1))
    bin_centers = np.zeros([len(bin_edges)-1])
    for i in range(len(bin_centers)):
        bin_centers[i] = bin_edges[i] + (bin_edges[i+1]-bin_edges[i])/2
    return [bin_centers, hist]

```

```

#Iterieren über Experiment_1, Experiment_2, ...
for sample in samples:
    image_data_path = exp_path+'image_data\\'+ sample
    mask_data_path = exp_path+'cellpose_masks\\'+sample + channel_for_segmentation
    mean_data_path = exp_path+'mean_data\\'
    pixel_data_path = exp_path+'pixel_data\\'
    centroid_masks_path = exp_path+'centroid_masks\\'
    plot_data_path = exp_path+'plot_data\\'

#Bildsegmentierung, wenn gewünscht
if create_binary_mask_with_cellpose == 1:
    # Grafikkarte Nutzen und Zellmembranen detektieren, Zur Detektion von Zellkernen:
    model_type='nuclei'
    model = models.Cellpose(gpu=True, model_type='cyto')
    img = io.imread(image_data_path + channel_for_segmentation + '-bgsb-constvalue.tif')
    masks, flows, styles, diams = model.eval(img, diameter=cell_pose_diameter, channels=[0,0])
    io.masks_flows_to_seg(img, masks, flows, diams, mask_data_path, channels=[0,0])
    io.save_to_png(img, masks, flows, mask_data_path)

#GP- und Transportmittelwerte berechnen, wenn gewünscht
if calculate_pixel_data_and_mean_values == 1:
    # cellpose Segmentierungsdaten laden
    dat = np.load(mask_data_path+'_seg.npy', allow_pickle=True).item()
    outlines = dat['outlines']
    # Cellpose Segmentierungsmaske laden
    mask = dat['masks']
    # Die Pixelwerte der Maske entsprechen der Zellnummer
    number_of_cells = mask.max()
    # Bilder für GP-Berechnung laden
    image_440 = io.imread(image_data_path+'_440-bgsb-constvalue.tif')
    image_490 = io.imread(image_data_path+'_490-bgsb-constvalue.tif')
    # Hintergrundkorrektur, falls gewünscht
    if subtract_background == 1:
        image_440 = image_440 - background_value
        image_490 = image_490 - background_value
    # Transportauswertung, falls gewünscht
    if with_dye_uptake == 1:
        image_uptake = io.imread(image_data_path+'_TR-bgsb100px.tif')
    # Arrays für Zelldaten initialisieren
    cell_pixels = np.zeros([number_of_cells, cell_max_size, 5], dtype = np.float32)
    cell_areas = np.zeros(number_of_cells, dtype='uint16')
    cell_image_indices = np.zeros(number_of_cells, dtype='uint16')
    outside_detection_limit_indices = []
    # Über alle Bildpixel iterieren und für jeden Pixel GP und Transport bestimmen
    for y in tqdm(range(mask.shape[1]), desc ="identify cell pixel coordinates, gp and dye uptake"):
        for x in range(mask.shape[0]):
            if mask[x][y] != 0:
                cell_index = mask[x][y]-1
                cell_image_indices[cell_index] = mask[x][y]
                if not cell_index in outside_detection_limit_indices:
                    cell_pixels[cell_index][cell_areas[cell_index]][0] = x

```

```

cell_pixels[cell_index][cell_areas[cell_index]][1] = y
if image_440[x,y] != image_490[x,y]:
    cell_pixels[cell_index][cell_areas[cell_index]][2] = ((float(image_440[x,y])-
        float(image_490[x,y])) / (float(image_440[x,y])+float(image_490[x,y])))
if with_dye_uptake == 1:
    cell_pixels[cell_index][cell_areas[cell_index]][3] = image_uptake[x,y]
cell_areas[cell_index] = cell_areas[cell_index] + 1
if cell_areas[cell_index] >= cell_max_size:
    outside_detection_limit_indices.append(cell_index)
# Zu große und zu kleine Zellen löschen
for i in tqdm(range(number_of_cells), desc="delete to small detections"):
    if cell_areas[i] < cell_min_size:
        outside_detection_limit_indices.append(i)
cell_pixels = np.delete(cell_pixels, outside_detection_limit_indices, axis=0)
cell_areas = np.delete(cell_areas, outside_detection_limit_indices, axis=0)
cell_image_indices = np.delete(cell_image_indices, outside_detection_limit_indices, axis=0)
number_of_cells = len(cell_pixels[:])
# Zellmittelpunkte, GP-Mittelwerte und mittlere Transportintensität berechnen
cell_centroids_x = np.zeros(number_of_cells)
cell_centroids_y = np.zeros(number_of_cells)
cell_mean_gp = np.zeros(number_of_cells)
cell_mean_dye_uptake = np.zeros(number_of_cells)
for i in tqdm(range(number_of_cells), desc="calculate cell centroids, mean gp and mean dye
    uptake"):
    x_sum = 0
    y_sum = 0
    gp_sum = 0
    dye_uptake_sum = 0
    for j in range(cell_areas[i]):
        x_sum = x_sum + cell_pixels[i][j][0]
        y_sum = y_sum + cell_pixels[i][j][1]
        gp_sum = gp_sum + cell_pixels[i][j][2]
        dye_uptake_sum = dye_uptake_sum + cell_pixels[i][j][3]
    cell_centroids_x[i] = x_sum / cell_areas[i]
    cell_centroids_y[i] = y_sum / cell_areas[i]
    cell_mean_gp[i] = gp_sum / cell_areas[i]
    cell_mean_dye_uptake[i] = dye_uptake_sum / cell_areas[i]
#Mittelwerte speichern
np.savetxt((mean_data_path+sample+"_cell_mean_values.txt"),np.transpose([cell_image_indices,
    cell_centroids_x, cell_centroids_y, cell_areas, cell_mean_gp, cell_mean_dye_uptake]),
    header="Image_index X[px] Y[px] Area[px^2] Mean_GP Uptake_intensity", comments="")
#Für jeden Pixel die Distanz zum Zellzentrum berechnen
for i in tqdm(range(number_of_cells), desc="calculate pixel distances to centroids"):
    for j in range(cell_areas[i]):
        # hier könnte man die Auflösung noch höher drehen: einfach *10 und dann Einheit als
        zehntel px
        cell_pixels[i][j][4] = int(np.sqrt((cell_pixels[i][j][0]-cell_centroids_x[i])**2+(cell_pixels[i][j][1]-
            cell_centroids_y[i])**2))
#Pixeldaten speichern
np.save(pixel_data_path+sample+"_pixel_data", cell_pixels)
#Bild berechnen, in dem jeder Pixelwert dem Abstand vom Zellzentrum entspricht
centroid_mask = np.zeros_like((mask), dtype=np.uint8)

```

```

for i in tqdm(range(number_of_cells), desc="create mask with centroids"):
    for j in range(cell_areas[i]):
        x = int(cell_pixels[i][j][0])
        y = int(cell_pixels[i][j][1])
        centroid_mask[x, y] = cell_pixels[i][j][4]
    centroid_x = int(cell_centroids_x[i])
    centroid_y = int(cell_centroids_y[i])
    centroid_mask[centroid_x, centroid_y] = 255
    centroid_mask[centroid_x+1, centroid_y] = 255
    centroid_mask[centroid_x-1, centroid_y] = 255
    centroid_mask[centroid_x, centroid_y+1] = 255
    centroid_mask[centroid_x, centroid_y-1] = 255
#Bild speichern, in dem jeder Pixelwert dem Abstand vom Zellzentrum entspricht
cv.imwrite(centroid_masks_path + sample + '_centroid_mask.tif', centroid_mask)
#Radiale GP-Auswertung
distance_mean_gp = np.zeros(255)
pixel_sum = np.zeros(255)
for i in tqdm(range(number_of_cells), desc="calculate mean_gp vs distance to centroid"):
    for j in range(cell_areas[i]):
        distance = int(cell_pixels[i][j][4])
        distance_mean_gp[distance] = distance_mean_gp[distance] + cell_pixels[i][j][2]
        pixel_sum[distance] = pixel_sum[distance] + 1
for i in range(255):
    if pixel_sum[i] != 0:
        distance_mean_gp[i] = distance_mean_gp[i] / pixel_sum[i]
#Speichern der radialen GP-Auswertung
np.savetxt((mean_data_path+sample+"_distance_mean_gp.txt"),np.transpose([range(255),
    pixel_sum, distance_mean_gp]), header="Distance[px] Number_of_pixels
    Mean_GP", comments="")

#Nächste Nachbarn berechnen, falls gewünscht
if calculate_neighbours == 1:
    mean_data = np.transpose(np.loadtxt(mean_data_path+sample+"_cell_mean_values.txt",
        skiprows=1))
    cell_centroids_x = mean_data[1]
    cell_centroids_y = mean_data[2]
    number_of_cells = len(cell_centroids_x)
    data = np.zeros([7, number_of_cells])
    data[:,0:6] = mean_data[:,0:6]
#Distanz jeder Zelle zu allen anderen Zellen berechnen und auf Schwellwert überprüfen
for i in tqdm(range(number_of_cells-1), desc="calculate nearest_neighbours"):
    cell_a = (cell_centroids_x[i],cell_centroids_y[i])
    for j in range(i+1,number_of_cells):
        cell_b = (cell_centroids_x[j],cell_centroids_y[j])
        if(math.dist(cell_a, cell_b) < nearest_neighbours_thres):
            data[6][i] += 1
            data[6][j] += 1
np.savetxt((mean_data_path+sample+"_cell_mean_values.txt"),np.transpose(data), header =
    "Image_index X[px] Y[px] Area[px^2] Mean_GP Uptake_intensity
    nearest_neighbours", comments="")

#Farbbild aller analysierten Kanäle mit Segmentierungsrand erzeugen

```

```

if create_color_picture_with_outlines == 1:
    dat = np.load(mask_data_path+'_seg.npy', allow_pickle=True).item()
    outlines = dat['outlines']
    mean_data = np.transpose(np.loadtxt(mean_data_path+sample+"_cell_mean_values.txt",
                                       dtype='uint16', skiprows=1))
    cell_indices = mean_data[0]
    image_440 = io.imread(image_data_path+'_440-bgsb-constvalue.tif')
    image_440_8bit = image_440 - image_440.min()
    image_440_8bit = image_440_8bit / image_440_8bit.max() * 255
    image_440_8bit = np.uint8(image_440_8bit)
    image_490 = io.imread(image_data_path+'_490-bgsb-constvalue.tif')
    image_490_8bit = image_490 - image_490.min()
    image_490_8bit = image_490_8bit / image_490_8bit.max() * 255
    image_490_8bit = np.uint8(image_490_8bit)
    if with_dye_uptake == 1:
        image_uptake = io.imread(image_data_path+'_TR-bgsb100px.tif')
        image_uptake_8bit = image_uptake - image_uptake.min()
        image_uptake_8bit = image_uptake_8bit / image_uptake_8bit.max() * 255
        image_uptake_8bit = np.uint8(image_uptake_8bit)
    rgb = np.zeros([image_440.shape[0], image_440.shape[1], 3], dtype=np.uint8)
    for y in tqdm(range(rgb.shape[1]), desc="create color image"):
        for x in range(rgb.shape[0]):
            rgb[x][y][0] = image_440_8bit[x][y]
            rgb[x][y][1] = image_490_8bit[x][y]
            if with_dye_uptake == 1:
                rgb[x][y][2] = image_uptake_8bit[x][y]
    for y in tqdm(range(rgb.shape[1]), desc="draw outlines in colorimage"):
        for x in range(rgb.shape[0]):
            if outlines[x][y] != 0:
                cell_index = outlines[x][y]-1
                if cell_index in cell_indices:
                    rgb[x][y][1] = 255
                    rgb[x][y][2] = 255
    cv.imwrite(mask_data_path+'_color_with_outlines.jpg', rgb)

```

# Zahl nächster Nachbarn in jeder Zelle auf vorher erzeugtem Farbbild notieren

```

if draw_number_of_neighbours_in_color_picture == 1:
    font = ImageFont.truetype("arial.ttf", 25)
    mean_data = np.transpose(np.loadtxt(mean_data_path+sample+"_cell_mean_values.txt",
                                       dtype='uint16', skiprows=1))
    cell_centroids_x = mean_data[1]
    cell_centroids_y = mean_data[2]
    number_of_neighbours = mean_data[6]
    number_of_cells = len(cell_centroids_x)
    img = Image.open(mask_data_path+"_color_with_outlines.jpg")
    draw = ImageDraw.Draw(img)
    for i in range(number_of_cells):
        draw.text((cell_centroids_y[i]-5, cell_centroids_x[i]-15), str(number_of_neighbours[i]),
                font=font, fill=(255,255,255,255))
    img.save(mask_data_path+"_nn_trsh-"+ str(nearest_neighbours_thres)
            +"px_color_with_outlines.jpg")

```

```
#Innere Zellmembran vs. äußere Zellmembran GP-Analyse
```

```
if calculate_inner_outer_mean_gp == 1:  
    dat = np.load(mask_data_path + '_seg.npy', allow_pickle=True).item()  
    mask = dat['masks']  
    cell_pixels = np.load(pixel_data_path+sample+"_pixel_data.npy")  
    number_of_cells = len(cell_pixels[:])  
    mean_data = np.transpose(np.loadtxt(mean_data_path+sample+"_cell_mean_values.txt",  
                                     dtype='uint16', skiprows=1))  
    cell_centroids_x = mean_data[1]  
    cell_centroids_y = mean_data[2]  
    cell_areas = mean_data[3]  
    cell_mean_inner_gp = np.zeros(number_of_cells)  
    cell_mean_outer_gp = np.zeros(number_of_cells)  
    inner_outer_mask = np.zeros_like(mask)  
    for i in tqdm(range(number_of_cells), desc="calculate inner and outer mean gp"):  
        inner_gp_sum = 0  
        outer_gp_sum = 0  
        inner_area = 0  
        outer__area = 0  
        centroid_x = int(cell_centroids_x[i])  
        centroid_y = int(cell_centroids_y[i])  
        for j in range(cell_areas[i]):  
            x = int(cell_pixels[i][j][0])  
            y = int(cell_pixels[i][j][1])  
            if cell_pixels[i][j][4] < distance_from_centroid_trsh:  
                inner_gp_sum = inner_gp_sum + cell_pixels[i][j][2]  
                inner_area = inner_area + 1  
                inner_outer_mask[x,y] = 127  
            else:  
                outer_gp_sum = outer_gp_sum + cell_pixels[i][j][2]  
                outer__area = outer__area + 1  
                inner_outer_mask[x,y] = 255  
        inner_outer_mask[centroid_x, centroid_y] = 255  
        inner_outer_mask[centroid_x+1, centroid_y] = 255  
        inner_outer_mask[centroid_x-1, centroid_y] = 255  
        inner_outer_mask[centroid_x, centroid_y+1] = 255  
        inner_outer_mask[centroid_x, centroid_y-1] = 255  
        cell_mean_inner_gp[i] = inner_gp_sum / inner_area  
        if outer__area == 0:  
            cell_mean_outer_gp[i] = np.nan  
        else:  
            cell_mean_outer_gp[i] = outer_gp_sum / outer__area  
    cv.imwrite(centroid_masks_path + sample + '_distance_threshold_mask.tif', inner_outer_mask)  
    np.savetxt((mean_data_path+sample+"_inner_and_outer_mean_gp.txt"), np.transpose(  
        [cell_mean_inner_gp, cell_mean_outer_gp]), header="Inner_GP Outer_GP",  
        comments="")
```

```
# I(GP) und GP-Histogramme plotten
```

```
if plot_data == 1:  
    mean_data = np.transpose(np.loadtxt(mean_data_path+sample+"_cell_mean_values.txt",  
                                     skiprows=1))  
    number_of_cells = len(mean_data[4])
```

```

data = np.zeros(number_of_cells, dtype = np.dtype([('gp', float), ('intensity', float)]))
data['gp'] = mean_data[4]
data['intensity'] = mean_data[5]
data = np.sort(data, axis = 0, order = 'gp')
number_of_data_points = int(np.sqrt(number_of_cells))
mean_GP_data = np.zeros(number_of_data_points)
mean_intensity_data = np.zeros(number_of_data_points)
for i in range(0, number_of_data_points):
    for j in range(0, number_of_data_points):
        mean_GP_data[i] = mean_GP_data[i] + data['gp'][i*number_of_data_points+j]
        mean_intensity_data[i] = mean_intensity_data[i] +
            data ['intensity'][i*number_of_data_points+j]
    mean_GP_data[i] = mean_GP_data[i] / number_of_data_points
    mean_intensity_data[i] = mean_intensity_data[i] / number_of_data_points
hist, bin_edges = np.histogram(data['gp'], bins = int((hist_range[1]-hist_range[0])/0.01),
                               range=hist_range)
bin_centers = np.zeros([len(bin_edges)-1])
for i in range(len(bin_centers)):
    bin_centers[i] = bin_edges[i] + (bin_edges[i+1]-bin_edges[i])/2
plt.plot(bin_centers, hist, 'bo-')
plt.twinx()
plt.plot(mean_GP_data, mean_intensity_data, 'ro')
plt.show()
np.savetxt((plot_data_path+sample+"_gp_histogram.txt"),np.transpose([bin_centers, hist]),
           header ="Bin_center Counts", comments="")
np.savetxt((plot_data_path+sample+"_reduced_gp_and_dye_uptake.txt"),
           np.transpose([mean_GP_data, mean_intensity_data]), header =
           "Mean_gp Mean_uptake_intensity", comments="")

```

#Mehrere Datensätze reduzieren, falls gewünscht

```

if reduce_datasets == 1:
    reduced_data_path = exp_path+'reduced_data\\'
    image_plot_path = exp_path+'plot_images\\'
    filename = ""
    int_header = ""
    for sample in samples_to_reduce:
        filename = filename + sample + '_'
        int_header = int_header + sample + '_GP ' + sample + '_intensity '
    int_header = int_header + 'reduced_GP ' + 'reduced_intensity'
    gp_header = ""
    for sample in samples_to_reduce:
        gp_header = gp_header + sample + '_GP ' + sample + '_counts '
    gp_header = gp_header + 'reduced_GP ' + 'reduced_counts'
    gp_dataset = []
    uptake_dataset = []
    mean_experiment = []
    number_of_cells_in_experiment = []
    number_of_experiments = len(samples_to_reduce)
    total_mean = 0
    total_number_of_cells = 0
    for i in range(number_of_experiments):

```

```

gp_dataset.append(np.transpose(np.loadtxt(mean_data_path+samples_to_reduce[i]+
    "_cell_mean_values.txt", skiprows=1))[4])
uptake_dataset.append(np.transpose(np.loadtxt(mean_data_path+samples_to_reduce[i]+
    "_cell_mean_values.txt", skiprows=1))[5])
#Aus jedem einzelnen Datensatz sollen gleich viele Zellen in die gesamte Auswertung eingehen
#Finde also das Experiment mit der kleinsten Zellzahl
min_cell_number = 65536
for i in range(number_of_experiments):
    if len(gp_dataset[i]) < min_cell_number:
        min_cell_number = len(gp_dataset[i])
#Sowohl Datensätze einzeln mit calculate_gp_histogram und reduce_gp_int_data auswerten als
#auch alle zusammen
all_GP = []
all_uptake = []
for i in range(number_of_experiments):
    all_GP = np.concatenate((all_GP, gp_dataset[i][0:min_cell_number]))
    all_uptake = np.concatenate((all_uptake, uptake_dataset[i][0:min_cell_number]))
int_result = np.zeros([number_of_experiments*2+4,
    int(np.sqrt(min_cell_number*number_of_experiments))])
gp_result = np.zeros([number_of_experiments*2+2, 200])
for i in range(number_of_experiments):
    x_data = reduce_gp_int_data(gp_dataset[i][0:min_cell_number],
        uptake_dataset[i][0:min_cell_number])['gp']
    y_data = reduce_gp_int_data(gp_dataset[i][0:min_cell_number],
        uptake_dataset[i][0:min_cell_number])['intensity']
    plt.plot(x_data, y_data, 'o', mfc='none', label=samples_to_reduce[i])
    int_result[i*2][0:int(np.sqrt(min_cell_number))] = x_data
    int_result[i*2+1][0:int(np.sqrt(min_cell_number))] = y_data
    gp_result[i*2] = calculate_gp_histogram(gp_dataset[i][0:min_cell_number])[0]
    gp_result[i*2+1] = calculate_gp_histogram(gp_dataset[i][0:min_cell_number])[1]
gp_result[number_of_experiments*2+2-2] = calculate_gp_histogram(all_GP)[0]
gp_result[number_of_experiments*2+2-1] = calculate_gp_histogram(all_GP)[1]
x_data = reduce_gp_int_data(all_GP, all_uptake)['gp']
y_data = reduce_gp_int_data(all_GP, all_uptake)['intensity']
y_stdev = reduce_gp_int_data(all_GP, all_uptake)['stdev']
y_se = reduce_gp_int_data(all_GP, all_uptake)['se']
int_result[number_of_experiments*2+4-4] = x_data
int_result[number_of_experiments*2+4-3] = y_data
int_result[number_of_experiments*2+4-2] = y_stdev
int_result[number_of_experiments*2+4-1] = y_se
plt.plot(x_data, y_data, 'k-', label='reduced')
plt.fill_between(x_data, y_data - y_stdev, y_data + y_stdev, color='gray', alpha=0.2)
plt.fill_between(x_data, y_data - y_se, y_data + y_se, color='gray', alpha=0.4)
plt.legend()
plt.xlabel('GP')
plt.ylabel('Uptake intensity [a.u]')
plt.title('Dye uptake')
plt.grid()
if save_plots == 1:
    plt.savefig(image_plot_path+filename+"_uptake.png")
plt.show()
for i in range(number_of_experiments):

```

```

plt.plot(gp_result[i*2], gp_result[i*2+1], 'o', mfc='none', label=samples_to_reduce[i])
plt.plot(gp_result[number_of_experiments*2+2-2], gp_result[number_of_experiments*2+2-1]/3,
         'k-', label='reduced')
plt.xlim(hist_range[0], hist_range[1]);
plt.legend()
plt.xlabel('GP')
plt.ylabel('Counts')
plt.title('GP-Histogram')
plt.grid()
if save_plots == 1:
    plt.savefig(image_plot_path+filename+"_histogram.png")
plt.show()
np.savetxt((reduced_data_path+"reduced_intensity_"+filename+".txt"),np.transpose(int_result),
           header = int_header, comments="")
np.savetxt((reduced_data_path+"reduced_gp_"+filename+".txt"),np.transpose(gp_result),
           header = gp_header, comments="")

```

## 7.4. Python-Skript zur Zellverfolgung und zur thermodynamischen Analyse

```
#Benötigte Pakete einbinden
import numpy as np
import math

# Name des Ordners angeben, in welchem die mean_data Datei liegt, welcher mithilfe des
  Zellsegmentierungsskripts erstellt wurde
path = "C:\\Users\\...\\mean_data\\"
# Anzahl der Bilder, die verglichen werden sollen
bilder = 18
# Distanz innerhalb derer zwei Zellen als zusammengehörig definiert werden
threshold = 20
# Die jeweiligen Temperaturen, bei denen die Bilder aufgenommen wurden
temperaturpunkte = [44.6, 43.3, 41.4, 39, 36.5, 34, 31.5, 28.9, 26.5, 24.1, 21.9, 19.7, 17.6, 15.7, 14,
                    12.4, 11, 9.7]
# GP-Wert um UV-Belichtung korrigieren, 1 = Ja, 0 = Nein
use_bleaching_kor = 1
# UV-induzierte GP-Änderung pro Bild: 0.00355
bleaching_kor_probild = 0.00355
# Schmelztemperaturen mit Zweizustandsmodell berechnen, 1 = Ja, 0 = Nein
thermodynamische_betrachtung = 1
# Bilder-allowed_trace_cutoff = Zahl der Bilder, über die eine Zelle nachverfolgt werden muss, um in
  der thermodynamischen Auswertung berücksichtigt zu werden
allowed_trace_cutoff = 1
# Arrays für Zellinformationen initialisieren
cell_centroids_x = []
cell_centroids_y = []
cell_gp = []
steigungen = []
offsets = []
uptake = []
deltagp = []
# über alle Bilder iterieren
for i in range(bilder):
    # Daten aus mean_values Datei laden
    mean_data = np.transpose(np.loadtxt(path+"Image1_"+str.zfill(str(i+1),5)+
                                      "_cell_mean_values.txt", skiprows=1))

    # Zellpositionen extrahieren
    cell_centroids_x.append(mean_data[1])
    cell_centroids_y.append(mean_data[2])
    # Zell-GP-Werte extrahieren
    cell_gp.append(mean_data[4])
# Arrays für Suchalgorithmus initialisieren
# 2D-array für GP-Werte, Zeilen: Anzahl der Zellen x Spalten: Temperaturpunkte
gpparray = np.zeros((len(cell_centroids_x[0])+1,bilder))
zulöschend = []
gelöschte_zellen=0
getracte_zellen=len(cell_centroids_x[0])
#Erste Spalte von gpparray mit Temperaturen befüllen
for i in range(bilder):
    gpparray[0][i]=temperaturpunkte[i]
#Erste Zeile von gpparray mit GP-Werten bei erstem Temperaturpunkt füllen
```

```

for i in range(len(cell_centroids_x[0])):
    gpparray[i+1][0]=cell_gp[0][i]
#Über alle Zellen i des ersten Bilds iterieren
for i in range(len(cell_centroids_x[0])):
    #Die Position von Zelle i wird nachfolgend mit den Positionen aller Zellen in den folgenden Bildern
    #verglichen
    source=i
    #Variable, um hierher zurückzukommen, wenn keine passende Zellposition gefunden wird
    schleife_verlassen = 0
    #Über alle nachfolgende Bilder iterieren
    for j in range(bilder-1):
        #Variable, um Schleife zu verlassen, wenn keine passende Zelle gefunden wird
        zellegefunden=0
        #Schleife zu verlassen, wenn keine passende Zelle gefunden wurde
        if schleife_verlassen:
            break
        #Über alle Zellen k in Bild j iterieren:
        for k in range(len(cell_centroids_x[j+1])):
            # Wenn Zelle k nicht weiter als der anfangs definierte Schwellwert von Zell i entfernt ist,
            # werden die Zellen als zusammengehörig klassifiziert
            if (abs(cell_centroids_x[j][source]-cell_centroids_x[j+1][k])+abs(cell_centroids_y[j][source]-
            cell_centroids_y[j+1][k])<threshold):
                # Wenn die Korrektur zur UV-induzierten GP-Änderung angewendet werden, soll...
                if use_bleaching_kor==1:
                    # k ist die neue Zelle mit der die Zellen auf den nächsten Bildern verglichen wird
                    source=k
                    # GP Wert der gefundenen Zelle mit UV-GP-Änderung korrigieren und in gpparray
                    # speichern
                    gpparray[i+1][j+1] = cell_gp[j+1][source]-bleaching_kor_probild*(j+1)
                    # Abbruchvariable auf nicht abbrechen setzen
                    zellegefunden=1
                    # Bei zusätzlicher Messung des Stofftransports neben GP, auch die Fluoreszenzintensität
                    # von Rhodamin B oder Kieselgel-Nanopartikeln speichern
                    uptake.append(mean_data[5][source])
                    break
                else:
                    # siehe vorherige Kommentare
                    source=k
                    gpparray[i+1][j+1] = cell_gp[j+1][source]
                    zellegefunden=1
                    uptake.append(mean_data[5][source])
                    break
            # Wenn keine passende Zelle gefunden wurde, Schleife verlassen und NaN in gpparray speichern
            if zellegefunden==0:
                gpparray[i+1][j+1] = np.nan
                schleife_verlassen = 1
#Alle Zellen, die nicht oft genug gefunden wurden, als zu löschen markieren
for i in range(len(cell_centroids_x[0])+1):
    for j in range(bilder-allowed_trace_cutoff):
        if math.isnan(gpparray[i][j]):
            zulöschend.append(i)
            gelöschte_zellen += 1

```

```

    gettracte_zellen -= 1
    break
#Alle Zellen, die nicht oft genug gefunden wurden, löschen
gpparray = np.delete(gpparray,zulöschend,0)
temperaturpunkte2 = temperaturpunkte.copy()
temperaturpunkte2.pop()
#Delta_GP berechnen
for i in range(gettracte_zellen):
    gp=gpparray[i+1][0]-gpparray[i+1][1]
    deltagp.append(gp)
#Tempertaurabhängige GP-Steigung ermitteln
for i in range(gettracte_zellen):
    m,b = np.polyfit(temperaturpunkte,gpparray[i+1], 1)
    steigungen.append(m)
    offsets.append(b)
#Tempertaurabhängige GP-Steigung als Funktion der Temperatur ermitteln
fitdata = np.zeros([gettracte_zellen+1,bilder])
for i in range(bilder):
    fitdata[0][i]=temperaturpunkte[i]
    for j in range(gettracte_zellen):
        fitdata[j+1][i] = temperaturpunkte[i]*steigungen[j]+offsets[j]
#GP-Transformation auf Lipidordnung(Gelidität) bzw. Lipidunordnung(Fluidität)
gelidität = np.zeros([gettracte_zellen+1,bilder])
fluidität = np.zeros([gettracte_zellen+1,bilder])
for i in range(gettracte_zellen):
    for j in range(bilder):
        gelidität[i+1][j]=(gpparray[i+1][j]+1)/2
        fluidität[i+1][j]=1-gelidität[i+1][j]
        gelidität[0][j]=temperaturpunkte[j]
        fluidität[0][j]=temperaturpunkte[j]
#Thermodynamische Berechnungen (Zweizustandsmodell)
if thermodynamische_betrachtung==1:
    kelvinpunkte = np.zeros([bilder])
    rtpunkte = np.zeros([bilder])
    gipps = np.zeros([gettracte_zellen,bilder])
    enthalpie = []
    entropie = []
    schmelztemperatur = np.zeros([gettracte_zellen,2])
#x-Achsen-Transformation
for i in range(bilder):
    kelvinpunkte[i] = temperaturpunkte[i]+273.2
    rtpunkte[i] = 1/(kelvinpunkte[i]*8.3)
#Enthalpie-Berechnung
for i in range(gettracte_zellen):
    m,b = np.polyfit(rtpunkte,np.log(fluidität[i+1]/(1-fluidität[i+1])),1)
    enthalpie.append(m)
#Entropie-Berechnung
for i in range(gettracte_zellen):
    m,b = np.polyfit(kelvinpunkte,np.log(fluidität[i+1]/(1-fluidität[i+1]))/rtpunkte,1)
    entropie.append(m)
#Gipps-freie-Energie-Berechnung
for i in range(bilder):

```

```

for j in range(gettracte_zellen):
    gipps[j][i]=enthalpie[j]+entropie[j]*kelvinpunkte[i]
#Schmelztemperatur-Berechnung
for i in range(gettracte_zellen):
    gippssteigung=(gipps[i][0]-gipps[i][1])/(kelvinpunkte[0]-kelvinpunkte[1])
    gippsachsenabschnitt=gipps[i][0]-gippssteigung*kelvinpunkte[0]
    schmelztemperatur[i][0]=-gippsachsenabschnitt/gippssteigung
    schmelztemperatur[i][1]=schmelztemperatur[i][0]-273.2
#Daten speichern
np.savetxt(path+"FitData.txt",np.transpose(fitdata))
np.savetxt(path+"gp-zugeordnet.txt",np.transpose(gparray))
np.savetxt(path+"Steigungen.txt",steigungen)
np.savetxt(path+"Offsets.txt",offsets)
np.savetxt(path+"uptake-zugeordnet.txt",uptake)
np.savetxt(path+"DeltaGP.txt",deltagp)
np.savetxt(path+"Enthalpie.txt",enthalpie)
np.savetxt(path+"Entropie.txt",entropie)
np.savetxt(path+"Gipps.txt",np.transpose(gipps))
np.savetxt(path+"Kelvinpunkte.txt",kelvinpunkte)
np.savetxt(path+"RTPunkte.txt",rtpunkte)
np.savetxt(path+"Schmelztemperatur.txt",schmelztemperatur)
np.savetxt(path+"Gelidität.txt",np.transpose(gelidität))
np.savetxt(path+"Fluidität.txt",np.transpose(fluidität))

```

## 7.5. Publikationen

- Tanvir Hasan, Roberto Gonzales, Conor Ryan, Nicolas Färber, Jeffery Coffey und Anton Naumov, Photo- and electroluminescence from nitrogen-doped and nitrogen--sulfur codoped graphene quantum dots, *Advanced Functional Materials*, Volume 28, Issue 42, 2018, 1804337
- Nicolas Färber und Christoph Westerhausen, Broad lipid phase transitions in mammalian cell membranes measured by Laurdan fluorescence spectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, Volume 1864, Issue 1, Februar 2022, 183794
- Nicolas Färber, Jonas Reitler, Andrej Kamenac und Christoph Westerhausen, Shear stress induced lipid order and permeability changes of giant unilamellar vesicles, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, Volume 1866, Issue 10, Oktober 2022, 130199
- Nicolas Färber, Jonas Reitler, Julian Schäfer und Christoph Westerhausen, Transport across cell membranes is modulated by lipid order, under review
- Nicolas Färber, Jonas Reitler und Christoph Westerhausen, Laurdan phase state analysis reveals membrane melting point distribution across cells, to be published
- Nicolas Färber, Jonas Reitler, Michael Saule und Christoph Westerhausen Membrane phase state dependent silica nanoparticle transport and its influence on lipid order, to be published

## 7.6. Betreute Abschlussarbeiten

- Dominik Walser, Einfluss von Scherkräften auf Permeabilität und Phasenzustand, Masterarbeit, 2021
- Julian Schäfer, Korrelation von Membranordnung und Permeabilität lebender Zellen, Bachelorarbeit, 2021
- Michael Saule, Einfluss von Nanopartikeln auf den Phasenzustand von Lipidmembranen, Masterarbeit, 2022
- Jonas Reitler, Phasenzustandsabhängiger Stofftransport über Lipidmembranen, Masterarbeit, 2022
- Sophie Mauritz, Auswirkungen des Medikaments Tamoxifen auf die Lipidordnung von Zellmembranen, Masterarbeit, 2022
- Anna Nolde, Die Abhängigkeit der zellulären Lipidordnung vom Zellzyklus, Masterarbeit, 2022

## Danksagung

Ich bedanke mich bei

- Prof. Christoph Westerhausen für die Betreuung meiner Promotion, für die Möglichkeit mich in der Gestaltung meiner Forschungsarbeit vollkommen frei zu entfalten und für die gemeinsame Arbeit am Transfer unserer Forschung hin zu einer wirtschaftlichen Nutzung.
- Jonas Reitler dafür, dass er mit mir als Ausgleich zur Arbeit Schach und Tennis gespielt hat, obwohl ich ihn immer habe gewinnen lassen.
- Joshua Winkeljann für sein Engagement im Rahmen der Bewerbung auf Exist-Forschungstransfer und dafür, dass er mir ein toller Schreibtischnachbar war.
- Wolfgang Färber für väterlichen Rat und Korrekturlesungen zahlreicher Arbeiten.
- Sophie Mauritz, weil ich mich nur deshalb voll und ganz der Forschung widmen konnte, weil sie mir in allen anderen Lebensbereichen den Rücken frei gehalten hat.