

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit besteht aus drei Teilen. Im ersten Teil wurden Langmuir-Filme von chiralen *N*-Acylaminosäurederivaten untersucht, im zweiten Bolaamphiphile und im dritten wurden Langmuir-Filme von Phospholipide als biomimetisches System eingesetzt, um einen Beitrag zur Aufklärung der Wirkweise des antibiotischen Peptids Surfactin zu leisten.

Im ersten Teil werden Untersuchungen zur Morphologie von Langmuir-Filmen von *N*-Acylaminosäurederivaten beschrieben, die mit Hilfe der Brewster-Winkel-Mikroskopie erfolgten. Sie knüpften an vorhergehende Arbeiten an, in denen diese Klasse chiraler Amphiphile an der Luft/Wasser-Grenzfläche hinsichtlich ihrer thermodynamischen bzw. Kollektiveigenschaften sowie struktureller Eigenschaften auf der Ebene des einzelnen Moleküls charakterisiert wurde.

Neben dem Ziel, die noch offenen Erklärungslücken, die zwischen diesen verschiedenen Ebenen bestanden, zu schließen und generell mehr in Erfahrung darüber zu bringen, welche Parameter die Filmmorphologie in welcher Weise beeinflussen, standen drei weitere Fragestellungen im Vordergrund:

- Treten die chiralen Diskriminierungseffekte, die durch die Aufnahme von Π/A -Isothermen und IRRAS-Messungen zuvor detektiert wurden, auch auf der Ebene der Domänen in Erscheinung und welche Rolle spielen dabei interamphiphile Wasserstoffbrückenbindungen?
- Kommt es beim Einsatz der racemischen Monoschichten im Verlauf der isothermen Kompression zu dem Phänomen der chiralen Phasenseparation?
- Spiegelt sich die Chiralität der filmkonstituierenden Moleküle in einer entsprechenden 2-dimensional chiralen Gestalt der Domänen wider und können die beobachteten Morphologien mit bestimmten Strukturen der zugrundeliegenden Subzelle bzw. mit konkreten Gitteranordnungen korreliert werden?

Wesentliche Ergebnisse waren:

- Die Morphologien der Langmuir-Filme der enantiomerenreinen und racemischen Form von *N*-Hexadecanoylalanin auf wässriger Subphase unterscheiden sich bei 298 K deutlich voneinander. Während das L-Enantiomer kristalline Plättchen bildet, ist die irregulär-fraktale Gestalt der Domänen des Racemats durch einen DLA-Mechanismus zu erklären. Es konnten keine Hinweise auf eine chirale Phasenseparation gewonnen werden. Bei erhöhten Temperaturen (303 K) kommt auch beim L-Enantiomer ein dendritisches Wachstumsmuster zum Vorschein, das zu explizit chiralen Domänenformen führt, in denen sich die Chiralität der filmkonstituierenden Moleküle widerspiegelt. Die Gestalt der Domänen kann auf der Grundlage einer schiefwinkligen

Subzelle abgeleitet werden. Sie ist bestimmt durch das Wirksamwerden gerichteter attraktiver Kräfte, wofür H-Brücken verantwortlich gemacht werden.

- Auf zinkionenhaltiger Subphase vollzieht sich beim L-Enantiomer von *N*-Hexadecanoylalanin während des Kondensationsvorgangs eine bemerkenswerte Metamorphose: Anfangs dominierten torusartigen Domänen, die sich bei fortschreitendem Wachstum in stark gewundene, S-förmige Domänen umwandeln, bis sie schließlich eine seeperdchenähnliche Gestalt annehmen. Dabei handelt es sich ebenfalls um 2-dimensional chirale Strukturen; entsprechend spiegelbildliche Domänenformen wurden nicht beobachtet, so daß eine Entsprechung von molekularer Chiralität und der Form der kondensierten Vielteilchenaggregate vorliegt. Ihre Entstehung läßt sich im Rahmen eines elektrostatischen Wachstumsmodell verstehen.
- *N*-Hexadecanoylalaninmethylester bildet in enantiomerenreiner Form auf wäßriger Subphase drei verschiedene dendritische Muster, wobei zwei davon auf dieselbe zugrundeliegende schiefwinklige Subzelle zurückgeführt werden können. Das Auftreten verschiedener Gittertypen, die sich auf den Winkel und die Zahl der Dendriten auswirken, kann durch lokal unterschiedlich hohe Wachstumsraten der Domänen erklärt werden. Das Racemat bildet hingegen sehr regelmäßige, symmetrische Dendritenmuster mit einer auffallend niedrigen Verzweigungsdichte. Anzeichen einer chiralen Phasenseparation liegen auch hier nicht vor.
- Auf wäßriger Subphase bildet das L-Enantiomer von *N*-Octadecanoylvalin ebenfalls dendritische Domänen. Sie liegen einem schiefwinkligen Gitter zugrunde; ihre äußere Gestalt ist jedoch nicht explizit chiral. Bemerkenswert ist, daß die Domänenbildung vollständig reversibel ist und daß sie sich in einem Kompressionszustand vollzieht, der anhand der Π/A -Isotherme eigentlich als LE-Phase identifiziert wurde. Beim Racemat sind im BAM erst kurz vor dem Kollapsunkt kondensierte Strukturen auszumachen, die teilweise eine gebogene Gestalt aufweisen. Jedoch lagen auch hier keine eindeutigen Indizien für einen chiralen Symmetriebruch vor.

Im zweiten Teil wurde eine weitere Klasse chiraler Amphiphile behandelt, nämlich Methyl-dihydroxyoctadecanoate, die den Bolaamphiphilen zuzurechnen sind. Bolaamphiphile sind dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich zur polaren Kopfgruppe eine zweite polare Gruppierung entlang der hydrophoben Alkylkette tragen; im vorliegenden Fall handelte es sich um eine vicinale Diolgruppierung, deren Position entlang der hydrophoben Alkylkette variierte. Durch die OH-Gruppen sind, wie bei den *N*-Acylaminosäurederivaten, Möglichkeiten zur Ausbildung von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen gegeben, deren Rolle für chirale Diskriminierungseffekte in 2-dimensionalen Systemen mit Hilfe der IRRA-Spektroskopie studiert wurden. Im Unterschied zu den Aminosäurederivaten ist das stereogene Zentrum jedoch nicht notwendigerweise in der Kopfgruppe lokalisiert, die in die Subphase taucht. Ferner sollte untersucht werden, welchen Einfluß die Einführung eines zweiten polaren Restes auf das Grenzflächenverhalten dieser Amphiphile hat und welche

Konsequenzen mit der Variation der Position dieses Restes verbunden sind. Die zentralen Erkenntnisse können wie folgt zusammengefaßt werden:

- Beim Methyl-17,18-dihydroxyoctadecanoat (das nur ein stereogenes Zentrum besitzt) treten, obwohl die Π/A -Isothermen von Racemat und reinem Enantiomer identisch verlaufen, auf struktureller Ebene, den Grad der konformativen Ordnung betreffend, deutliche chirale Diskriminierungseffekte zutage. Es findet während der isothermen Kompression ein Wechsel von hetero- zu homochiraler Diskriminierung statt. Bezüglich der Orientierung wurde erkannt, daß zu Beginn der Kompression beide polaren Kopfgruppen in die Subphase tauchen, sich dann aber die *vic*-OH-Gruppe aus dem Wasser hebt („Flipprozeß“) und sich daraufhin ein Aggregationsprozeß der Amphiphile untereinander vollzieht, der beim Enantiomer sprunghaft und beim Racemat eher schleppend geschieht. Mit dem Assoziationsprozeß geht ein „squeeze-out-Vorgang“ und ein Konfigurationswechsel der Estergruppierung von *E* nach *Z* einher.
- Methyl-*syn*-9,10-dihydroxyoctadecanoat, eines der beiden untersuchten Diastereomere dieses Regioisomers, zeigte ein gänzlich anderes Verhalten. Vermutlich verbleiben beide polare Gruppen den gesamten Kompressionsvorgang über in die wäßrige Phase getaucht. Diese Orientierung könnte erklären, warum das gemessene Signal-Rausch-Verhältnis bei den IRRAS-Untersuchungen so klein war. Unterschiede zwischen dem enantiomerenreinen und racemischen Film konnten nicht evaluiert werden.
- Im Unterschied zum *syn*-Diastereomer muß beim entsprechenden Methyl-*anti*-9,10-dihydroxyoctadecanoat davon ausgegangen werden, daß sich im Verlauf der Kompression die vicinale Diolgruppierung aus dem Wasser hebt. Sowohl das Enantiomer als auch das Racemat zeigen in einem sehr begrenzten Kompressionsintervall eine sprunghafte Zunahme der konformativen Ordnung und eine drastische Signalintensitätssteigerung der Banden im *Reflexions-Absorptions*-Spektrum. Differenzen zwischen dem Enantiomer und Racemat ergaben sich hinsichtlich der konkreten Sprungstelle (Flächenwert pro Molekül) und Sprungtiefe/-höhe. Der Vergleich mit dem *syn*-Diastereomer macht deutlich: Durch die Konfigurationsumkehr an nur einem der beiden stereogenen Zentren kann ein komplett anderes Grenzflächenverhalten dieser Amphiphile bewirkt werden. Ferner konnte durch Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen eine auffallende Analogie zum temperaturabhängigen Verhalten von *N*-Acylaminosäurederivaten festgestellt werden.
- Die Struktur des Methyl-2,3-dihydroxyoctadecanoats (vermessen wurde nur das *syn*-Diastereomer) entspricht aufgrund der direkt benachbarten polaren Gruppen der eines gewöhnlichen Amphiphils mit einer einzigen vergrößerten Kopfgruppe. Erwartungsgemäß spiegelte sich dies auch bei den IRRAS-spektroskopischen Messungen wider, die eine typische Entwicklung des Grads der konformativen Ordnung während der Kompression anzeigten. Im Gegensatz zu allen anderen vermessenen Methyl-dihydroxyoctadecanoat-Isomeren fiel hier eine nahezu perfekte

Korrelation mit den thermodynamischen Merkmalen auf. Übereinstimmend konnte mit beiden Meßmethoden eine leichte Tendenz zur homochiralen Diskriminierung festgestellt werden.

Der dritte und letzte Teil handelt von einem Versuch, Langmuir-Filme als biomimetisches System einzusetzen. Konkret wurden Monoschichten von verschiedenen Phospholipiden als Modellmembrane dafür genutzt, einen Beitrag zur Aufklärung der Wirkweise des antibiotischen Lipopeptids Surfactin zu leisten, das in der Lage ist, Zellmembranen von Bakterien aufzulösen. Dazu wurden zum einem gemischte Phospholipid/Surfactin-Monoschichten mit Hilfe der Langmuir-Filmwaage („Mischisothermen“) und IRRA-Spektroskopie untersucht. Zum anderen wurde ein Angriff von Surfactin-Molekülen auf Zellmembranen dadurch nachgeahmt, daß Surfactin-Lösungen in die Subphase von Phospholipid-Monoschichten injiziert und die strukturellen Veränderungen sowie die ihres Organisationsgrades IR-spektroskopisch beobachtet wurden (Permeabilisierungsversuche). Die Kurzfassung der gewonnenen Einsichten liest sich folgendermaßen:

- Die „Mischisothermen“ ergaben für das binäre Gemisch DPPC/Surfactin eine unvollständige Mischbarkeit, die um so ausgeprägter war, je gleichanteiliger die Mischung zusammengesetzt und je niedriger der Oberflächendruck war.
- Die IRRAS-Messungen der DPPC/Surfactin Mischmonolagen zeigen an, daß bereits kleine Surfactin-Anteile einen ausgeprägt ordnenden Effekt auf die konformative Ordnung der DPPC-Alkylketten haben.
- Die Injektion von Surfactin in die Subphase von expandierten DPPC-Filmen führt zu einem stark ordnenden Effekt.
- DPPS-Filme im expandierten Zustand wurden von anwesendem Surfactin in der Subphase hinsichtlich ihres Ordnungsgrads nicht beeinflusst. Bei komprimierten DPPS-Filmen, konnte hingegen ein ordnungsinduzierender Effekt durch IRRA-spektroskopische Messungen nachgewiesen werden.
- Analysen der Mischbarkeit des binären DPPG/Surfactin-Gemischs förderten eine unvollständige Mischbarkeit zutage. Diese Tendenz zur Phasenseparation war bei Surfactin-Molanteilen von $X_s = 0,25$ und $0,75$ am stärksten.
- Eine Injektion von Surfactin unter die Monoschicht eines expandierten DPPG-Films führte instantan zu einer bemerkenswerten Zunahme des *trans/gauche*-Verhältnisses der Konformationen der Methylensegmente der Alkylketten.
- Im Unterschied zu allen anderen vermessenen Phospholipiden vermag Surfactin in der Subphase von POPC-Filmen die konformative Ordnung der Alkylketten, zumindest zeitweilig, zu stören. Nachdem Surfactin in die Monoschicht inkorporiert wurde, kommt es anscheinend zu einer Reorganisation der dann gemischten Monoschicht, so daß schließlich ein ähnliches Maß konformativer Ordnung erreicht wird, wie vor dem Zeitpunkt der Surfactin-Injektion.

- Ein denkbarer Mechanismus der Permeabilisierung von Membranen durch Surfactin ist, daß es lokal dichtere Lipid- oder gemischte Lipid/Surfactin-Domänen induziert und so in der nächsten Umgebung lokal ausgedünnte Bereiche entstehen, die eine weitere Aufnahme von Surfactin begünstigen, bis schließlich die Konzentration so groß ist, daß eine Bicellisierung oder Micellisierung eintritt.

6. Summary

This work comprises three parts: In part one Langmuir films of *N*-acyl amino acid derivatives were under investigation, part two focuses upon bolaamphiphiles at the air/water interface, and part three deals with the influence of the antibiotic peptid surfactin on phospholipid monolayers.

In the first part investigations on the morphology of Langmuir films of *N*-acyl amino acid derivatives are described, which were studied with the help of Brewster angle microscopy. This class of chiral amphiphiles had been characterized in a previous work at the air/water interface regarding their thermodynamic and/or collective properties as well as structural features on the level of the individual molecule. One aim was to engraft another piece into the remaining puzzles and to get a deeper insight into the driving forces of morphology determining parameters. An additional objective was to answer the following questions:

- Do chiral discrimination effects, which were detected by means of Π/A -isotherms and IRRA spectroscopy, occur on the level of the domains, too, and which role do H-bridges play?
- Does a chiral phase separation process take place during the compression of racemic monolayers?
- Do chiral domains appear and do they reflect the corresponding chirality of the film constituting molecules, and is it possible to correlate the observed morphologies with certain structures of the underlying subcell?

The results can be summarized as follows:

- The morphologies of the enantiomeric and racemic films of *N*-hexadecanoyl alanine on an aqueous subphase at 298 K differ substantially from each other. While the enantiomer forms crystal platelets, the irregular fractal-like shape of the domains of the racemic mixture can be explained by a DLA growth mechanism. There were no hints pointing to a chiral phase separation process. At increased temperature (303 K) the enantiomer shows a dendritic growth pattern, which leads to explicitly chiral domain shapes, which correspond with the chirality of the film constituting molecules. The shape of the domains can be derived from an oblique subcell and is determined by directed attractive forces, for which H-bridges can be made responsible.
- The compression of the L-enantiomer of *N*-hexadecanoyl alanine on subphases containing zinc ions is accompanied with a remarkable metamorphosis of the condensed structures: At first torus-like domains dominated, which were converted with progressive growth into strongly wound, S-shaped domains, until finally they

turned into a seahorse-like appearance. The origin of these chiral shapes can be explained on the basis of an electrostatic growth model.

- The enantiomer of *N*-hexadecanoyl alanine methyl ester shows three different dendritic growth patterns. Two of them can be constructed on the basis of a single oblique subcell. The occurrence of different types of unit cells, which influence the angle and numbers of the dendritic arms, can be explained by locally different growth rates of the domains. The condensed structures of the racemic mixture are dendritic too, but in contrast to the enantiomeric compound they are symmetric and have a notably low branching density.
- On aqueous subphase the L-enantiomer of *N*-octadecanoyl valine shows dendritic domains, too. They can also be constructed on the basis of an oblique subcell but the overall outer shape is not explicitly chiral. As a remarkable result, it was found, that the formation of the dendritic domains are fully reversible. Furthermore, the condensation process took place at a compression state, which was formerly, by means of the Π/A -isotherm, identified as a LE phase. As in the other cases no chiral symmetry breaking process could be detected.

In part two investigations on another class of chiral amphiphiles, methyl dihydroxy-octadecanoates are described. They are bipolar amphiphiles (or so-called bolaamphiles) and carry a second polar group along the hydrophobic tail; in this case it is a vicinal diol group, which raise the possibility to form intermolecular H-bridges. It was the aim to study their role concerning chiral discrimination effects with the help of IRRA spectroscopy. Furthermore, the influence of introducing a second polar group on the behavior at the air/water interface and the consequences of varying the position of this polar moiety along the hydrophobic part of the amphiphile was studied. The central conclusions can be summarized as follows:

- Despite their identical behavior regarding the thermodynamic properties (Π/A isotherms) the enantiomeric and racemic mixture of methyl 17,18-dihydroxy-octadecanoate, differences concerning the conformational order of the hydrophobic backbones were detected. During the compression course a change from a slightly heterochiral to a slightly homochiral preference occurred. Concerning the orientation there is evidence that at the beginning of the compression both polar groups dip into the subphase and that the diol group is forced out of the water into the air at intermediate area per molecule values ("flip process"). After this flip process the amphiphiles aggregate into domains. These two consecutive processes take place suddenly in the case of the enantiomeric compound and more smoothly for the racemic mixture. The aggregation is accompanied with a "squeeze-out-effect" and a change from the *E* to the *Z* configuration of the ester group.
- Methyl *syn*-9,10-dihydroxyoctadecanoate, one of the investigated diastereomers of this regioisomer, shows a completely different behavior. It is assumed, that both polar groups remain in the subphase during the whole compression course. This orientation

could explain the low spectroscopic signal-to-noise ratio. No differences between the enantiomeric and racemic film could be evaluated.

- In contrast to the *syn* diastereomer, one has to assume, that the vicinal diol group of the corresponding methyl *anti*-9,10-dihydroxyoctadecanoate is forced out of the air during the compression. Studying both films, the enantiomeric and racemic, a sharp increase in conformational order and a dramatic increase in the band signals were detected at a different but specific area per molecule value. Measurements at different temperatures reveal a conspicuous analogy to the temperature-dependent behavior of *N*-acyl amino acid amphiphiles.
- The structure of the methyl 2,3-dihydroxyoctadecanoate (only the *syn* diastereomer was investigated) is similar to a normal amphiphile because the two different polar groups are close together and at the end of the chain. As expected, the conformational order of the hydrophobic backbones shows a typical development during the compression. In contrast to all other investigated compounds there was an almost perfect correlation to the thermodynamic features. With both methods a slightly homochiral discrimination was detected.

In part three an attempt is described, to use Langmuir films as a model membrane system. To be more precise, phospholipid monolayers were used to study interactions of the antibiotic peptid surfactin with membrane lipids. For this purpose mixed phospholipid/surfactin monolayers were studied with the help of a Langmuir film balance ("mixed isotherms") and with IRRA spectroscopy. Additionally, the membrane burden attack of surfactin was mimicked by injection of a solution of surfactin under phospholipid monolayers into the subphase. The structural changes and the conformational order of the lipid molecules were spectroscopically observed. The main results are as follows:

- Mixed monolayers of surfactin and DPPC were not fully miscible, especially at low surface pressures and at compositions with equal amounts of both components.
- Even small amounts of surfactin in mixed DPPC/surfactin monolayers induced an increasing conformational ordering effect on the alkyl chains of the DPPC molecules.
- The injection of surfactin into the subphase of an expanded DPPC monolayer had the same consequences.
- The injection of surfactin under expanded monolayers of DPPC had no influence on the conformational order of the alkyl chains, but surprisingly this is the case for condensed DPPS monolayers: an increase in the degree of conformational order could be detected.
- The binary DPPG/surfactin mixture showed an uncompleted miscibility. The tendency of phase separation is highest for mol fractions of surfactin of $X_s = 0.25$ and 0.75 .

-
- The injection of surfactin under monolayers of expanded DPPG monolayers leads to a remarkable increase in the *trans/gauche* ratio of the methylen segments of the alkyl chains of the lipid molecules.
 - In contrast to all other investigated lipids the conformational order of POPC decreases when surfactin is injected under this kind of monolayer.
 - A possible mechanism of the membrane permabilization is as follows: surfactin is inducing lipid or mixed lipid/surfactin domains with a higher local density so that in the vicinity of these high-density domains regions with lower density originate, which assist a further incorporation of surfactin molecules into the monolayer. Finally, the local density could be high enough allowing subsequent micellisation.