

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Chemie der Biopolymere

## **Aggregation und Fusion von Milchfettkugeln**

Malte Ahrens

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. U. Kulozik

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. D. Langosch

2. Univ.-Prof. Dr. D. Weuster-Botz

Die Dissertation wurde am 31.10.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 30.01.2008 angenommen.

*Für meine Familie*

*mit*

*Louise, Korbinian und Joseph*

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von 2003 bis 2007 auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Dieter Langosch, Inhaber des Lehrstuhls für Chemie der Biopolymere der Technischen Universität München.

Ich danke Herrn Langosch für die Ausgabe des Projektes, die kritischen Fragen und Anregungen sowie für die mir eingeräumten forscherschen Freiheiten. Herrn Prof. Dr.-Ing. Dirk Weuster-Botz danke ich sehr für die Übernahme des Koreferats und Herrn Prof. Dr.-Ing. Ulrich Kulozik für das förderliche Interesse an der Arbeit und die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Für anregende Diskussionen und wertvolle Tipps danke ich Dr. Markus Gütlich. Einen besondern Dank möchte ich Alexander Tolkach aussprechen, der stets mit regem Interesse am Fortschritt dieser Arbeit teilnahm und mir mit Rat und fachlicher Unterstützung beiseite stand. Danken möchte ich außerdem Frau Dr. Kerstin Schnäbele, die mir die Durchflusscytometrie näher gebracht hat, sowie Herrn Sebastian Karasch für die Bereitstellung der Rahmproben.

Bei meinen Bürokolleginnen Frau Stefanie Unterreitmeier und Frau Jana Herrmann möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die diskussionsreichen Kaffeerunden und das stets angenehme Arbeitsklima bedanken. Herrn Walter Stelzer danke ich für die fachliche und praktische Unterstützung am Massenspektrometer.

Meiner Tante, Frau Heidrun Grauerholz, meiner Mutter und meinem Bruder Hendrik möchte ich sehr für die hilfreiche, geschickte und problemlose Korrekturarbeit des Manuskriptes danken.

Weiterhin gilt mein Dank allen Kollegen und studentischen Mitarbeitern, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen und mich durch tatkräftige Hilfe und anregende Diskussionen unterstützt haben.

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	1
1 Einleitung .....	3
1.1 Das Emulsionssystem Milch .....	3
1.1.1 Instabilität der MFK in Emulsionssystemen .....	4
1.1.1.1 Theoretische Grundlagen zur Instabilität von MFK-Emulsionen .....	4
1.1.1.2 Instabilität von MFK-Emulsionen in der Praxis .....	7
1.2 Zusammensetzung und Struktur der MFKM .....	10
1.2.1 Lipide der MFKM .....	10
1.2.2 Proteine der MFKM .....	12
1.2.3 Molekularer Aufbau der MFKM .....	16
1.2.3.1 Native MFKM .....	16
1.2.3.2 Sekundäre MFKM .....	18
1.3 Methoden zur Messung der Aggregation und Fusion .....	20
1.3.1 Partikelgrößenbestimmung .....	20
1.3.2 Mikroskopie .....	22
1.3.3 Erfassung der Membranaggregation und -fusion mit FRET .....	22
2 Ziel der Arbeit .....	25
3 Material und Methoden .....	26
3.1 Material .....	26
3.1.1 Rohmaterial .....	26
3.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe .....	26
3.1.3 Proteasen .....	26
3.1.4 Geräte .....	26
3.2 Methoden .....	28
3.2.1 Isolierung von MFK aus Rohmilch .....	28
3.2.2 Markierung der MFK mit lipidkonjugierten Fluoreszenzfarbstoffen .....	28
3.2.3 Bestimmung der Fluoreszenz von MFK .....	29
3.2.3.1 Fluoreszenzmikroskopie .....	29
3.2.3.2 Durchflusscytometrie .....	29
3.2.4 Interaktions- und Fusionsassays .....	32
3.2.4.1 Diluting Assay .....	32
3.2.4.2 Mixing Assay .....	32
3.2.4.3 Enzymatischer Verdau der MFKM-Proteine .....	33
3.2.5 Erhitzung und Homogenisierung von Rahmproben .....	34

3.2.6	Analysemethoden.....	35
3.2.6.1	Fettbestimmung .....	35
3.2.6.2	Bligh & Dyer Extraktion .....	35
3.2.6.3	Konzentrationsbestimmung von NBD-PE und Rh-PE .....	35
3.2.6.4	Phosphatbestimmung .....	36
3.2.6.5	Proteinbestimmung mit dem Lowry Assay.....	36
3.2.6.6	SDS-PAGE.....	37
3.2.6.7	In-Gel-Verdau und Bestimmung der Peptide per Massenspektrometer.....	37
3.2.6.8	Größenverteilungsbestimmung der MFK.....	38
4	Ergebnisse.....	39
4.1	Markierung der MFK mit NBD und Rhodamin .....	39
4.1.1	Markierung der MFK mit lipidkonjugierten Fluoreszenzfarbstoffen .....	39
4.1.2	Bestimmung der Fluoreszenz der MFK.....	41
4.1.3	Quantifizierung der Fluoreszenz der MFK mittels der Durchflusscytometrie .....	43
4.1.4	Bestimmung des FRET-Effekts in der MFKM .....	45
4.2	Entwicklung eines Aggregations- und Fusionsassay für MFK.....	49
4.2.1	Durchmischung der MFKM bei der Fusion der MFK .....	49
4.2.2	Quantifizierung der Aggregation und Fusion von MFK mittels des Mixing Assays...	52
4.2.3	Quantifizierung der Aggregation und Fusion der MFK mittels des Diluting Assays...	56
4.2.4	Vergleich zwischen Mixing und Diluting Assay .....	59
4.2.5	Einfluss der Temperatur auf die mittels des Diluting Assays erfasste Aggregation und Fusion der MFK .....	61
4.3	Bestimmung der Emulsionsstabilität von Rahmproben durch FRET-markierte MFK.....	64
4.4	Enzymatische Destabilisierung der Milchfettkugelmembran .....	67
4.4.1	Makroskopische Veränderung der MFK-Emulsion.....	67
4.4.2	Enzymatischer Verdau der MFKM-Proteine.....	69
4.4.3	Verifizierung der MFKM-Proteinbanden der SDS-PAGE durch MS.....	70
4.4.4	Hydrolyse des Gesamtproteins der MFKM .....	71
4.4.5	Analyse des proteolytischen Verdau einzelner MFKM-Proteine .....	73
5	Diskussion .....	76
5.1	Integration von fluoreszenzmarkierten Lipiden in die MFKM und Charakterisierung des Einbaus der Lipide in die Membran der MFK.....	76
5.2	Erfassung der Aggregation und Fusion von MFK mittels fluoreszenzmarkierten MFK..	81
5.2.1	Durchmischung der MFKM bei der Fusion der MFK .....	81
5.2.2	Quantifizierung der Aggregation und Fusion – Mixing versus Diluting Assay.....	83
5.2.3	Temperaturabhängigkeit der Aggregation und Fusion von MFK .....	84
5.2.4	FRET-markierte MFK für die Untersuchung der Stabilität von MFK-Emulsionen .....	85
5.2.5	Kinetische Beschreibung der Fusion und Aggregation von fluoreszenzmarkierten MFK .....	88

5.3	Induzierte Fusion der MFK durch proteolytischen Abbau der MFKM-Proteine .....	92
5.4	Schlussfolgerungen und Ausblick .....	99
6	Literatur .....	101
7	Anhang .....	114
7.1	Fettbestimmungen .....	114
7.2	Extinktionskoeffizienten von NDB-PE und Rh-PE in n-Butanol .....	114
7.3	Kontrolle der Fluoreszenzfarbstoffkonzentration .....	115
7.4	Anfärbungseffizienz der Markierungsmethode .....	116
7.5	Schnittstellen der verwendeten Enzyme in der Aminosäuresequenz von Protein .....	117
7.6	Erstellung von synthetischem Milchultrafiltrat (SMUF) .....	117
	Abbildungsverzeichnis .....	118
	Tabellenverzeichnis .....	120
	Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge .....	121
	Lebenslauf .....	122

## Verwendete Abkürzungen

$\mu\text{m}$	Mikrometer
A	Anzahl
ADPH	Adipophilin
AS	Aminosäuren
BSA	Rinderserumalbumin
BTN	Butyrophilin
C	Konzentration
CD	Cluster of Differentiation
$\text{CHCl}_3$	Chloroform
d	Partikeldurchmesser
Da	Dalton
dest.	destillierte
$d_v$	volumenbezogener mittlere Partikeldurchmesser
$d_{vm}$	volumenbezogener Medianwert der Summenverteilung
E	Effizienz des Energieübertrags
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EMSUF	Synthetisches Milchultrafiltrat mit 10 mM EDTA
EP V8	Endoproteinase V8
FG	Fettgehalt
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer
FRET-MFK	mit NBD- und Rhodamin-PE markierte MFK
h	Stunde
HDH	Hochdruckhomogenisator
HDH	Hochdruckhomogenisator
Ig	Immunoglobulin
k	Aggregationsgeschwindigkeitskonstante
l, L	Liter
M	Molar
m	Steigung einer Geraden
m, M	markiert
Max.	Maximum
Min.	Minimum
MFK	Milchfettkugel(n)
MFKM	Milchfettkugelmembran(en)
min	Minuten

## Verwendete Abkürzungen

---

ml	Milliliter
mM	Millimolar
mol%	Molprozent
MS	Massenspektroskopie
MUC	Mucin
mV	Millivolt
NBD	7-Nitro-2-1,3-benzoxadiazol
NBD-MFK	mit NBD-PE markierte MFK
nm	Nanometer
P	Anzahl der Partikel
PAS	Periodic acid Schiff
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der $H_3O^+$ Konzentration
PL	Phospholipide
PLD	Phospholipiddoppelschicht
PLE	Phospholipideinzelschicht
R	molekularer Abstand
$R_0$	Förster Abstand
rel.	relativ(e)
Rh	Lissamin-Rhodamin B sulfonsäure
Rh-MFK	mit Rhodamin-PE markierte MFK
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>engl. ribonucleic acid</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>engl. Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
s	Sekunden
SFKM	Sekundärfettkugelmembran
SMUF	Synthetisches Milchultrafiltrat
u, U	unmarkiert
V	Verhältnis der markierten zu unmarkierten MFK
VF	Verdünnungsfaktor
XDH	Xanthine Dehydrogenase/Oxidase

## Zusammenfassung

Auf Basis von membrangebundenen lipidkonjugierten Fluoreszenzfarbstoffen wurde in dieser Arbeit eine Messmethode zur Bestimmung der Aggregation und Fusion von Milchfettkugeln (MFK) entwickelt. Ausgangspunkt war dabei der Nachweis der Interaktion von biologischen Membranen durch die Erfassung des Fluoreszenzenergie transfers zwischen membrangebundenen Farbstoffen. Diese für biologische Membranen etablierte Messtechnik wurde auf das System Milchfettkugel/Fettkugelmembran/wässrige Phase übertragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür eine Markierungsmethode entwickelt, mit der die an Phosphoethanolamin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe (NBD-PE und Rh-PE) in die Membran der aus Rohmilch isolierten MFK mit hoher Effizienz integriert werden konnten. Die Quantifizierung der Fluoreszenz und damit die Charakterisierung des Einbaus der Fluoreszenzfarbstoffe gelangen mit durchflusscytometrischen Messungen. Für die Erfassung der Aggregation und Fusion standen dabei zwei verschiedene Versuchsansätze zur Verfügung: Der Mixing und der Diluting Assay.

Mittels des Mixing Assays und fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen konnte die Anwendbarkeit einer Fluoreszenzmarkierung von MFK für die Erfassung der Aggregation und Fusion demonstriert werden. Weitergehend wurde gezeigt, dass sowohl der Mixing als auch der Diluting Assay geeignet ist, die calciuminduzierte Aggregation und Fusion mittels kinetischer durchflusscytometrischer Untersuchungen zu erfassen sowie das Ausmaß der Interaktion zu quantifizieren. Zwischen einem Aggregations- und/oder Fusionsprozess und einer irreversiblen Fusion konnte anhand der Verdünnung der Proben bzw. bei der Anwendung des Diluting Assays auch anhand der Veränderung der NBD-Fluoreszenz der fusionierten MFK differenziert werden.

Da es sich herausstellte, dass der Diluting Assay vielseitiger anwendbar als der Mixing Assay ist, wurde ersterer benutzt, um die Temperaturabhängigkeit der Aggregation und Fusion zu untersuchen. Darauf aufbauend wurde die Eignung von fluoreszenzmarkierten MFK für die Stabilitätsuntersuchungen von homogenisiertem Rahm ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass der Diluting Assay erfolgreich eingesetzt werden kann, um die Veränderungen der Stabilität der MFK Membran durch technologische Prozesse, wie z.B. die Homogenisierung, zu bestimmen. Die Interaktionen der homogenisierten MFK konnten dabei durch ein hohes Ausmaß an calciuminduzierten Wechselwirkungen charakterisiert werden, die von der Art und der Menge der Membranbeladung abhängig sind, da die Calciumbrücken vor allem über Caseine ausgebildet werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Messmethode schafft somit die Basis für weitere weiterführende Untersuchungen zur Aggregation und Fusion technologisch prozessierter MFK. Damit könnte ein grundlegendes Verständnis um die Fettkugeln der Milch erarbeitet werden, so dass sich die Stabilität von Milchprodukten hinsichtlich technologischer Schädigungen der MFK präziser optimieren ließe.

Native MFK werden vor allem durch ihre Glykokalyx der MFKM im wässrigen Milchserum stabilisiert. Allerdings ist bis dato unbekannt, welches der in der MFKM vorhandenen Proteine im größten Ausmaß zur Stabilität der Milchfettemulsion beiträgt. Aus diesem Grund wurde die emulsionsstabilisierende Funktion der einzelnen MFKM-Proteine untersucht. Eigene partikelgrößenbestimmungsbasierte Versuche zeigten, dass die native MFK sehr stabil gegenüber einer Aggregation und Fusion sind, wenn die Membran der MFK intakt ist. Kam es zu einer Beschädigung der nativen Membran, wie anhand proteolytischer Verdauung der Membranproteine simuliert wurde, trat jedoch eine Destabilisierung des Emulsionssystems auf. Dabei kann die fusionsinduzierende Wirkung der verwendeten Proteasen in folgende Reihenfolge eingeordnet werden: Proteinase K > Trypsin > Endoproteinase K. Papain hydrolysiert ebenfalls die MFKM-Proteine, ohne jedoch eine Destabilisierung des Emulsionssystems hervorzurufen. Durch die unterschiedliche Destabilisierung der MFK in Verbindung mit dem selektiven Abbau der verschiedenen MFKM-Proteine durch die verwendeten Proteasen konnte ein MFKM-Protein identifiziert werden, das möglicherweise von besonderer Bedeutung für die Stabilität der nativen MFK sind. Höchstwahrscheinlich kann die Schutzfunktion vor einer Aggregation und Fusion in der Rohmilch dem Membranprotein PAS 6/7 der MFKM zugeordnet werden.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Emulsionssystem Milch

In Kuhmilch liegen mehr als 99 % des Fettes in Form von fein suspendierten Milchfettkugeln (MFK) im sogenannten Milchplasma vor, das in seiner Zusammensetzung nahezu mit Magermilch, abgesehen von deren Restfettgehalt von 0,03 bis 0,05 %, identisch ist.

Neben den Fettkugeln enthält das Milchplasma die Proteine der Milch (hauptsächlich Casein und Molkenproteine), Laktose und gelöste Salze (siehe Tab. 1.1). Die Variation der Zusammensetzung der Milch und damit die der Fettkugeln und ihrer Membran ist von der Genetik (Kuhrasse, genetische Variante), der Physiologie (Alter der Kuh, Laktationsstadium, Gesundheitszustand) und den Umgebungsbedingungen (Klima, Jahreszeit, Fütterung) abhängig. Somit unterliegt auch die Fettkugelzusammensetzung den natürlichen, in der Milch vorkommenden Schwankungen.

Tab. 1.1: Hauptbestandteile der Kuhmilch (nach [SOUCI et al., 1986; WALSTRA und JENNESS, 1984])

Inhaltsstoffe	Protein	Casein	Molkenprotein	Lactose	Fett	Asche	Wasser
$C_{mm,i}$ [g/100g]	3,45	2,8	0,6	4,8	3,8	0,75	87,2

Das Milchfett liegt in kugelförmigen Milchfetttröpfchen vor, die in ihrer Größe von kleiner als 0,2  $\mu\text{m}$  bis etwa 15  $\mu\text{m}$  variieren. Üblicherweise enthält Rohmilch über  $10^{10}$  MFK pro ml. Der Hauptteil des Fettes ist in Kügelchen von 1-8  $\mu\text{m}$  vorhanden [WALSTRA, 1969, 1995], welche 95 % des Fettes der Milch enthalten. Die restlichen 5 Prozent des Fettes verteilen sich auf kleine MFK (< 1  $\mu\text{m}$ ), die 80 % der Anzahl der MFK pro Volumeneinheit ausmachen, aber nur 3 % des Fettes der Milch enthalten, und große MFK (> 8  $\mu\text{m}$ ), die 2 % des Fettes der Milch enthalten.

Die MFK ist aus einem inneren Fettkern und einer äußeren Membranhülle, der sog. Milchfettkugelmembran (MFKM), die aus Lipiden und Proteinen besteht, aufgebaut. Durch ihre Emulgatoreigenschaften ermöglicht die MFKM die Feindispersierung der lipophilen Fettphase und gewährleistet ihre Stabilität im wässrigen Milchplasma. Aufgrund der Größenverteilung der MFK ist die Emulsion Milch relativ instabil, und die MFK rahmen innerhalb kurzer Zeit auf. Viele Milchprodukte werden daher erhitzt und homogenisiert, um eine mikrobielle und kolloidale Stabilität zu erreichen und damit eine größere Langzeitstabilität zu gewährleisten.

Die Stabilität der MFK wird durch die Eigenschaften der MFKM bestimmt, so dass eine Veränderung der Membran signifikant den Charakter der MFK beeinflusst [MULDER und WALSTRA, 1974]. Technologische Prozesse, wie das Kühlen, Pumpen, Erhitzen und Homogenisieren der Milch, führen

zu einer markanten Änderung der Zusammensetzung und Struktur der MFKM und haben somit wesentlichen Einfluss auf die Membraneigenschaften und damit auf die Stabilität der MFK-Emulsion.

Durch derartige Verarbeitungsschritte kann es somit zu einer Veränderung der Stabilität der MFK kommen. Die Konsequenzen, die sich dabei für das Emulsionssystem der MFK ergeben, werden im nächsten Abschnitt erläutert.

### **1.1.1 Instabilität der MFK in Emulsionssystemen**

#### 1.1.1.1 Theoretische Grundlagen zur Instabilität von MFK-Emulsionen

Wie jede Emulsion, in der Fett in einer wässrigen Phase dispergiert ist, ist auch Milch ein thermodynamisch instabiles System und strebt einen Zustand niedriger Energie an. In Öl-in-Wasser-Emulsionen ist die Oberflächenenergie zwischen Fett und Wasser hoch. Veränderungen in der räumlichen Verteilung bzw. in der Makrostruktur der Fetttropfen verringern diese Energiedifferenz, weil sich das thermodynamische System in Richtung des Gleichgewichtes durch die Reduzierung der Oberflächenspannung bewegt.

Für MFK sind folgende Arten der physikalischer Instabilität von Bedeutung [HUPPERTZ und KELLY, 2006; WALSTRA, 1995; WALSTRA et al., 1999]:

1. Aufrahmung, d.h. Bildung einer an Fettkugeln reichen Schicht an der Oberfläche des Emulsionssystems.
2. Aggregation, bei der die Fettkugeln für wesentlich längere Zeit sehr nah beieinander bleiben, als wenn sie sich nur durch die Brownsche Molekularbewegung treffen würden.
3. Fusion (auch Koaleszenz genannt), d.h. die Fettkugeln fließen zusammen und formen eine größere MFK.
4. Partielle Fusion (auch Teilkoaleszenz genannt), die auftritt, wenn eine echte Fusion durch einen Festfettanteil verhindert wird.

Die Destabilisierungsprozesse der Aufrahmung, der Aggregation und der Fusion beeinflussen sich gegenseitig. Die Aufrahmung, hervorgerufen durch den Dichteunterschied zwischen Fett und wässriger Phase, kann durch die verschiedenen Arten der Aggregation beschleunigt werden.

Dieses Phänomen wird hier nicht näher beschrieben, da sich der Fokus dieser Arbeit auf die Aggregation und Fusion von MFK richtet.

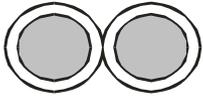
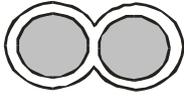
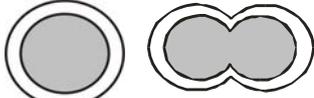
In der Literatur gibt es keine allgemeingültige Definition der verschiedenen Aggregationsvorgänge in Rahm und Milch. In der Kollidalwissenschaft werden als Aggregation die Flockung, die Fusion und die Teilkoaleszenz definiert. Dabei wird von einer Aggregation gesprochen, wenn die Fettkugeln länger zusammenbleiben als in der Abwesenheit von kollidalen Wechselwirkungen [WASTRA, 2003 zit. nach HUPPERTZ und KELLY, 2006]. Flockung ist als eine reversible Traubenbildung

definiert, bei der die einzelnen MFK ihre Größe und Eigenständigkeit behalten. Der einzige Aggregationstyp, der für Milchfettkugeln als Flockung bezeichnet werden kann, ist die Flockung der Fettkugeln, die in Rohmilch auftritt. Zwischen den anderen Arten der Aggregation der MFK gibt es nach HINRICHS [1994] und WALSTRA [1995] keine klare Unterscheidung der verschiedenen Aggregationstypen. Daher wird in dieser Arbeit die Aggregation als ein reversibler Prozess definiert, bei dem die Wechselwirkungen aufgehoben werden können, so dass aus Aggregathaufen bzw. –trauben und –flocken wieder individuelle MFK entstehen können. Wenn jedoch z.B. MFK-Aggregate durch die Hitzekoalugation bei der indirekten UHT-Erhitzung entstehen, die durch Membrankomponenten der MFK stabilisiert werden und somit nicht mehr zerfallen können [HUPPERTZ und KELLY, 2006], ist dies eine irreversible Aggregation. Dieser Prozess wird als Hemifusion definiert, bei dem zwei individuelle MFK eine Membranhülle teilen, die Fettkerne jedoch noch voneinander getrennt sind. Die Verschmelzung der Fettkerne, die auf Aggregation und Hemifusion folgen kann, wird als Fusionsprozess betrachtet, der ebenfalls irreversibel ist. Die so im Umfang gewachsene MFK kann nur durch das Einbringen mechanischer Kräfte, wie z. B. bei der Homogenisierung, wieder zerkleinert werden.

Eine weitere wichtige Aggregationsart der MFK ist die partielle Fusion bzw. die sog. Teilkoaleszenz der MFK, bei der die Membranen der MFK miteinander verschmelzen, jedoch die Fettkerne durch kristallines Milchfett nicht vollständig fusionieren können. Die Teilkoaleszenz unterscheidet sich somit von der Hemifusion. Für diese Destabilisierung der MFK spielt kristallines Fett eine wesentliche Rolle. Durch eine mechanische Belastung der MFKM, die z. B. beim Pumpen von Rahm auftritt, wird eine Schädigung der Membran durch Fettkristalle verursacht. Dabei durchstechen Fettkristalle die Membran und überbrücken damit den Abstand zwischen den Fettkugeln. Die Membranen anderer Fettkugeln können durch die aus den MFK herausragenden Kristalle beschädigt werden, und die Fettkugeln klumpen, verbunden durch das hydrophobe Fett, zusammen. Wesentlichen Einfluss auf diesen Aggregationstyp haben vor allem das Verhältnis von flüssigem zu festem Fett in den Kugeln sowie Strömungs- und Scherkräfte im Medium. VAN BOEKEL [1980] und BOODE [1991; BOODE und WALSTRA, 1993; BOODE et al., 1993] haben sich intensiv mit der Teilkoaleszenz durch Fettkristalle beschäftigt. Sie benutzten vor allem Modellemulsionen, um den Einfluss von Fettkristallen auf die Stabilität von Emulsionen zu untersuchen, und entwickelten die theoretischen Grundlagen zur Beschreibung der Teilkoaleszenz. Unter gleichen Bedingungen tritt dieser Aggregationstyp etwa um das Sechsfache häufiger auf als die echte Fusion [WALSTRA, 1995]. Die Geschwindigkeit der Aggregation ist überwiegend von der mechanischen Beanspruchung der Emulsion durch Pumpen, Rühren etc. sowie von der Fettkonzentration abhängig [HINRICHS, 1994].

Die verschiedenen Aggregationsmechanismen und ihre möglichen Folgeerscheinungen in Milchprodukten sind in Tab. 1.2 zusammengefasst. Wie in Tab. 1.2 zu erkennen ist, beeinflusst die MFKM sehr stark die Stabilität der Fettkugeln. Im nächsten Abschnitt werden daher Probleme beschrieben, die aus der Instabilität der MFK bzw. der MFKM in Milchprodukten resultieren.

Tab. 1.2: Aggregationsmechanismen von Fettkugeln in Milch und Rahm (modifiziert nach [HINRICHS, 1994])

Art der Aggregate	Trauben, Flocken	Hemifusion	Fusion/partielle Fusion
Mikroskopisches Erscheinungsbild			
Verbindung der Aggregate über	Agglutinin <sup>1</sup>	Membrankomponenten	Kristallines und flüssiges Fett
Effekt, Produktfehler	verstärkte Aufrahmung	Verstärkte Aufrahmung, Rahmpfropfen	Aufrahmung, Rahmpfropfen, Butterklumpen
Grund	Agglutinin <sup>1</sup> auf der nativen MFKM	a) Membranbedeckungskinetik beim Homogenisieren b) Membranschädigung c) Hitzeokoagulation von Membranproteinen d) Kollidale Wechselwirkungen	Membranschädigung Kollidale Wechselwirkungen
Voraussetzung	Native MFKM	a) Temperaturen über der Phasenübergangstemperatur der MFKM b) reaktive Proteine als MFKM	Fusion → flüssiges Fett Partielle Fusion → kristallines und flüssiges Fett in den MFK
Reversibler Prozess	Scherraten <sup>A</sup> > 500 s <sup>-1</sup>	Führt zur partiellen oder vollständigen Fusion a) mechanische Zerkleinerung b) chemisch	nicht reversible, partielle Fusion → nach Anwärmen → vollständige Fusion → große MFK Zerstörung durch mechanische Zerkleinerung
Aggregationstyp (Benennung in der Literatur)	Orthokinetische Aggr. (Brownsche Molekularbewegung) <sup>B</sup>		perikinetische Aggr. (scherinduzierte Aggregation) <sup>B</sup>

<sup>A</sup> [WALSTRA und JENNESS, 1984], <sup>B</sup> [SMOLUCHOWSKI, 1916]

<sup>1</sup> Agglutinin: Summe der Proteine der nativen Fettkugelmembran in Rohmilch. Der Name beruht auf der Eigenschaft, Flockung bzw. Agglutination der Fettkugeln in Rohmilch auszulösen.

### 1.1.1.2 Instabilität von MFK-Emulsionen in der Praxis

Im Allgemeinen ist in der Literatur anerkannt, dass sowohl eine physiologisch als auch eine technologisch bedingte Veränderung der Zusammensetzung der Membrankomponenten der MFK zu einer Destabilisierung der MFKM und somit zu einer Aggregation und Koaleszenz der MFK führen kann. MICHALSKI et al. [2002a] begründen den Verlust der Stabilität der MFK bei einer Beschädigung der Membran mit der Veränderung der elektrostatischen Eigenschaften und der Grenzflächeneigenschaften der MFKM, was die Qualität von Milchprodukten erheblich beeinträchtigen kann. Bildung von Fettklumpen, Fettoxidation und Lipolyse, Entwicklung eines ranzigen oder eines anderen für Milchprodukte unnatürlichen Geschmacks, veränderte rheologische Eigenschaften von Käse, Wechselwirkung von Milchfett mit der Proteinmatrix von Säuregelen, Erweichung von Labgelen, Erhärtung von Sauerrahm, Gelierung von Rahm und eine starke Ansatzbildung in Erhitzungsanlagen können unter anderem als Folgen der Fettkugelschädigung, -aggregation oder -fusion angesehen werden [MICHALSKI et al., 2002a].

Veränderungen der MFKM, die die Stabilität der MFK beeinflussen, können auf drei Gruppen von Ursachen zurückgeführt werden: Physiologische, chemisch-enzymatische und physikalisch-mechanische Faktoren [KIRST, 1996 zit. nach EVERS, 2004]. Um die Thematik der MFK- und MFKM-Schädigung einzugrenzen und einen thematischen Fokus der Arbeit zu erreichen, werden im Folgenden Instabilitäten von MFK beschrieben, die vor allem durch chemisch-enzymatische und physikalisch-mechanische Ursachen bewirkt werden.

Die Fragen, wann MFK stabil sind bzw. wodurch die MFK-Emulsionen instabil werden, lassen sich nicht immer schlüssig beantworten, weil zum Teil widersprüchliche Aussagen publiziert worden sind. Generell sind nach WALSTRA [1995] native MFK, aber auch homogenisierte MFK gegenüber einer Fusion erstaunlich resistent, insbesondere wenn die Milch bzw. der Rahm sorgfältig verarbeitet wird.

Die mechanische Destabilisation der MFK durch Pumpen, Mischen, Kühlen, Lufteintrag und das Lagern von Milch und Rahm ist vielfach in den Milchwissenschaften untersucht worden. In einem Review gibt EVERS [2004] einen guten Überblick über die Ursachen der Fettkugelininstabilität bei diesen Prozessen. Jedoch sind viele Zusammenhänge zwischen der Destabilisation der Emulsion und der molekularen Struktur der MFKM noch nicht richtig verstanden. Dies liegt vor allem daran, dass wegen der signifikanten Variation der Zusammensetzung der Milch dieselbe mechanische Behandlung nicht zwangsläufig den gleichen Destabilisierungseffekt der MFKM bzw. der MFK verursacht. Hierdurch sind die publizierten Ergebnisse häufig in sich nicht schlüssig, so dass die Interpretation der gewonnenen Daten schwierig ist. Z. B. beeinflusst bereits allein die Zusammensetzung des Milchfettes, die natürlicherweise unter anderem mit dem Stadium der Laktation und der Jahreszeit variiert, die Stabilität der MFK gegenüber einer Koaleszenz bei einer

mechanischen Behandlung [WIKING et al., 2005; WIKING et al., 2003]. Weiterhin gibt es, wie oben beschrieben, keine einheitliche Definition der Aggregationstypen der MFK, d.h., wenn verschiedene Autoren die Begriffe Koaleszenz bzw. Fusion der MFK verwenden, beschreiben sie nicht unbedingt die gleichen Destabilisierungsmechanismen. Ein weiteres Problem bereiten die unterschiedlichen Messmethoden der Aggregation und Fusion der MFK. Diese Umstände erschweren die Analyse und die Interpretation der publizierten Daten zur Instabilität der MFK in technologischen Prozessen.

Ein Beispiel, um die Inkonsistenz der Literatur zu verdeutlichen, ist der Effekt der Erhitzung von Milch und Rahm auf die Fettkugestabilität. Obwohl MELSEN und WALSTRA [1989], VAN BOEKEL und FOLKERTS [1991] wie auch CORREDIG und DALGLEISH [1996] bei verschiedenen UHT-Erhitzungsversuchen mit Milch und Rahm keine Koaleszenz beobachten konnten, stellten andere Autoren einen Einfluss der Erhitzungsparameter auf die Fusion der MFK fest. SMITH et al. [2000] konnten einen signifikanten Anstieg des Volumen-Oberflächen-Durchmessers ( $d_{3,2}$ ) bei UHT-behandeltem Rahm (nicht homogenisiert) messen. Die Autoren vermuteten eine Veränderung der MFKM-Struktur während der Erhitzung, die es erlaubt, dass die MFK fusionieren. Ebenso konnte FINK [1984] deutlich zeigen, dass die Erhitzung einen Einfluss auf die Stabilität der MFK hat, und auch sie schlussfolgerte, dass es durch die Erhitzung zu einer Veränderung der Membranstruktur kommt. Weiterhin beobachteten HILLBRICK et al. [1999] eine intensive Verklumpung von UHT-prozessierter Milch, wenn diese nicht nach der UHT-Erhitzung mit einem Homogenisierungsprozess behandelt worden ist. Möglicherweise sind diese Widersprüche durch die unterschiedlichen Messmethoden für die Partikelgrößenbestimmungen zu erklären. Jedoch fehlt es an einem generellen Verständnis der Instabilität von MFK bei der Erhitzung.

Viele Milchprodukte werden nach einem Erhitzungsschritt homogenisiert, so dass die Stabilität der Emulsion durch die Erhitzung nicht schwerwiegend beeinflusst wird, da durch die Homogenisierung die Stabilität der MFK gegenüber Aggregation und Fusion in vielen Fällen erhöht wird. Jedoch gibt es auch zahlreiche Milchprodukte, bei denen die Milch direkt nach der Hitzebehandlung ohne Weiterbearbeitung verwendet wird, wie beispielsweise für die Labkäseproduktion. Neuere Publikationen zeigen, dass die makromolekulare Organisation des Milchfettes einen großen Einfluss auf die Qualität von Labkäse haben kann [LOPEZ, 2005; LOPEZ und DUFOUR, 2001; LOPEZ et al., 2006a; LOPEZ et al., 2006b; LOPEZ et al., 2007; MICHALSKI et al., 2007].

LOPEZ et al. [2006b] und [2006a] zeigten, dass durch Labenzym gewonnenes Caseingel bei der Emmentalerproduktion native und fusionierte MFK enthält, während der nachfolgende Erhitzungsschritt die Aggregation der MFK induziert. Die Fusion der MFK wurde sowohl durch die Erhitzung der Käsereimilch (51 °C, 20 min) als auch durch die Konzentrierung der MFK im Proteinnetzwerk induziert. Diese Veränderungen in der Fettstruktur während der Produktion beeinflussen die funktionalen Eigenschaften von Emmentaler Käse [MICHALSKI et al., 2007], so dass die Stabilität der MFK einen deutlichen Effekt auf die Produktqualität von Labkäse hat.

Veränderungen in der molekularen Organisation des Fettes, die durch eine Modifizierung der MFKM während der Lagerung auftreten, haben oft schwerwiegende Folgen für die Produktqualität, vor allem für UHT-erhitzte Milch- und Rahmprodukte. So tritt besonders im Sommer das Phänomen der Gelierung (engl. age-gelling genannt) bei UHT-Sahne auf, bei der sich bei Temperaturen über 23 °C eine homogene, nahezu Crème fraîche adäquate Konsistenz ausbildet [KAISER, 2005; SCHOMACKER, 2001]. Dieses Problem kann auch bei UHT-Milch auftreten, aufgrund der geringeren Fettkonzentration jedoch in abgeschwächter Form [HARDHAM, 1998, 1999; HARDHAM et al., 2000; HILLBRICK et al., 1998; YAMAUCHI et al., 1982]. Diese Instabilität der MFK-Emulsion soll durch die Veränderungen in der Struktur der MFKM hervorgerufen werden, jedoch ist dieser Mechanismus der Destabilisierung noch nicht vollständig geklärt. HARDMAN [1998] vermutet, dass die Gelierung in UHT-Milch teilweise durch die Absorption von denaturierten Molkenprotein/ $\kappa$ -Casein Komplexen an die MFKM verursacht wird. Durch diese Veränderung der Membran wird die Aggregation der Fettkugeln initiiert.

Wie verdeutlicht werden konnte, werden viele Eigenschaften von Milchprodukten direkt vom einzigartigen Membransystem der Fettkugeln beeinflusst. Dabei ist die physikalische Stabilität der MFK gegenüber der Aggregation und Fusion im Wesentlichen von den Eigenschaften der MFKM abhängig [LOPEZ et al., 2007].

## 1.2 Zusammensetzung und Struktur der MFKM

Das Milchfett im inneren Fettkern besteht nach WARMUTH [1990, zit. nach HINRICHS, 1994] aus bis zu 164 verschiedenen Fettsäuren, von denen 25 eine größere Bedeutung besitzen. Dazu gehören die gesättigten Fettsäuren C14 (Myristinsäure), C16 (Palmitinsäure) und C18 (Stearinsäure) mit einem Anteil von 45-50 % und die ungesättigten Ölsäuren (C18:1) mit einem Anteil von 20-30 %. Konzentrationsschwankungen im Jahresverlauf betreffen im Wesentlichen die ungesättigten Fettsäuren, die Stearinsäure und die kurzkettigen Fettsäuren. Diese Veränderung in der Fettsäurezusammensetzung hat erheblichen Einfluss auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Fettkugeln und damit auch Einfluss auf die funktionalen Eigenschaften vieler Milchprodukte.

Der Prozentanteil der Membranbestandteile an der Gesamtmasse der MFK ist bisher nicht genau bestimmt worden. Nach Daten von MULDER und WALSTRA [1974] und BRUNNER [1974] umfasst das Membranmaterial etwa 1-6 % der Gesamtmasse der Fettkugeln. Jedoch haben die verwendete Aufbereitungsmethode und die verwendeten Fettkugeln einen erheblichen Einfluss auf die Ausbeute der MFKM-Präparation. FONG et al. [2007] wie auch KANNO und KIM [1990] geben einen Membrananteil von ca. 3.6 g L<sup>-1</sup> Rahm an, ohne jedoch die Fettkonzentration des verwendeten Rahms zu nennen.

Zusammen machen Proteine und Lipide über 90 % der gesamten Trockenmasse der MFKM aus. Neben den beiden Hauptkomponenten Proteine und Fette enthält die MFKM noch viele andere minore Bestandteile, wie Ganglioside, Cerebroside und mit der MFKM assoziierte Kohlenhydrate. Des Weiteren zählen zu den minoren Komponenten die Elemente Schwefel, Kupfer, Eisen, Molybdän, Mangan, Magnesium, Calcium, Natrium, Kalium und Zink. Die meisten dieser Elemente sind an Proteine gebunden [PATTON und KEENAN, 1975].

### 1.2.1 Lipide der MFKM

Wie andere biologische Membranen besteht die MFKM hauptsächlich aus Proteinen, Lipiden und Kohlenhydraten mit einem annähernden Verhältnis von 4:3:1. Die Fette der Membran bestehen aus Neutralfetten, hauptsächlich Triglyceriden, und komplexen Lipiden (Phospholipide und Glycolipide) mit einem Verhältnis von 2:1.

In Tab. 1.3 ist ein Überblick über die Zusammensetzung der MFKM von Kuhmilch gegeben. Die große Variation der Mengenangaben lässt sich durch die verschiedenen Aufbereitungs- und Analysemethoden wie auch durch die natürlichen Schwankungen in der Zusammensetzung erklären. Die Lipidkomponenten der MFKM bestehen nach neuesten Untersuchungen von FONG et al. [2007] hauptsächlich aus 56 % Triglyceriden und 40,6 % Phospholipiden. Die Phospholipidfraktionen des Membranmaterials der MFK stellen etwa 60 % der Gesamtphospholipide der Milch dar, wobei der Rest in der Magermilch in Form kleiner, membranumhüllter Vesikel und in Form von

Membranfragmenten vorkommt [SCHLIMME und BUCHHEIM, 1999]. Die Phospholipide, die ein integraler Bestandteil der äußeren Membran sind, haben amphiphile Eigenschaften und sind daher maßgeblich für die Emulgatoreigenschaft der Membran verantwortlich [DEETH, 1997]. Neben den Triglyceriden sind als weitere Bestandteile aus der Stoffklasse der Fette geringe Menge von Di- und Monoglyceriden sowie Sterole und Sterolester in der MFKM zu finden. 90 % der Sterole, die in Kuhmilch gefunden werden, macht Cholesterin aus, das mit der MFKM assoziiert ist.

Tab. 1.3: Zusammensetzung der MFKM aus Kuhmilch [KEENAN und MATHER, 2006; PATTON und KEENAN, 1975; SCHLIMME und BUCHHEIM, 1999]

Bestandteil der MFKM	Menge	Einheit
Protein	25-60	[%] Trockenmasse
Gesamtlipide	0,5-1,1	mg/mg Protein
Phospholipide	0,13-0,34	mg/mg Protein
- Phosphatidylcholin	36	[%] Gesamtphospholipid
- Phosphatidylethanolamin	28	[%] Gesamtphospholipid
- Sphingomyelin	22	[%] Gesamtphospholipid
- Phosphatidylinosit	10	[%] Gesamtphospholipid
- Phosphatidylserin	4	[%] Gesamtphospholipid
- Lysophosphatidylserin	2	[%] Gesamtphospholipid
Neutralfette	0,25-0,88	mg/mg Protein
- Triglyceride	62	[%] Gesamtlipide
- Diglyceride	9	[%] Gesamtlipide
- Monoglyceride	Spuren	
- Kohlenwasserstoffe	1,2	[%] Gesamtlipide
- Sterole (Sterine)	0,2 – 5,2	[%] Gesamtlipide
- Sterolester (Sterinester)	0,1 – 0,8	[%] Gesamtlipide
- freie Fettsäuren	0,6 – 6,3	[%] Gesamtlipide
Cerebroside	3,5	nmol/mg Protein
Ganglioside	6,0 – 7,4	nmol Sialinsäure/Protein
Sialinsäure (gesamt)	20	µg/mg Protein
Hexosen	108	µg/mg Protein
Hexosamine	66	µg/mg Protein
Cytochrome b <sub>5</sub> +P-420	30	pmol/mg Protein
RNA	20	µg/mg Protein

Es ist nicht genau bekannt, ob die Partialglyceride in der MFKM Produkte enzymatischer Lipolyse von Glycolipiden oder doch echte Membranbestandteile sind. Die große Menge von Triglyceriden, die normalerweise unter den Membranbestandteilen gefunden wird, stammt größtenteils aus dem Fettkugelnkern und wird beim Isolationsprozess in die Membranfraktion verschleppt. So ist der Anteil an Triglyceriden, der an die Membran gebunden ist, stark von den Isolationsbedingungen

abhängig [DANTHINE et al., 2000]. Ein vermutlich weiterer wichtiger Bestandteil der Membran sind die Glycosphingolipide (Trivialname: Cerebroside), da sie für verschiedene biologische Phänomene verantwortlich sind, wie z.B. Zell-Zellkontakt, Differenzierung, Immunerkennung und Transmembransignale [KEENAN und DYLEWSKI, 1995].

### 1.2.2 Proteine der MFKM

Einen sehr guten Überblick über den bisherigen Forschungsstand zu den Hauptproteinen der MFKM gibt MATHER [2000] in seinem Review. Die von ihm aufgestellte Nomenklatur für die Benennung und Charakterisierung der Proteine wird seither verwendet. Neuere Ergänzungen zu biochemischen Funktionen der MFKM-Proteine geben KEENAN und MATHER [2006].

SNOPE und BRUNNER [1970, zit. nach PATTON und KEENAN, 1975] bestimmten bei sorgfältig durchgeführten Versuchen einen Proteingehalt von 41-43 % des Trockengewichtes der MFKM. Im Allgemeinen wird aber eine höhere Variabilität des Proteingehalts angenommen [KEENAN und DYLEWSKI, 1995].

Tab. 1.4 gibt die Hauptproteine der MFKM an, die aufgrund ihres mengenmäßigen Anteils an der MFKM von Bedeutung für die MFKM sind und daher in dieser Arbeit näher charakterisiert werden. Mit SDS-PAGE identifiziert MATHER [2000] 5 bis 8 Hauptbanden der MFKM. Weitere 15 bis 25 mit der Elektrophorese wahrnehmbare Polypeptide können nachgewiesen werden.

Tab. 1.4: Hauptproteine der MFKM [Keenan und Mather, 2006 und Mather, 2000]

Name	Abk.	Ordnungsnummer <sup>a</sup>	M <sub>r</sub> [kDa]	Konzentration	mögliche Funktion
Mucin	MUC1	P98091	160-200	bis zu 40 mg/L Milch	Immunschutz
Xanthine Dehydrogenase/ Oxidase	XDH	P80457	146	~ 20 % der MFKM-Proteine	Redoxreaktionen entzündungshemmend
Mucin (Periodic acid Schiff III)	MUC15 (PAS III)	Q8MI01	95-100	1.5 % der MFKM-Proteine	n.b. <sup>b</sup>
Cluster of Differentiation 36	CD36	P26201	76-78	< 5 % der MFKM-Proteine	Lipid Transport
Butyrophilin	BTN	P18892	66-67	35–40 % der MFKM-Proteine	MFK Sekretion
Adipophilin	ADPH	Q9TUM6	52-54	n.b. <sup>b</sup>	Triglycerid Deposition
Periodic acid Schiff 6/7	PAS 6/7	Q08431	43–58	n.b. <sup>b</sup>	Phospholipid- bindung

<sup>a</sup> Ordnungsnummer von UniProt Sequenzdatenbank [UniProt]

<sup>b</sup> n.b. = nicht bekannt

Mit einer Kombination von elektrischer Fokussierung und Elektrophorese konnte MATHER [1978] sogar über 40 Proteine der MFKM auftrennen. Durch proteomische Methoden konnten REINHARDT et al. [2006] im Proteom der Rinder-MFKM 120 Proteine identifizieren. 71 % der identifizierten Proteine sind dabei membranassoziiert, während die restlichen Proteine cytoplasmatische oder sezernierte Proteine sind. Jedoch sind diese Proteine, bis auf die bereits bekannten Hauptproteine, mengenmäßig für die MFKM nicht von Bedeutung und beweisen eher die hohe Komplexität eines natürlichen Systems wie das der MFKM. Im Folgenden werden die MFKM-Hauptproteine in ihrem Aufbau und ihrer physiologischen Bedeutung beschrieben.

MUC1 ist ein stark glykosiliertes, Mucin ähnliches Glykoprotein. Die Struktur von MUC1 besteht aus einer Signalsequenz, einer variablen Anzahl von Tandemwiederholungen in der stark glykolisierten exoplasmatischen Domäne, einer transmembranen Verankerung und einem kurzen cytoplasmatischen Schwanz. Bislang ist nur ein Teil der cDNA von Mucin aus dem Rind bekannt. Eine komplette Sequenz liegt jedoch vor vom Menschen, vom Gibbon und von der Maus. Während die Aminosäuresequenz ein Transmembranprotein vorhersagt, verhält sich MUC1 in manchen Fällen wie ein nahezu lösliches Protein und kann teilweise relativ einfach von der Membran entfernt werden. Dieser löslichen Form des Proteins fehlt der Membrananker [KEENAN und MATHER, 2006]. Dieses lösliche Teilstück von MUC1 dissoziiert vor allem von der Membran, wenn Milch gekühlt und gerührt wird [SINGH, 2006]. Verantwortlich dafür soll vermutlich die proteolytische Abspaltung des exoplasmatischen Teils des Proteins in der Nähe des Membranankers sein. Dieses Bruchstück homodimerisiert möglicherweise über nicht kovalente Wechselwirkungen mit dem in der Membran verankerten C-terminalen Fragment und dissoziiert leicht ins Milchserum [KEENAN und MATHER, 2003].

Als Funktion für MUC1 in der MFKM wird eine inhibitorische Aktivität vermutet, indem es die Bindung und Infektion von invasiven pathogenen Mikroorganismen an Zellen des Magen-Darm-Traktes von Neugeborenen verhindert [PETERSON et al., 2001]. Zum anderen soll nach MATHER [2000] Mucin die Oberfläche der MFK vor physikalischer Beschädigung schützen, da das Protein an der Außenseite der MFKM Phospholipiddoppelschicht (PLD) angeordnet ist, was für eine stabilisierende Wirkung spricht.

Ein weiteres Mucin, MUC15, früher PAS III genannt, wurde kürzlich isoliert und charakterisiert [KEENAN und MATHER, 2006; PALLESEN et al., 2007]. MUC15 ist wie MUC1 ein Typ 1 Glykoprotein mit einer umfangreichen exoplasmatischen Domäne, einer transmembranen Domäne und einem kurzen cytoplasmatischen Schwanz. Die Molekülmasse von 33,3 kDa ist wesentlich kleiner als die per SDS-PAGE beobachtete von 95-100 kDa. Dies liegt vermutlich an dem großen Anteil sowohl von O-verknüpften als auch von N-verknüpften Kohlenhydraten an der Gesamtmasse von MUC15. Die Funktion dieses Proteins, das von verschiedenen eukaryotischen Zellen exprimiert wird, ist zurzeit noch unbekannt.

XDH ist ein Hauptprotein der MFKM mit einem monomeren Molekulargewicht von 146 kDa (bestimmt durch SDS-PAGE). Die aktive Form dieses Enzyms ist ein Homodimer. Es besteht aus zwei Fe<sub>2</sub>/S<sub>2</sub>-bindenden Domänen auf der N-terminalen Seite (20 kDa) sowie aus einer Flavin und NAD<sup>+</sup>-bindenden Domäne (40 kDa). Am C-Terminus befinden sich zwei Domänen, die möglicherweise mit dem Molybdopterin Cofaktor interagieren (85 kDa). Dem Enzym fehlen eine Signalsequenz und eine Transmembrandomäne. Von diesem Protein ist die komplette Gensequenz aus dem Rind bekannt. Darüber hinaus wurde herausgefunden, dass die Sequenz von XDH einiger Säugetiere, wie z.B. des Rindes, der Maus, der Ratte, aber auch die des Menschen, zu 90 % identisch ist.

20 % der Membranproteine der MFK sind XDH. Das Enzym oxidiert eine Vielzahl von Purinen und anderen Komponenten. Darüber hinaus weist XDH eine Funktion als antibakterieller Wirkstoff in der Milch auf, da es dem Enzym Lactoperoxidase das nötige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Verfügung stellt. Die hohe Konzentration in der MFKM lässt vermuten, dass das Enzym eine strukturelle und funktionelle Rolle bei der Ausbildung der MFKM übernimmt. Es konnte bestätigt werden, dass XDH bei der Sekretion der MFK aus den Epithelzellen für die Einhüllung der Lipidtröpfchen in die Plasmamembran notwendig ist [VORBACH et al., 2002]. Wahrscheinlich bindet sich XDH während der Ausbildung der MFK an die cytoplasmatische Domäne von BTN und bildet einen Proteinkomplex, welcher mit den Lipidtröpfchen an der apikalen Zelloberfläche interagiert [HEID und KEENAN, 2005; MATHER und KEENAN, 1998].

CD36 besteht aus 478 Aminosäuren und ist damit kleiner als die anderen Membranproteine der MFK. Das integrale Protein ist stark glykolysiert (24 % der Masse sind Kohlenhydrate). Es enthält zwei transmembrane Domänen, außerdem auf der exoplasmatischen Seite eine hydrophobe Region. Die Sequenz von CD36 des Rindes ist mit der des Menschen, der Maus, der Ratte und des Hamsters zu 83 % bis etwa 87 % identisch. CD36 hat eine Anzahl von verschiedenen Funktionen, meist Rezeptorfunktionen in vasikulären und hämopoetischen Systemen, aber keine dieser Funktionen kann in direkten Zusammenhang mit dem System der MFK gebracht werden [MATHER, 2000].

BTN umfasst 526 Aminosäuren und besitzt eine führende N-terminale Sequenz von 26 Aminosäuren. BTN gehört zur Immunoglobulinfamilie (Ig) von adhäsiven und Rezeptorproteinen und besitzt daher zwei Ig Domänen (IgI und IgC1) auf der exoplasmatischen Seite, die auch zwei N-gebundene Glykane enthält. Die transmembrane Verankerung befindet sich ungefähr in der Mitte der Sequenz, gefolgt von einer B30.2 Domäne im C-terminalen Bereich der Sequenz. Der B 30.2 Bereich enthält 170 Aminosäuren und macht damit 70 % des cytoplasmatischen Schwanzes aus. Es wird vermutet, dass der B 30.2 Bereich eine Funktion als Proteinbindedomäne hat und diese die Interaktion mit anderen Proteinen in der Membran vermittelt.

Butyrophilin stellt ca. 40 Gewichtsprozent der gesamten MFKM-Proteine dar und ist damit das am häufigsten vorkommende Protein in der MFKM. Die Bezeichnung des Proteins leitet sich von der

hohen Affinität gegenüber Butterfett ab (griech. Butyrus: Butter, philos: lieben). Es ist stark hydrophob und bindet leicht an Phospholipide.

MATHER und KEENAN [1998] postulierten, dass Butyrophilin vermutlich eine Funktion bei der Sekretion von MFK hat, indem es mit XDH einen Komplex bildet, der sich wiederum mit Adipophilin in der Phospholipideinzelschicht der MFK-Lipidtröpfchen im Cytoplasma der milchbildenden Epithelzellen verbindet und somit für die Sekretion der MFK verantwortlich ist. ROBENEK et al. [2006] stellen diesen Sekretionsmechanismus aber in Frage. Durch elektromikroskopische Aufnahmen haben diese Autoren immunocytochemische Beweise dafür gefunden, dass die Sekretion der MFK von der Entstehung eines BTN-Proteinnetzwerkes abhängig ist. Dieses Netzwerk entsteht bei der Verwachsung des Butyrophilin im sekretorischen Körnchen mit dem sich im Monolayer der cytosolischen Lipidtröpfchen befindenden BTN. Dieses wiederum verbindet sich mit dem BTN in der Plasmamembran. Die Entstehung des BTN-Proteinnetzwerkes würde somit die Sekretion der MFK kontrollieren.

ADPH ist an der Oberfläche von Fetttröpfchen im Cytoplasma assoziiert und bleibt bei einer Destabilisierung der MFKM stark an die Membran gebunden, obwohl es kein Transmembranprotein ist. Es gibt keine kontinuierliche hydrophobe Aminosäuresequenz in ADPH, und ungefähr die Hälfte der ersten 50 Aminosäuren des N-terminus sind unpolar. Die starke Interaktion zwischen ADPH und Lipiden wird vermutlich durch eine alpha-helikale Lipid-bindende Domäne (zwischen 189 und 205 in der Mäusesequenz) verursacht [KEENAN und MATHER, 2006]. Einige mögliche Funktionen von ADPH könnten zum einen die zelluläre Aufnahme von langkettigen Fettsäuren und der Transport von intrazellulären Lipiden sein. Zum anderen wurde herausgefunden, dass es mit Lipidtröpfchen und Proteinen, einschließlich XDH und BTN, im apikalen Cytoplasma und in der Plasmamembran interagiert. Dies könnte erforderlich für die Bildung der MFKM sein [MATHER, 2000].

PAS 6/7 weist am N-Terminus zunächst eine Signalsequenz auf, gefolgt von zwei epidermalen Wachstumsfaktoren E1 und E2. Darauf folgen die beiden Blutgerinnungsfaktoren V + VIII, die hintereinander gereichte Wiederholungen aufweisen (C1 und C2). Es konnte festgestellt werden, dass die C2 Domäne putative phospholipidbindende Motive enthält, einschließlich einer amphipatischen  $\alpha$ -Helix [MATHER, 2000]. Topologieanalysen lassen vermuten, dass PAS 6/7 an anionische Phospholipide der MFKM bindet und somit ein adhäsives Protein ist. Das extrinsische Protein wird zu einem hohen Anteil im Überstand wiedergefunden, wenn die MFKM destabilisiert wird. Es wird vermutet, dass das Protein Wechselbeziehungen eingeht, indem es sich mit Rezeptoren an angrenzenden Zellen verbindet [MATHER, 2000]. In menschlicher Milch assoziiert PAS 6/7 mit einem makro-molekularen Komplex, welcher in der Lage ist, Infektionen zu verhindern, die durch Rotaviren verursacht werden [PETERSON et al., 2001]. Welche spezifische Funktion PAS 6/7 in der MFK-Sekretion oder in der Lactationsphysiologie eventuell hat, ist unbekannt [KEENAN und MATHER, 2003].

Die beschriebenen Membranproteine bilden mit den Phospholipiden die sog. native MFKM der Rohmilch, welche ein natürliches Emulgatorsystem darstellt, das die Aggregation und Fusion der MFK in Milch verhindert und das Fett gegenüber enzymatischer Aktivität schützt.

### **1.2.3 Molekularer Aufbau der MFKM**

#### 1.2.3.1 Native MFKM

Seit über 90 Jahren stehen die Struktur und der Aufbau der Milchfettkugelmembran im Fokus der milchwissenschaftlichen Forschung, die dazu verschiedene Modelle veröffentlicht hat [DANTHINE et al., 2000; McPHERSON und KITCHEN, 1983; MICHALSKI et al., 2002a]. Ende der 50iger Jahre des letzten Jahrhunderts erkannte man den biologischen Charakter der MFKM. Damals vermutete man anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen, dass die MFKM als eine echte biologische Membran von den Zellenmembranen der Milchdrüsen stammt.

Die MFKM ist nach heutigem Verständnis eine echte Phospholipiddoppelschicht mit einem 10-50 nm dicken dichten Proteinmantel auf der cytoplasmatischen Seite der Phospholipiddoppelschicht und einem inneren Phospholipid/Proteinlayer, der direkt an den Fettkern gebunden ist (Abb. 1.1 A). Diese innere Phospholipideinzelschicht stammt von dem Membranmantel, der die MFK vor der Sekretion umhüllt. Dagegen kommt die äußere Phospholipiddoppelschicht von spezialisierten Regionen der apikalen Plasmamembran und umhüllt die MFK bei der Sekretion aus den Epithelzellen der Milchdrüsen. Mehrere Reviews beschreiben ausführlich den bisherigen Kenntnisstand zum Bildungs- und Sekretionsprozess der MFK [DANTHINE et al., 2000; EVERS, 2004; HEID und KEENAN, 2005; KEENAN, 2001; KEENAN und DYLEWSKI, 1995; KEENAN und MATHER, 2003, 2006; MATHER und KEENAN, 1998; McPHERSON und KITCHEN, 1983; PATTON und KEENAN, 1975].

Integrale Proteine der Phospholipiddoppelschicht sind MUC1, MUC15, CD36 und BTN. PAS 6/7 ist vermutlich in der Membran verankert. XDH bildet hauptsächlich den inneren Proteinmembranmantel, und ADPH ist wahrscheinlich durch eine alpha-helikale Domäne an den Fettkern gebunden und interagiert vermutlich mit anderen Proteinen auf der inneren Seite der Membran (Abb. 1.1 B).

DEETH [1997] postuliert ein asymmetrisches Arrangement der Phospholipide in der MFKM ähnlich wie in anderen biologischen Membranen, wie z. B. bei den roten Blutkörperchen, bei denen Phosphatidylcholin, Sphingomyelin und die Glycolipide (Cerebroside und Ganglioside) hauptsächlich an der äußeren Seite der Membran lokalisiert sind, während sich die Neutrallipide (Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol) an der inneren Seite der Membran konzentrieren. Jedoch fehlen hierfür bisher wissenschaftliche Beweise, so dass es keine genaueren Informationen über die Verteilung der Phospholipide in der MFKM gibt.

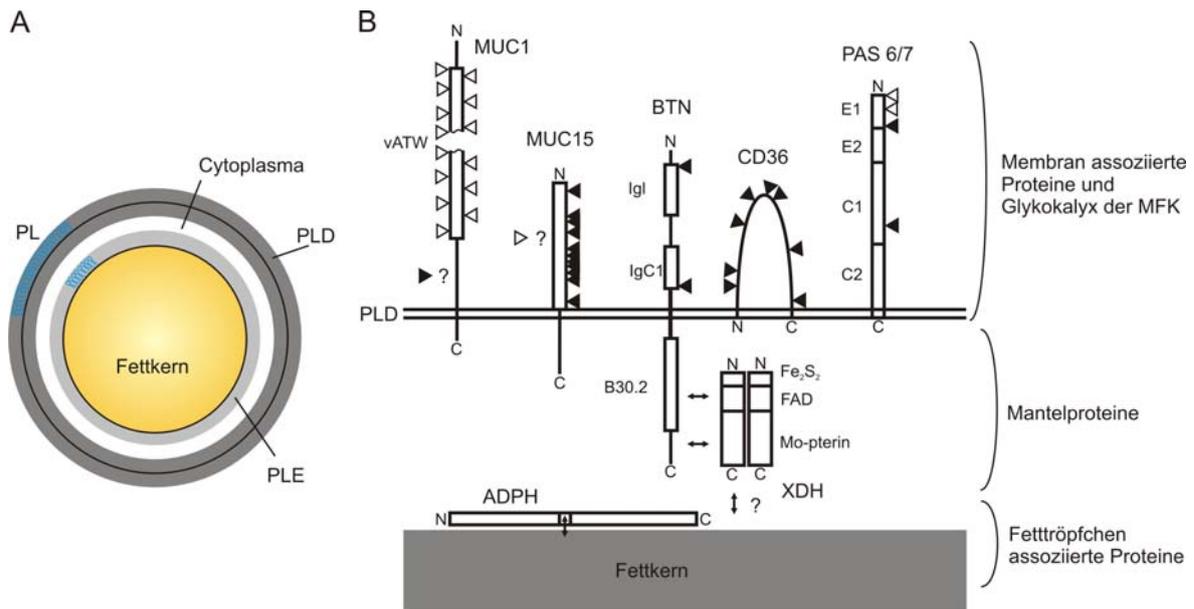


Abb. 1.1: A: Schematischer Aufbau der MFK (nach [ROBENEK et al., 2006]). PL = Phospholipide; PLD = Phospholipiddoppelschicht; PLE = Phospholipideinzelschicht. B: Proteintopologie und vorgeschlagene Struktur der MFKM. Proteine und ihre einzelnen Domänen zeigen schematisch die ungefähre Position und Anzahl von N-gebundenen (geschlossen Dreiecke) und O-gebundenen (offene Dreiecke) Glykanen. Glykosylierungsstellen von PAS 6/7 sind als Kombination von PAS 6 und 7 dargestellt. vATW = variable Anzahl von Tandemwiederholungen;  $Fe_2S_2$  =  $Fe_2S_2$  Bindedomäne, NAD = Flavin +  $NAD^+$  Bindedomäne, Mo-pterin = Molybdopterin Cofaktordomäne; Igl + IgC1 = Ig Domänen; E1 + E2 = epidermale Wachstumsfaktoren; C1 + C2 = Blutgerinnungsfaktoren V + VIII. Doppelpfeile deuten Wechselwirkungen zwischen BTN und XDN sowie ADPH und dem Fettkern an. Es gibt keine sicheren Beweise, dass XDH mit Fettkern interagiert (nach [KEENAN und MATHER, 2006]).

Die relativ große Stabilität der nativen MFKM gegenüber einer Koaleszenz kann mit den sterischen Barrieren, die aus der Fettkugelmembran herausragen und eine Abstoßung der Fettkugeln bewirken, erklärt werden. Durch eine Proteolyse der Membranproteine isolierter MFK durch Proteinasen können die Membranproteine der MFKM abgebaut werden [KOBYLKA und CARRAWAY, 1973; MATHER und KEENAN, 1975; SHIMIZU et al., 1979]. Die Degradation der Proteine ist dabei von der verwendeten Protease und der Enzymkonzentration abhängig, wobei einige Proteine der Membran erstaunlich resistent gegenüber einem Abbau sind. SHIMIZU et al. [1980] untersuchten den Effekt der Membranproteinhydrolyse auf die Stabilität der MFK. Die Autoren konnten zeigen, dass eine Behandlung von gewaschenen Fettkugeln mit Papain eine Aggregation der Fettkugeln bewirkt, die jedoch nicht zu einer Fusion führt. Sie vermuteten, dass die Aggregation der MFK durch den Abbau einzelner Glycoproteine induziert wurde. Allerdings schrieben sie 5 der 7 Hauptproteine der Membran diese Eigenschaft zu. Neuere Erkenntnisse über den Membranaufbau lassen jedoch bezweifeln, dass alle Proteine, welchen SHIMIZU et al. [1980] eine stabilisierende Funktion zuschreiben, diese auch besitzen. So ist z. B. XDH, welches sie als eines der Proteine identifizierten, die die Membran vor der Aggregation schützen, nach neuem Forschungsstand an der cytoplasmatischen Seite der Membran gelegen und auch nicht glykosyliert, so dass dieses

Protein keine sterische Barriere gegenüber eine Aggregation darstellen kann. Die Ergebnisse von SHIMIZU et al. [1980] bestätigten jedoch deutlich, dass die erstaunliche Stabilität der nativen MFK gegenüber Aggregation und Fusion durch ihre Membrankomponenten bewirkt wird.

Diese Stabilisierungseigenschaft der Membran kann, wie schon oben beschrieben, deutlich beeinträchtigt werden, wenn die MFK einer Be- bzw. Verarbeitung mit Milch unterzogen werden. Die Membran verändert sich beispielsweise bereits durch die Kühlung der Milch nach dem Melken. Dieser Prozess induziert den Verlust von Phospholipiden der MFKM in das Milchplasma [PATTON et al., 1980]. Um die Stabilität der MFK-Emulsion nach der Weiterverarbeitung der Milch zu gewährleisten, wird Milch oder Rahm daher häufig einem Homogenisierungsprozess unterworfen.

### 1.2.3.2 Sekundäre MFKM

Bei zu starker mechanischer Belastung der MFK bei der Verarbeitung von Milch kann die native MFKM beschädigt werden. Je nach Stärke der Belastung kann die MFK zerkleinert bzw. die Aggregation der MFK induziert werden. Bei der Zerkleinerung der MFK wird die Membranoberfläche vergrößert, so dass an die neugebildete Phasengrenze oberflächenaktive Komponenten aus dem Milchserum adsorbieren. Die Vergrößerung der Phasengrenzfläche beim Homogenisieren von Rahm und Milch verursacht eine drastische Veränderung der MFKM. Diese veränderte bzw. neu gebildete Membran wird im Allgemeinen als Sekundärfettkugelmembran (SFKM) bezeichnet [KESSLER, 1996]. Durch die intensiven mechanischen Kräfte im Homogenisierungsspalt werden die Fettkugeln zerkleinert, wobei gleichzeitig die Fett/Plasma-Grenzfläche vergrößert wird. Die neu geschaffene Oberfläche wird teilweise durch Ausdünnen der natürlichen Fettkugelmembran bedeckt. Jedoch reicht das natürlich vorhandene Membranmaterial nicht aus, um die neu entstandene Oberfläche vollständig zu bedecken. Die noch freigebliebene Fettoberfläche wird durch diffusiv hinzutretende Plasmaproteine wie Caseinmicellen, -submicellen und Molkenproteine abgedeckt. Caseine belegen bevorzugt die freien hydrophoben Stellen der Membran, da sie die Grenzflächenspannung stärker reduzieren als Molkenproteine. Ein Großteil der SFKM besteht jedoch weiterhin aus Membranbestandteilen der nativen MFKM [KEENAN et al., 1983]. Die Beladung der neuen Grenzfläche gleicht der von nicht homogenisierter Milch (ca. 10 mg/m<sup>2</sup>). Jedoch ist das  $\zeta$ -Potential der homogenisierten MFKM durch die Absorption von Casein größer als das von nativen MFK. Native MFK besitzen einen  $\zeta$ -Potential von ca. -10 bis -14 mV, während homogenisierte MFK eine  $\zeta$ -Potential von -17 bis -22 mV haben [DALGLEISH, 1984; HUPPERTZ und KELLY, 2006; MICHALSKI et al., 2002a]. Das  $\zeta$ -Potential der SFKM korreliert dabei mit dem Grad der „Membranbeschädigung“ durch die Homogenisierung [MICHALSKI et al., 2002a].

Abhängig vom Anteil an ursprünglicher Membransubstanz sowie dem Zerkleinerungsgrad besitzt die gebildete Membran lokal eine sehr unterschiedliche Dicke (Abb. 1.2). Die Struktur der SFKM ist im Wesentlichen von Homogenisierungsbedingungen abhängig, wie Druck, Temperatur, Fettgehalt, ein- oder zweistufige Homogenisation. Die Proteinbeladung pro Flächeneinheit steigt mit dem

Homogenisierungsdruck, der jedoch nur einen geringen Effekt auf die Membranzusammensetzung hat [CANO-RUIZ und RICHTER, 1997].

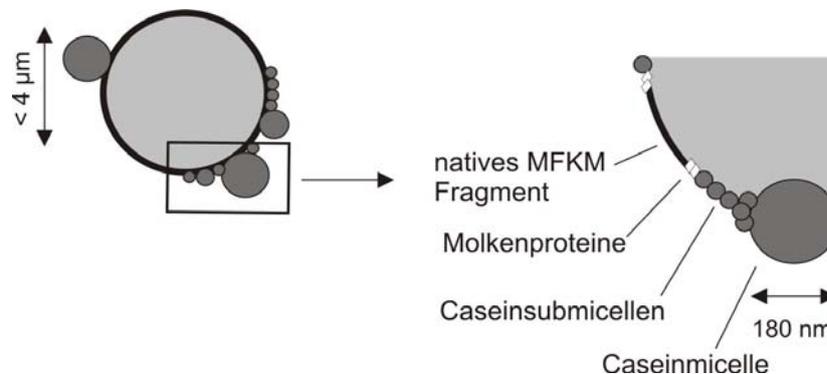


Abb. 1.2: MFKM einer mechanisch beschädigten (homogenisierten) MFK (nach [DANTHINE et al., 2000; MICHALSKI et al., 2002a; MULDER und WALSTRA, 1974])

Frisch homogenisierte MFK sind besonders instabil gegenüber einer partiellen Fusion oder der Aggregatbildung. Die Bildung dieser Homogenisierungskluster wird normalerweise durch eine weitere Homogenisierungsstufe unterbunden.

Aus der überwiegenden Beteiligung der Caseinfraktion am Aufbau der SFKM ergibt sich das prinzipiell ähnliche Verhalten von Caseinmicellen und homogenisierten Fettkugeln hinsichtlich Aggregation und Disaggregation [KESSLER, 1996]. Nach WALSTRA [1995] sind homogenisierte Fettkugeln sehr stabil gegenüber einer Koaleszenz, mit der Ausnahmen von großen Fettkugeln. Sowohl MELSEN und WALSTRA [1989], wie auch VAN BOEKEL und FOLKERTS [1991] konnten bei verschiedenen UHT-Versuchen mit homogenisierter Milch und homogenisiertem Rahm keine Koaleszenz beobachten.

Wie in Kapitel 1.1.1 beschrieben, schützt jedoch eine Homogenisierung nicht immer vor einer Instabilität der MFK-Emulsion. Die Aggregationsneigung der homogenisierten Fettkugeln ist zum Teil gegenüber nativen MFK erheblich erhöht, da aufgrund des hohen Anteils an Caseinen die SFKM hydrophober als die native Fettkugelmembran ist und intensiver mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen reagiert. Auch tritt die SFKM durch ihren hohen Proteinanteil eher in Wechselwirkungen mit anderen Komponenten des Emulsionssystems, so dass hierdurch die Stabilität des Systems beeinträchtigt werden kann.

### 1.3 Methoden zur Messung der Aggregation und Fusion

Die wichtigsten Faktoren für die Stabilität von Emulsionen sind die Fließeigenschaften der kontinuierlichen Phase, die Partikelkonzentration, die Partikelgrößenverteilung und die kolloidalen Wechselwirkungen zwischen den Partikeln [CHANAMAI und McCLEMENTS, 2000]. Es gibt eine Vielzahl von Methoden, mit denen Veränderungen in Emulsionssystemen wie Milch und Rahm bestimmt werden können. In der Literatur werden meistens mikroskopische Aufnahmen, Bestimmung der Partikelgrößenverteilung, Viskositätsmessungen, Aufrahmungsmessungen sowie Abtrennung und Bestimmung der Menge der aggregierten Fettkugeln für die Charakterisierung der Interaktion von MKF verwendet. Diese Methoden erlauben es, die Stabilität der Fettkugeln bzw. das Maß der Fettkugelschädigung während der einzelnen Verarbeitungsstufen der Milch zu verfolgen [HINRICHS, 1994]. Mit Partikelgrößenbestimmungen, Viskositäts- und Aufrahmungsmessungen können Veränderungen in der makrostrukturellen Ebene der Emulsion Milch bestimmt werden. Jedoch ist keine Charakterisierung der Veränderungen auf der mikroskopischen Ebene, also der Vorgänge zwischen den Fettkugeln, unter Einsatz dieser Methoden möglich. Im Folgenden werden drei Messmethoden detailliert beschrieben, die am häufigsten eingesetzt werden, um die Fusion und Aggregation zu erfassen. Dabei wird auf die Nachteile und Vorteile der einzelnen Methoden eingegangen.

#### 1.3.1 Partikelgrößenbestimmung

Eine wichtige Methode, um die Eigenschaften und die Stabilität von Emulsionen zu bestimmen, ist die Partikelgrößenverteilungsmessung. Hierdurch wird eine der wichtigsten Eigenschaften der MFK in Milchprodukten bestimmt: Ihre Größe, meistens charakterisiert durch den mittleren Durchmesser der Verteilung. Aber auch die Breite der Partikelgrößenverteilung ist für die Beurteilung von Emulsionen wichtig.

Für die Berechnung der Fusions- bzw. Koaleszenzrate einer Emulsion muss die Veränderung der Partikelgröße oder der Partikelanzahl über die Zeit verfolgt werden [VAN BOEKEL, 1980]. Verschiedene Parameter können benutzt werden, um die mittlere Partikelgröße von MFK zu charakterisieren. Diese Parameter werden aus den Momenten der Partikelverteilungsfunktion berechnet und können durch folgende Gleichung ausgedrückt werden.

$$S_n = \sum d_i^n N_i \quad (1.1)$$

$S_n$  = Verteilungsfunktionen von Moment  $n$ ,  $N_i$  = Anzahl der Partikel,  $d_i$  = Partikeldurchmesser der Größenklasse  $i$ .

Die Gleichung (1.1) kann für die Berechnung von verschiedenen charakteristischen mittleren Fettkugeldurchmessern benutzt werden, die je nach der Gewichtung unterschiedlicher Parameter (Fettkugelanzahl, Fettkugelgröße bzw. -durchmesser, Fettkugeloberfläche, Fettkugelvolumen) unterschiedliche Informationen über die Partikelgrößenverteilung wiedergeben. Für die Beurteilung der Emulsionsstabilität und die Berechnung der Aggregation und Fusion wird am häufigsten der

volumenbezogene mittlere Partikeldurchmesser ( $d_v = d_{3,0}$ ) und der volumenbezogene Medianwert ( $d_{vm} = d_{4,3} = d_{50,3}$ ) der Summenverteilung benutzt. Mit dem  $d_{3,0}$  kann die Aggregationsgeschwindigkeit und die Reaktionsordnung der Destabilisierung von proteinstabilisierten Emulsionen bestimmt werden. AGBOOLA und DALGLEISH [1996a; 1996b] benutzten den  $d_{3,0}$  für kinetische Bestimmungen der Aggregationskonstanten in stark verdünnten proteinstabilisierten Emulsionen. EUSTON et al. [2000; 2002] nutzten eine Methode von DAS und CHATTORAJ [1982], um durch die Bestimmung des  $d_{3,0}$  in Abhängigkeit der Reaktionsdauer die Abnahme der Partikelanzahl in 20%igen Sojaölemulsionen bestimmen zu können. Hiermit konnten sie die Reaktionsordnung und die rel. Aggregationskonstante des hitzeinduzierten Aggregationsprozesses der durch Molkenprotein stabilisierten Emulsionen ermitteln.

Ein Nachteil der Partikelbestimmungen ist, dass in den meisten Fällen die Proben vor der Bestimmung der Partikelgröße mit einem geeigneten Mittel verdünnt werden müssen. Zwecks Vermeidung von Beeinträchtigungen der Messergebnisse durch andere Milchbestandteile, wie Caseinmicellen, werden Caseine in MFK-Emulsionen durch calciumbindende Reagenzien wie Ethylendiamintetraacetat (EDTA) dissoziiert. Hierdurch ist es teilweise schwierig, zwischen Aggregation und Fusion von Emulsionströpfchen zu unterscheiden, weil über Caseinbrücken gebildete MFK-Aggregate durch den Verdünnungsschritt zerstört werden können. MACRAE und LEPOERTE [1996] konnten überzeugend zeigen, dass das verwendete Verdünnungsmedium bei homogenisierten MFK einen Effekt auf die Bestimmung von Aggregaten hat. Flocken und Trauben von MFK werden im Allgemeinen mit geringen Konzentrationen Natriumdodecylsulfat (SDS) in den Verdünnungsmedien zerstört, so dass nur irreversibel gebildete Aggregate und fusionierte MFK bestimmt werden können [HUPPERTZ und KELLY, 2006; MICHALSKI et al., 2002b]. Eine vollständige Fusion von MFK kann durch Anwärmen der Proben auf Temperaturen über 37 °C bestimmt werden [HINRICHS, 1994]. Im Allgemeinen werden aber andere Methoden gewählt, um die Aggregation oder Fusion der MFK zu quantifizieren. Während manche Autoren [HILLBRICK et al., 1998; MCCRAE und LEPOETRE, 1996; STRAWBRIDGE et al., 1995] zwischen Aggregatbildung und Fusion durch das Verdünnen mit oder ohne SDS und EDTA unterscheiden, bestimmen andere Autoren die Fusion der MFK mit [WIKING et al., 2005] bzw. ohne die Zerstörung der MFK-Aggregate [DOWNEY et al., 2002; SMITH et al., 2000; WIKING et al., 2003]. Die aufgezählten Probleme erschweren eine genaue Bestimmung der Aggregation und Fusion von MFK durch Partikelmessungen und den Vergleich der publizierten Ergebnisse. Ein weiteres Problem der Bestimmung der Aggregations- und Fusionsreaktion mittels der Partikelgrößenbestimmung ist die Benutzung der volumenbezogenen Partikeldurchmesser. Vor allem kleine Partikel ( $< 0,5 \mu\text{m}$ ) tragen aufgrund ihrer hohen Anzahl pro Volumen entscheidend zur Instabilität eines Emulsionssystems bei, weil sie bei der Destabilisierung als erste aggregieren. Damit haben sie einen starken Einfluss auf die Stabilität von Emulsionen. Jedoch werden diese Partikel durch die gängigen Messgeräte nicht notwendigerweise korrekt vermessen, so dass der Einfluss dieser Partikel auf die Partikelverteilung und damit die Stabilität von Emulsionen eher unterschätzt wird [STRAWBRIDGE et al., 1995].

### 1.3.2 Mikroskopie

Die Mikroskopie erlaubt sowohl die Beobachtung und die Größenbestimmung von individuellen MFK als auch die Beurteilung des Aggregationszustandes der MFK in Emulsionen, ist aber zeitintensiv, aufwendig und anfällig für Bedienungsfehler [WALSTRA et al., 1969 zit. nach HILLBRICK et al., 1998]. Daher wird die Mikroskopie in neueren Publikationen eher für die qualitative Beurteilung der MFK-Organisation in Milchprodukten als für die quantitative Bestimmung der Aggregation und Fusion benutzt [LOPEZ, 2005]. Neue Messmethoden wie die konfokale Laser-Scanning Mikroskopie erlauben eine gute Charakterisierung der verschiedenen Aggregatzustände der MFK in Lebensmittelstrukturen. Da die Mikroskopie bisher eine statische Methode ist, wird sich ein signifikanter Wissenszuwachs vermutlich erst erreichen lassen, wenn die Erfassung der Veränderung der MFK-Struktur in Milchprodukten in Echtzeitmessungen möglich wird.

Ein neueres mikroskopisches Verfahren, mit dem die Aggregation und Fusion von Öl-in-Wasser-Emulsionen untersucht werden kann, wurde von DANNER et al. [2000] entwickelt. Bei dieser Methode kann die Fusion von Öl-Tropfen direkt während der Herstellung oder unmittelbar danach untersucht werden. Prinzip der Methode ist, dass zwei unterschiedliche mit verschiedenen Farbstoffen angefärbte Emulsionen miteinander gemischt werden und die Abnahme unterschiedlich gefärbter Emulsionstropfen bzw. die Zunahme der gemischt gefärbten Fetttropfen per Mikroskopie bestimmt und mit einer Bildanalysesoftware ausgewertet wird. Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass immer zwei verschieden gefärbte Emulsionen hergestellt werden müssen, sowie die Beschränkung auf Tropfengrößen größer als 1 µm aufgrund des begrenzten optischen Auflösungsvermögens von Lichtmikroskopen. Daher eignet sich dieses Verfahren eher, um die Emulgatoreigenschaften von oberflächenaktiven Substanzen zu beurteilen, weniger dagegen als kinetische Untersuchungsmethode zur Aggregation und Fusion von Emulsionen.

### 1.3.3 Erfassung der Membranaggregation und -fusion mit FRET

Seit einem halben Jahrhundert wird der Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) als Messtechnik eingesetzt. FRET basiert auf dem abstandabhängigen Energietransfer von einem Donorfluorophor zu einem Akzeptorfluorophor und ist eine der wenigen Möglichkeiten, in vitro und vivo Abstände und Abstandsänderungen im Nanometerbereich messen zu können. Dieses Verfahren wird seit den 1980er Jahren genutzt, um Membranfusion und -aggregation zwischen Phospholipidliposomen zu messen [DÜZGÜNES et al., 1987; STRUCK et al., 1981].

Das Prinzip dieses Verfahrens ist, dass aufgrund der spektralen Überlappung des Emissionsspektrums des Donorfluoreszenzfarbstoffs NBD (7-Nitro-2-1,3-benzoxadiazol) mit dem Anregungsspektrum des Akzeptorfluoreszenzfarbstoffs Rh (Lissamin-Rhodamin B Sulfonsäure) FRET als strahlungsloser Energietransfer zwischen NBD und Rh auftritt, d. h. es werden vom Donor (NBD) keine Photonen emittiert. Beide Farbstoffe sind an PE (Phosphatidylethanolamin) gebunden und können in Phospholipidmembranen eingebaut werden. Die Effizienz dieses Energietransfers ist

reziprok proportional der 6. Potenz des Abstands der Fluorophore und kann durch die Förster-Gleichung beschrieben werden.

$$E = \frac{1}{(1 + (R/R_0)^6)} \quad (1.2)$$

$E$  = Effizienz des Energietransfers,  $R$  = molekularer Abstand zwischen D(onor) und A(kzeptor) und  $R_0$  = Förster Abstand eines bestimmten D/A Paares

Der Försterabstand beschreibt die Distanz zwischen den beiden Fluoreszenzmolekülen, bei der eine Energietransfereffizienz ( $E$ ) von 50 % auftritt.  $R_0$  ist von den spektralen Eigenschaften der beiden Fluorophore abhängig.

NBD-PE und Rh-PE werden häufig als FRET-Paar für die Bestimmung der Membranfusion verwendet, da kein wesentlicher Transfer der Moleküle zwischen Phospholipiddoppelschichten stattfindet. Außerdem beeinträchtigen sie nicht maßgeblich die Struktur der Membranen, da die Fluorophore an die Kopfgruppe von PE gekoppelt sind [DÜZGÜNES et al., 2003].

NBD-PE (Anregung 460 nm, Emission 530 nm) und Rh-PE (Anregung 530 nm, Emission 590 nm) werden in Konzentrationen in den Phospholipidmembranen eingesetzt, die gewährleisten, dass der Abstand zwischen den Molekülen unterhalb von  $R_0$  ist. Hiermit wird sichergestellt, dass ein Großteil der NBD-Emissionsenergie nach Anregung bei 460 nm strahlungslos auf Rh-PE übertragen wird. Die Membranaggregation und -fusion wird durch die abstandsabhängige Fluoreszenz von NDB gemessen. Dazu können zwei verschiedene Messverfahren verwendet werden. Der sog. Diluting Assay (Abb. 1.3), welcher sensitiv die Fusion, aber nicht die Aggregation der Membran bestimmt, und der sog. Mixing Assay (Abb. 1.4), der sehr sensitiv die Vesikelaggregation, aber eher ungenau die Fusion der Membran messen kann [DÜZGÜNES et al., 1987].

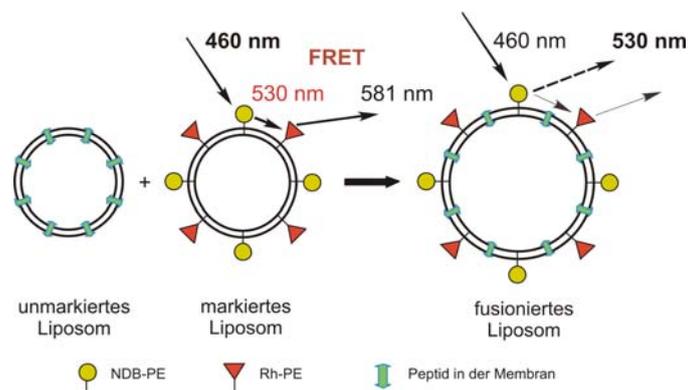


Abb. 1.3: Liposomenfusion mit dem sog. Diluting Assay durch FRET zwischen NBD-PE und Rh-PE. Durch die Fusion steigt der Abstand zwischen Donor und Akzeptor. Die Emissionsenergie von NBD-PE wird deshalb nicht mehr vollständig strahlungslos auf Rh-PE übertragen. Die Emissionsenergie bei 530 nm wird in Abhängigkeit der Zeit gemessen und dient als Maß für die Fusion (nach [HOFMANN, 2005]).

Beim Diluting Assay werden durch die Fusion eines Donorliposoms, welches beide Farbstoffe enthält, mit dem sog. Akzeptorliposom, welches keine Farbstoffe trägt, die Lipide vermischt.

Hierdurch sinkt die Konzentration der Farbstoffe in der Membran, so dass die Abstände zwischen beiden Farbstoffen größer werden. Als Folge des Fusionsereignisses nimmt die FRET-Effizienz ab und NBD emittiert seine Fluoreszenz als Strahlung. Diese kann zeitlich verfolgt werden und spiegelt den Verlauf der Membranfusion wieder, so dass durch diese Kinetik die Fusion der Liposomen charakterisiert werden kann.

Die Aggregation von Liposomen kann mit dem Mixing Assay zeitlich bestimmt werden. Hierbei werden Rh-markierte Liposome mit NBD-markierten Liposomen gemischt. Nähern sich die Membranen der verschiedenen Liposome bis auf einen geringen Abstand, kann ein Teil der NBD-Emission strahlungslos auf Rh übertragen werden. Die FRET-Effizienz nimmt weiter zu, wenn die beiden äußeren Membranen miteinander verschmelzen. Die geringste NBD-Fluoreszenz wird gemessen, wenn die vollständige Fusion der unterschiedlich markierten Liposome erfolgt ist.

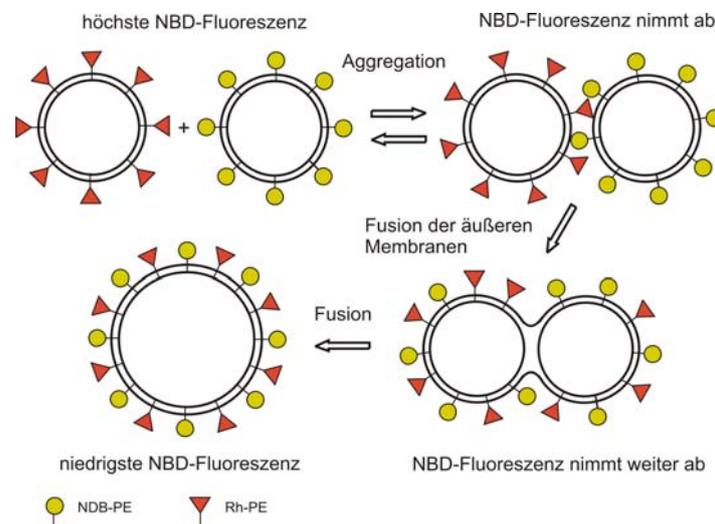


Abb. 1.4: Liposomenaggregation und -fusion mit dem sog. Mixing Assay. Durch die Interaktion der verschieden markierten Liposome nimmt der Abstand zwischen Donor und Akzeptor zu. Die Emissionsenergie von NBD-PE (530 nm) nach Anregung bei 460 nm wird deshalb verstärkt strahlungslos auf Rh-PE übertragen und erreicht bei vollständiger Fusion das geringste Emissionsenergieniveau.

Die beiden genannten Messsysteme können nach HOEKSTRA und DÜZGÜNES [1993] genutzt werden, um die Aggregation und Fusion biologischer Systeme kinetisch zu untersuchen. Die Fluoreszenzveränderungen können hierfür entweder durch einen Spektralfluorimeter oder bei Zellen und großen Liposomen durch fluoreszenzmikroskopische Techniken verfolgt werden. So zeigten z.B. LEI und MACDONALD [2003], dass die Diffusion von fluoreszenzmarkierten Lipiden in der Phospholipiddoppelschicht durch Fluoreszenzmikroskopie verfolgt und quantifiziert werden kann.

## 2 Ziel der Arbeit

Wie oben ausgeführt, bestimmen die in der Literatur bisher beschriebenen Messmethoden die Aggregation und Fusion in Emulsionssystemen auf Grund der makroskopischen Veränderungen dieser dispersen Systeme. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die quantitative Erfassung der Aggregation und Fusion von MFK auf Grundlage der in Kapitel 1.3.3 beschriebenen Messmethoden, basierend auf den Veränderungen der MFKM. Durch die Übertragung der oben erwähnten Messtechniken auf das System Milchfettkugel/Milchfettkugelmembran/wässrige Phase sollte es ermöglicht werden, die Aggregation und Fusion von MFK auf Basis der molekularen Ebene der MFKM quantitativ zu erfassen. Hierfür muss zunächst eine geeignete Markierungsmethode entwickelt werden, um die ausgewählten Fluoreszenzfarbstoffe NDB und Rhodamin, die kovalent an PE gekoppelt sind, in die MFKM zu integrieren. Der Einbau von NDB- und Rh-PE in die MFKM muss mittels der daraus resultierenden Fluoreszenzeigenschaften der MFK charakterisiert werden. Zur Ermittlung der Aggregation und Fusion von MFK soll zunächst die Diffusion der lipidkonjugierten Fluoreszenzfarbstoffe bei der Verschmelzung der MFKM während der calcium-induzierten Fusion der MFK überprüft werden. Dies soll die Eignung der ausgewählten Fluoreszenzfarbstoffe für die Messung der Membranaggregation und -fusion der MFK demonstrieren. Anschließende kinetische Untersuchungen der Aggregation und Fusion der MFK mittels der fluoreszenzfarbstoffmarkierten MFK sollen beweisen, dass die Aggregation und Fusion der MFK durch membrangebundene Fluoreszenzfarbstoffe quantitativ erfasst werden kann. Hierbei soll ermittelt werden, welche der zur Messung der Membranfusion zu Verfügung stehenden Methoden besser geeignet ist, die Aggregation und Fusion von MFK zu erfassen. Ein weiteres Ziel in diesem Zusammenhang ist zu prüfen, ob mittels der fluoreszenzfarbstoffmarkierten MFK die Stabilität homogenisierter MFK untersucht werden kann.

Ein anderer Schwerpunkt dieser Arbeit betrifft die Untersuchung der emulsionsstabilisierenden Eigenschaften der nativen MFK Membranproteine. Wie oben ausgeführt, stabilisiert die Glykokalyx der MFKM die Milchfettkugeln im wässrigen Milchserum und übernimmt damit eine besonders wichtige Aufgabe in der MFKM. Vermutlich weisen die Hauptproteine der MFK, die an der äußeren Seite der Phospholipiddoppelschicht angeordnet sind, eine Funktion als stabilisierende Membrankomponenten auf. Zur Überprüfung dieser Eigenschaften der MFKM-Proteine soll der Einfluss der Proteinhydrolyse auf die Stabilität der MFK-Emulsion untersucht werden. Durch die Verwendung unterschiedlicher Proteasen mit verschiedenen Aminosäureschnittstellen sollen die verschiedenen MFKM-Proteine unterschiedlich schnell degradiert werden. Durch den kinetischen Vergleich zwischen der Destabilisierungsgeschwindigkeit der MFK-Emulsion und dem Abbau der MFKM-Proteine sollen dadurch jene Proteine der nativen MFKM identifiziert werden, die eine fusionshemmende Wirkung aufweisen und daher die als Emulsion vorliegenden MFK stabilisieren.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

Alle verwendeten Chemikalien wiesen Analysequalität oder einen höheren Reinheitsgrad auf. Die verwendeten Stammlösungen wurden mit MilliQ-Wasser angesetzt.

#### 3.1.1 Rohmaterial

Die Morgenmilch von der Versuchsstation Veitshof (Lehrstuhl für Physiologie der TU München, Freising) wurde als Ausgangsmaterial für die Gewinnung der MFK genutzt. Die Milch wurde frühmorgens aus dem Sammeltank der Versuchsstation entnommen. Um die MFK durch Kristallisierung des Fettkerns für ihre Isolierung zu stabilisieren, wurde die Milch für 2-3 h bei 0 °C gelagert.

#### 3.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Die Fluoreszenzfarbstoffe N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-dihexadecanylphosphatidylethanolamin (NBD-PE) und Lissamine™ rhodamin B-dihexadecanylphosphatidylethanolamin (Rh-PE) wurden als Feststoff von Molecular Probes (Invitrogen, Deutschland) bezogen. Nach Lösen in  $\text{CHCl}_3$  zu 1 mg/ml wurden sie in kleinere Gefäße aliquotiert. Die Konzentration der beiden Farbstoffe wurde durch Verdünnung 1:100 in Methanol und anschließende Aufnahme des Absorptionsspektrums überprüft. Für die Berechnung der Konzentration von NBD-PE wurde die Absorption bei 460 nm ( $\epsilon = 21.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) und von Rh-PE bei 530 nm ( $\epsilon = 75.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) eingesetzt. Die Farbstoffe wurden nach Gebrauch stets mit Stickstoff überschichtet und nach luftdichtem Verschließen mit Parafilm im Gefrierschrank bei -20 °C gelagert.

#### 3.1.3 Proteasen

Endoproteinase Glu-C (Typ XVII-B) aus *Staphylococcus aureus* V8, Papain aus *Papaya latex*, Thrombin aus Rinderplasma und Trypsin aus Rinderpankreas wurden von Sigma, Deutschland, bezogen.  $\alpha$ -Chymosin (Grade I) aus Rinderpankreas wurde von AppliChem GmbH, Deutschland, gekauft. Alle Enzyme wurden als Stammlösungen zu 1 mg/ml in synthetischem Milchultrafiltrat (pH-Wert 6,5) gelöst, aliquotiert und bis zum Verbrauch bei -20 °C gelagert. Die jeweils für einen Versuch benötigte Enzymkonzentration wurde nach dem Auftauen eines Aliquots mit SMUF eingestellt.

#### 3.1.4 Geräte

Zur Rehydrierung der Lipidfilme wurde ein Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Die Sonifizierung der Farbstoffsuspension erfolgte im Branson Sonifier. Dabei regte der Ultraschallgenerator (Typ 102C) mittels Netzgerät 450 den Becherresonator (Branson, USA) an.

Die Quantifizierung der Farbstoffstammlösungen erfolgte am Ultrospec 3100pro UV/Vis-Spektrometer (Amersham Bioscience, USA). Die Datenausgabe erfolgte mittels Thermodrucker Modell DPU-414 (Seiko Instruments Inc., Japan).

Als Fluoreszenzmikroskop wurde ein Axioskop benutzt. An dieses Mikroskop waren eine Fluoreszenzlampe (Mikroskopleuchte mit HBO 50) und eine Digitalkamera (AxioCam MRc) angeschlossen. MFK wurden mit der Software AxioVison fotografiert und nachbearbeitet (alles Zeiss, Deutschland). Die Phasenkontrast- und Fluoreszenzbilder wurden ins JPEG Format umgewandelt und mit der Software Corel PHOTO-PAINT 12 und Corel Draw 12 (Corel Corporation, USA) bearbeitet.

Durchflusscytometrische Messungen wurden am Durchflusscytometer BD LSR II (BD Biosciences, Heidelberg) durchgeführt. Die Daten wurden mit der Software BD FACSDiva gewonnen und anschließend als FCS Dateien exportiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software FCS Express Version 3 (DeNovo Software, Kanada).

Die Partikelgrößenverteilung von MFK-Emulsionen wurde mit einem Laserspektroskop LS-230 mit einem variablen Speed Fluid Module Plus (alles Coulter Electronics, Deutschland) bestimmt.

SDS-Gele wurden mit dem PerfectBlue™ Vertical Electrophoresis System von PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland, gegossen und durchgeführt. Als Stromeinheit wurde das Elektrophorese-Stromversorgungsgerät EPS 301 von Amersham Pharmacia Biotech (USA) benutzt.

Die SDS-Gele wurden mit einem Densitometer (Color Scanner Powerbook III, UMAX Data Systems, Deutschland) eingescannt. Die Auswertung erfolgte mittels der Software Image Master™ 1D Elite Version 4.2 (Amersham Pharmacia Biotech, USA).

Die Trocknung der Lipide erfolgte mit einer Vakuumzentrifuge (Univapo 100 H, UniEquip GmbH, Deutschland).

Butyrometer für die Fettbestimmung mittels der Gerber-Methode wurde mit der Zentrifuge Gerber Compact (Gerber Instruments AG, Schweiz) zentrifugiert.

Alle massenspektrometrischen Messungen wurden am Waters QToF-Ultima Elektrosprayionisation (ESI) Massenspektrometer durchgeführt. Zur Auswertung der Daten wurde Masslynx 4.0 Software (Waters, UK) verwendet.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Isolierung von MFK aus Rohmilch

MFK wurden nach der Methode von PATTON and HUSTON [1986] isoliert. Die Dichte der Milch wurde mit einer Zuckerlösung erhöht, so dass die Milch unter einen Waschpuffer gesetzt werden konnte und anschließend die MFK durch eine Zentrifugation durch den Waschpuffer aufrahmten. Durch diesen Waschschrift wurden die MFK von den Serumproteinen der Milch getrennt. Für die Isolierung wurde Rohmilch im Verhältnis von ca. 12:1 (w/w) mit 60-%iger Saccharoselösung (in synthetischem Milchultrafiltrat (SMUF, Erstellung siehe 7.6) gelöst) versetzt, so dass die Milch eine Zuckerkonzentration von 5-7 % hatte. 20 ml der gezuckerten Milch wurden unter 30 ml eisgekühlten Puffer in einer 50 ml Polypropylen-Zentrifugenröhre (Sarstedt, Deutschland) mit Hilfe einer 25 ml Glaspipette gesetzt. Als Puffer wurden entweder SMUF (pH 6,5) oder SMUF mit 10 mM EDTA (ESMUF, pH 6,5; eingestellt mit 0,1 N KOH) verwendet. Es wurde darauf geachtet, dass eine klare Phasengrenze zwischen den zwei unterschiedlich dichten Phasen entstand. Die Aufräumung der Fettphase durch die Waschphase erfolgte in einer Zentrifuge (1.500 x g, 3 °C, 25 min; Hermle Z 513 K, Deutschland). Die gebildeten Fettschichten wurden mit Hilfe eines Spatels vorsichtig abgehoben und wieder in Pufferlösung (SMUF oder ESMUF, VF zwischen 0,75-0,85 (w/w)) resuspendiert. Der Fettgehalt der Emulsionen wurden mittels der Gerber-Methode bestimmt und die Proben durch Verdünnung (w/w) mit dem entsprechenden Puffer auf den gewünschten Fettgehalt eingestellt.

### 3.2.2 Markierung der MFK mit lipidkonjugierten Fluoreszenzfarbstoffen

Als FRET-Paar wurden die an Phosphoethanolamin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe NBD und Rhodamin verwendet. Die Farbstoffe wurden, wie in 3.1.2 beschrieben, in Chloroform gelöst und mussten aus dieser hydrophoben Phase in die wässrige Phase gebracht werden, damit sie in die Membran der MFK eingebaut werden konnten.

Die in  $\text{CHCl}_3$  gelösten Markerlipide NBD-PE und Rh-PE wurden in ein Eppendorfreaktionsgefäß (2 ml) mit 50  $\mu\text{l}$  vorgelegtem  $\text{CHCl}_3$  gegeben. Mittels eines leichten Stickstoffstroms wurde unter Drehen des schräg gehaltenen Reaktionsgefäßes ein dünner Lipidfilm auf der Wand des Gefäßes erzeugt. Die vollständige Entfernung des Lösungsmittels  $\text{CHCl}_3$  erfolgte im Vakuum (50 mbar) für 3 h. Die Markerlipide wurden mit 100  $\mu\text{l}$  ESMUF rehydriert (Thermomixer 37 °C, 1 h, 1400 rpm). Zu dieser Farbstofflösung wurden 500  $\mu\text{l}$  in EMSUF isolierte MFK mit einem Fettgehalt von 30 % zupipettiert. Die Proben wurden gut durchmischt und 30 min bei 37 °C und 500 rpm auf einem Thermomixer inkubiert. Zum Einbau der Farbstoffe in die MFKM wurden diese mit Ultraschall behandelt. Dazu wurden die Proben entweder einzeln oder zu dritt mittels des entsprechenden Aufsatzes in den Becherresonator des Sonifiziergerätes gehängt und gegen Herausdrücken mit einer Stativklammer oben fixiert. Während des Sonifizierens (8 min, Amplitude 80 % (Output 35-38 %)) wurde der Becher mit Wasser gekühlt (Temperatur  $12 \pm 5$  °C).

Für die Reinigung der markierten MFK von den nicht integrierten Fluoreszenzfarbstoffen wurden markierte MFK mit einer 10-%igen Saccharoselösung (in SMUF) 3:10 verdünnt. In der Standardprozedur wurden 400 µl MFK mit 933 µl Zuckerlösung gemischt und mit einer 1 ml Einmal-Feindosierungsspritze mit langer Einmal-Kanüle (Omifix-F 1 ml mit 100 Sterican, 1.10 x 50 mM, beides Braun Melsungen AG, Deutschland) unter 2,7 ml SMUF in einem Pollyallomer Zentrifugenröhrchen (Beckman Instruments, USA) gesetzt. Ausschlaggebend war hierbei wieder, eine klare Phasengrenze zwischen den unterschiedlich dichten Medien durch vorsichtiges Arbeiten zu erhalten. Für die Abtrennung der markierten MFK von den nicht integrierten Fluoreszenzfarbstoffen wurden die Zentrifugenröhrchen in 15 ml Zentrifugenbecher (Sarstedt, Deutschland) gestellt und bei 1500 x g und 3 °C 25 min zentrifugiert (Hermle Z 513 K, Deutschland). Die entstandenen Fettschichten wurden mit einem Spatel in 1,5 ml Eppendorfreaktions-Gefäße mit bekanntem Leergewicht überführt, gewogen und mit SMUF resuspendiert. Standardmäßig wurden die Proben mit einem Verdünnungsfaktor (VF) von 2,5 (w/v) mit SMUF verdünnt, so dass der Fettgehalt der Proben ca. 25 % betrug. Die Proben wurden kurz (~ 1 min) in einem 42 °C warmen Wasserbad angewärmt und durch behutsames, gründliches Mischen homogenisiert. Durch einen anderen VF konnte auch ein anderer Fettgehalt der Emulsionen mit markierten MFK erzielt werden (siehe 7.1). Bis zur weiteren Verwendung wurden die markierten MFK-Emulsionen auf Eis gelagert.

### **3.2.3 Bestimmung der Fluoreszenz von MFK**

#### 3.2.3.1 Fluoreszenzmikroskopie

Um die Fluoreszenz der MFK zu bestimmen, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit einem Fluoreszenzmikroskop gemacht. Dabei wurden die Fluoreszenzfiltersätze 10 (NBD-Anregung) und 00 (Rhodamin-Anregung) benutzt (beide Zeiss, Deutschland). MFK, die mit SMUF (VF 50-100) verdünnt worden waren, wurden auf einen Objektträger gegeben und mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge bestrahlt. Bei einer Vergrößerung von 1300 wurden Bilder der MFK mit Hilfe einer mit einem Computer verbundenen Digitalkamera gemacht. Von jeder Probe wurden 5-10 zufällig ausgewählte Bildausschnitte photographiert. Es wurde jeweils zuerst ein Phasenkontrastbild eines Bildausschnittes und dann in zügiger Reihenfolge die unterschiedlichen Fluoreszenzbilder aufgenommen, da die Fluoreszenzfarbstoffe durch die intensive Anregung innerhalb ~ 30 s zerstört wurden. Die Belichtungszeiten wurden der jeweiligen Lichtstärke angepasst (Phasenkontrastbild 1000 ms, Fluoreszenzbilder 4000-7000 ms). Die Bilder wurden mit der Software AxioVison skaliert, in ein JPEG Format umgewandelt und mit der Software Corel PHOTO-PAINT 12 nachbearbeitet.

#### 3.2.3.2 Durchflusszytometrie

Als Messgerät für die Bestimmung der Fluoreszenz der markierten MFK wurde ein Durchflusszytometer (engl. flow cytometry) vom Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel der TUM verwendet. Diese Messtechnik ermöglicht die Erfassung physikalischer und chemischer Eigenschaften von Zellen und Partikeln. Gegenüber der klassischen Fluoreszenzspektroskopie hat

dieses Fluoreszenzmessgerät den Vorteil, dass Einzelereignisse aus einer Emulsion/Suspension vermessen werden können. Jedes Emulsionströpfchen bzw. Suspensionspartikelchen aus einer Emulsion oder Suspension kann durch das Messsystem vereinzelt und vermessen werden. Durch die Vereinzelnung der Partikel tritt keine Beeinträchtigung des Messergebnisses durch Streulicht- bzw. Absorptionseffekte auf, wie es im Fall der klassischen Fluoreszenzspektroskopie für Emulsionen und Suspensionen vorkommt. Für die Vereinzelnung der Probenpartikel wird im Durchflusscytometer durch den kontinuierlichen Fluss von Trägerflüssigkeit eine laminare Strömung (Hüllstrom) erzeugt, in welche die Probe über eine Probenkapillare in Form einer Suspension oder Emulsion eingebracht wird. Durch die hohe Strömungsgeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit werden die Partikel vereinzelt und an einem fokussierten Lichtstrahl vorbeigeführt. Als Lichtquelle wurde ein luftgekühlter Argonionenlaser, der blau-grünes Licht bei einer Wellenlänge von 488 nm emittierte, verwendet. So angeregt, streut jeder Partikel einen Teil des Laserlichts und emittiert, je nach verwendeter Fluoreszenzmarkierung, Fluoreszenzlicht in unterschiedlichen Spektralbereichen. Das sog. Vorwärtsstreulicht (forward scatter = FSC, small angle scatter) wird entlang der Achse des einfallenden Laserlichtes mit einer Streuung von weniger als  $2^\circ$  gemessen. Es korreliert mit der Größe der Partikel. Das Seitwärtsstreulicht (side scatter = SSC, orthogonal scatter) wird im Winkel von  $90^\circ$  zum einfallenden Laserlicht bestimmt und ist proportional zur Partikelgranularität und/oder der Partikeldichte [ORMEROD, 1994 und SHAPIRO, 2005]. Durch Anregung der Fluorochrome mit dem Laserlicht kann das daraufhin emittierte Licht durch ein System aus Linsen, Spiegeln und Farbfiltren geleitet und auf diese Weise in verschiedene Spektralbereiche zerlegt und simultan bestimmt werden. Tab. 3.1 gibt die verwendeten Fluoreszenzbereiche am verwendeten Durchflusscytometer BD LSR II an; in Abb. 3.1 ist schematisch das Messprinzip eines Durchflusscytometers dargestellt.

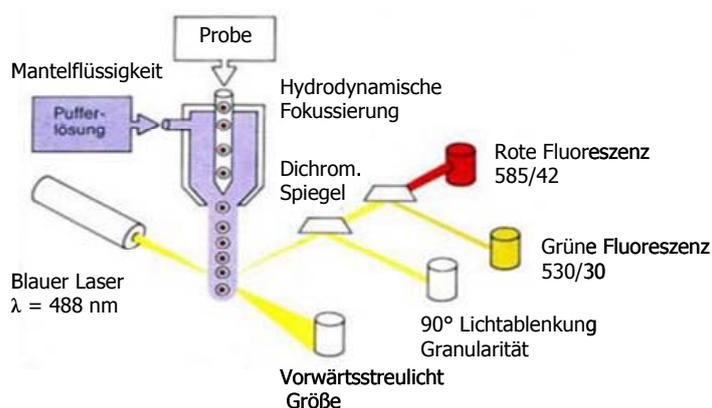


Abb. 3.1: Messprinzip eines Durchflusscytometers.

#### Durchführung der Messungen

Für eine Messung der Fluoreszenz der MFK-Emulsionen mit dem Durchflusscytometer mussten die Emulsionen stark mit SMUF verdünnt (VF 45 000-50 000) werden, um eine Ereigniszahl mit einer mittleren Flussrate von 200-300 Ereignissen pro Sekunde zu erreichen. Bei jeder Messung wurden

10 000 Einzelereignisse aus einer Probe vermessen. Die optimalen Bedingungen (siehe Tab. 3.1) für die Messungen wurden empirisch ermittelt. Zur Überprüfung der verwendeten Messbedingungen wurden zu Beginn jedes Messtages Kontrollmessungen mit NBD-MFK, Rh-MFK, FRET-MFK und unmarkierten MFK durchgeführt.

Tab. 3.1: Verwendete Messparameter für die durchflusscytometrischen Messungen

Optische Messgröße des Durchflusscytometers	Filter	Detektorwellenlängenbereich (nm)
rel. NBD-Fluoreszenz (Grünfluoreszenz)	530/30	515-545
rel. Rhodamin-Fluoreszenz (Rotfluoreszenz)	585/42	564-606

### Darstellung der Daten

Für jedes Ereignis kann mit einem Durchflusscytometer die rel. NBD-(Grünfluoreszenz) und die rel. Rhodamin-(Rotfluoreszenz) gemessen werden. Die so gewonnenen Daten können in einem rel. Fluoreszenzdiagramm mit Hilfe der Computersoftware graphisch dargestellt werden. In diesen Diagrammen, die Dot-Plots genannt werden, wird die rel. NBD-Fluoreszenz in Abhängigkeit der rel. Rhodamin-Fluoreszenz aufgetragen. Abb. 3.2 zeigt eine schematische Darstellung von vier unterschiedlich markierten MFK-Populationen. In Dot-Plots wird jedes gemessene Ereignis durch einen Punkt dargestellt. MFK mit gleichen oder ähnlichen Eigenschaften bilden in diesem Diagrammtyp daher Punktwolken.

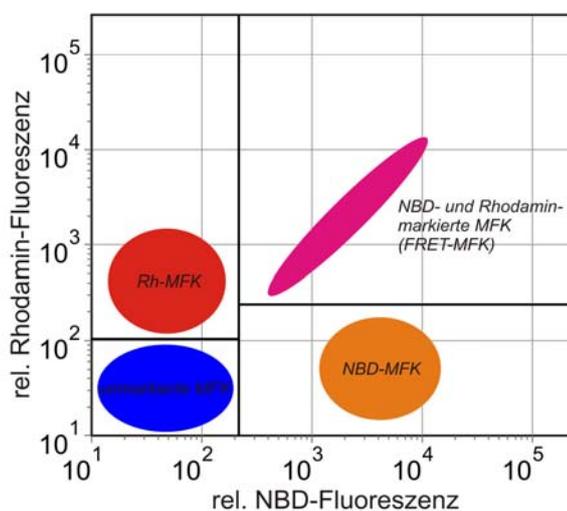


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der vier unterschiedlichen MFK-Populationen im Fluoreszenzdiagramm.

In heterogenen MFK-Emulsionen können einzelne Populationen unterschieden und durch die Markierung der entsprechenden Punktwolke quantifiziert werden. Die Geräteeinstellungen wurden so gewählt, dass die ungefärbten Proben eine schwache rel. NBD- und Rhodamin-Fluoreszenz hatten und zu den gefärbten Populationen eine möglichst große Differenz in der rel. Fluoreszenz bestand. Durch eine Anfärbung von MFK mit Fluoreszenzfarbstoffen ist eine deutlich sichtbare

Unterscheidung zwischen nicht markierten und markierten MFK zu erwarten, so dass alle gemessenen MFK in einen der vier Bereiche (auch Gates genannt) im Fluoreszenzdiagramm eingeordnet werden können.

#### **3.2.4 Interaktions- und Fusionsassays**

Die Destabilisierung der MFK-Emulsionen durch eine Aggregation und/oder Fusion wurde mit Hilfe fluoreszenzmarkierter MFK erfasst. Die Destabilisierung der Emulsionen wurde im Rahmen dieser Arbeit entweder mit Calciumchlorid oder durch einen proteolytischen Verdau der Membranproteine der MFK induziert. Zwei verschiedene Assays wurden dafür verwendet: Der sog. Diluting Assay (dabei tritt bei einer Interaktion von biologischen Membranen eine Verdünnung der Farbstoffe in den Membranen auf) und der sog. Mixing Assay (dabei tritt bei einer Interaktion von biologischen Membranen eine Durchmischung der Farbstoffe in den Membranen auf) [DÜZGÜNES et al., 1987; STRUCK et al., 1981].

##### 3.2.4.1 Diluting Assay

Die nach der in 3.2.2 beschriebenen Methode wurden mit NBD-PE und Rh-PE gefärbten MFK (FRET-MFK) eingesetzt, um Interaktionsmessungen durchzuführen. Als Interaktionspartner wurden dabei MFK verwendet, die den gleichen Bedingungen ausgesetzt waren, jedoch nicht mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt wurden (nicht markierte MFK).

Markierte MFK und nicht markierte MFK (nm-MFK) wurden im Verhältnis 1:5 auf Eis gemischt: Zuerst wurden 10 µl FRET-MFK in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und anschließend 40 µl nm-MFK dazupipettiert. Mit einer neuen Pipettenspitze wurden die Proben durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einem 100 µl Pipetman (Gilson International, Deutschland) gemischt und 10 µl der Mischung abgenommen. Diese Probe wurde mit SMUF oder mit 35 mM EDTA pH 6,5 verdünnt und als Nullprobe verwendet. Die Interaktion der MFK wurde durch Zugabe von 10 µl Calciumchloridlösung (in 20 mM Imidazolpuffer) oder durch Zugabe einer Proteaselösung induziert und die Proben bei 37 °C bei 500 rpm im Eppendorfschüttler inkubiert. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden Proben entnommen (2-10 µl), die entweder direkt mit SMUF oder zunächst mit 35 mM EDTA verdünnt und anschließend mit SMUF weiter verdünnt wurden, so dass am Ende ein Verdünnungsfaktor von > 45 000 erreicht wurde. Die Fluoreszenz der MFK in diesen stark verdünnten Emulsionen wurde daraufhin am Durchflusscytometer bestimmt.

##### 3.2.4.2 Mixing Assay

Nach der in 3.2.2 beschriebenen Methode wurden MFK entweder mit NBD-PE oder mit Rh-PE angefärbt. Unterschiedlich gefärbte MFK-Populationen wurden für den Mixing Assay im Verhältnis 1:1 auf Eis gemischt. Dazu wurden 25 µl NBD-MFK und 25 µl Rh-MFK nacheinander in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß geben. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die gefärbten MFK homogen verteilt. 10 µl der gemischten Emulsion wurden abgenommen, mit SMUF verdünnt und als Nullprobe verwendet. Durch Zugabe von CaCl<sub>2</sub> (in 20 mM Imidazolpuffer) oder Protease-

lösung (jeweils 10 µl) konnten Aggregation und Fusion der MFK induziert werden. Für die Fluoreszenzmessung der MFK wurden die Proben wiederum stark verdünnt.

#### 3.2.4.3 Enzymatischer Verdau der MFKM-Proteine

Um eine Destabilisierung des Emulsionssystems der Milchfettkugeln zu induzieren, wurden die Membranproteine der MFK mit verschiedenen Proteasen verdaut. Als Proteasen wurden Endoproteinase V8 (Typ XVII-B), Papain, Thrombin, Trypsin und  $\alpha$ -Chymosin (Grade I) verwendet. Alle proteolytischen Verdaue erfolgten im Thermomixer bei 37 °C bei 500 rpm in 2 ml oder 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen.

Für diese Versuche wurden MFK isoliert (siehe 3.2.1), und der Fettgehalt der MFK-Emulsion mit SMUF auf 25 % (w/w) eingestellt. Der Proteingehalt der Emulsionen wurde mit dem Lowry Assay (siehe 3.2.6.5) bestimmt. Daraufhin wurde die Stammlösung der zu verwendenden Protease so verdünnt, dass das Protein-Enzym-Verhältnis in allen Versuchen 1:20 (w/w) war. Der VF der Emulsionen durch die Enzymlösung betrug 1,25, so dass die Verdaue bei einem Fettgehalt von ca. 20 % durchgeführt wurden. Für jeden Versuchsansatz wurden mehrere Eppendorfreaktionsgefäße mit MFK-Emulsionen vorbereitet (meistens am Vortag des eigentlichen Versuchstages), um genügend Probenmaterial für die Partikelgrößenbestimmung und die Analyse des proteolytischen Verdaus zu erhalten. Nachdem die Reaktion durch Zugabe der Enzymlösung gestartet worden war, wurden die Proben für 0-300 min bei 37 °C inkubiert, nach verschiedenen Zeitintervallen entnommen und zu dem entsprechenden, in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen auf Eis vorgelegten Enzyminhibitor hinzupipettiert. Tab. 3.2 gibt die verwendeten Enzyminhibitoren für die entsprechenden Proteasen an.

Nach gutem Durchmischen wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Zur Kontrolle wurden Proben verwendet, bei denen statt Enzymlösung nur SMUF Puffer zu den 25%igen MFK-Emulsionen gegeben worden war. Entsprechend wurden die Proben, bevor sie auf Eis gelagert wurden, nur mit SMUF „gestoppt“.

Für die Bestimmung der Partikelgröße der MFK wurden Aliquots der Proben mit 0,1 % SDS-Lösung mit 35 mM EDTA (pH-Wert 7.0) gründlich gemischt, auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend die Partikelgröße gemessen.

beschrieben isoliert, jedoch bei 3000 x g zentrifugiert. Der Fettgehalt der Proben wurde bestimmt und durch entsprechendes Verdünnen mit SMUF auf 25 % eingestellt. Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde die Stabilität der homogenisierten MFK untersucht.

#### 3.2.6 Analysemethoden

##### 3.2.6.1 Fettbestimmung

Der Fettgehalt der Proben wurde mit der butyrometrischen Bestimmung des Fettgehaltes von Milch nach dem Verfahren von Gerber durchgeführt [VDLUFA – Methodenbuch Band VI, 1996]. MFK-Proben, die einen höheren Fettgehalt als 10 % hatten, wurden vor der Fettbestimmung mit SMUF verdünnt (w/w).

##### 3.2.6.2 Bligh & Dyer Extraktion

Die Lipide der MFK wurden nach einer modifizierten Methode von BLIGH & DYER extrahiert [BLIGH und DYER, 1959]. Dabei wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zu einem Volumen der MFK-Probe (in einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß) wurden 2 Volumen Methanol und 1 Volumen Chloroform gegeben und die Probe in einem Thermomixer bei 37 °C und 1400 rpm 5 min kräftig geschüttelt. Danach wurden 1 Volumen 0,1 N HCl mit 0,5 M NaCl und 1 Volumen Chloroform zupipettiert. Die Proben wurden per Hand kräftig gemischt und zur Phasentrennung kurz mit einer Tischzentrifuge bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Chloroformphase wurde abgenommen und in ein Eppendorfreaktionsgefäß mit bekanntem Leergewicht (diese Gefäße wurden nach dem Wiegen nur noch mit Handschuhen angefasst) gegeben. Durch zweimaliges Waschen der wässrigen Phase mit 1 Volumen Chloroform wurden die Lipide vollständig in die hydrophobe Phase überführt. Die Chloroformphasen wurden vereinigt und das Chloroform im Vakuum verdampft (Speed Vac ~ 3 h, 50 mbar bei 40 ± 5 °C). Anschließend wurden die Eppendorfreaktionsgefäße nochmals ins Vakuum gestellt, um Lösungsmittelrückstände zu entfernen. Nach 24-48 h wurden die Proben aus dem Vakuum genommen und das Gewicht der Eppendorfreaktionsgefäße mit einer Analysenwaage bestimmt. Die Proben wurden wiederholt für weitere 12-24 h unter Vakuum gelassen, bis die Gewichtsdiﬀerenz zwischen zwei aufeinanderfolgenden Wägungen ≤ 0,5 mg lag. Die Proben wurden mit Stickstoff überschichtet und bei - 20 °C gelagert. Der Fettgehalt der Proben wurde mit der Formel (3.1) berechnet.

$$W_{FG} = \frac{A_E - B}{V_P} \quad (3.1)$$

$W_{FG}$  = Fettgehalt [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ],  $A_E$  = Auswaage an Lipid [ $\mu\text{g}$ ],  $B$  = Blindwert [ $\mu\text{g}$ ] und  $V_P$  = Probenvolumen [ $\mu\text{l}$ ]

##### 3.2.6.3 Konzentrationsbestimmung von NBD-PE und Rh-PE

Um die Konzentration von NBD-PE und Rh-PE in den nach 3.2.6.2 extrahierten MFKM zu bestimmen, wurden zu den getrockneten Lipidproben 600  $\mu\text{l}$  Butanol gegeben. Die Lipide wurden

bei 37 °C und 1400 rpm auf einem Thermomixer innerhalb von 5 min gelöst. Nach dem Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurde die Absorption der Proben bei 465 nm und 560 nm gemessen. Auf Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes wurden aus den Absorptionswerten die Konzentrationen von NBD-PE ( $\epsilon = 21421 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und Rh-PE ( $\epsilon = 64585 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) berechnet. Die Extinktionskoeffizienten für NBD-PE und Rh-PE in Butanol wurden vorher durch bekannte, in Butanol gelöste Konzentrationen von NBD-PE und Rh-PE bestimmt (siehe Kapitel 7.2).

#### 3.2.6.4 Phosphatbestimmung

Die Quantifizierung der Phospholipide erfolgte durch Bildung eines Molybdophosphatkomplexes der enthaltenen Phosphatgruppe. Dabei wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zunächst wurden je 600  $\mu\text{l}$  der nach 3.2.6.3 hergestellten Butanolproben in Reagenzgläser überführt. Das Butanol wurde bei 60 °C im Wasserbad unter einem Stickstoffstrom verdampft. Zu den so entstandenen reinen Lipidfraktionen wurden 400  $\mu\text{l}$  70 % Perchlorsäure und 40  $\mu\text{l}$  65 % Salpetersäure gegeben und vorsichtig gemischt. Die Reagenzgläser wurden in einem Heizblock vorsichtig erhitzt. Die Proben wurden zunächst auf 60 °C angewärmt und anschließend alle 10 min um weitere 10 °C erwärmt, bis eine Temperatur von 160 °C erreicht war. Diese Temperatur wurde 20 min gehalten, und anschließend die Proben auf 200 °C aufgeheizt. Nach 1 h bei 200 °C waren die Proben vollständig aufgeschlossen. Parallel wurde die Phosphatbestimmung mit Standardlösungen (0, 20, 60, 100, 140 und 180 nm) durchgeführt. Nach Abkühlen der klaren Lösungen wurden je 2,4 ml einer 0,44%-igen (w/v) Lösung von Hexa-Ammoniumheptamolybdat-4-hydrat und 2,4 ml einer 2,5%-igen (w/v) Lösung von Fiske-Subbarow Reduktionsreagenz hinzupipettiert und die Reagenzgläser gut gevortext. Nach 10-minütigem Kochen in siedendem Wasser wurden die Reagenzgläser in Eiswasser abgekühlt. Ein Milliliter der Lösungen wurde in Kunststoffküvetten überführt. Die Absorption bei 820 nm wurde am UV/Vis-Spektrometer gegen den Leerwert (0 nm Phosphat) gemessen. Mit Hilfe des Standards wurde eine Kalibrierungsgerade erstellt, die der Quantifizierung der in den Proben enthaltenen Menge an Phosphat bzw. Lipid diene.

#### 3.2.6.5 Proteinbestimmung mit dem Lowry Assay

Die Proteinkonzentration in den MFK-Emulsionen wurde mit einem modifizierten Lowry Assay bestimmt [LOWRY et al., 1951; YU-LI, 2004]. Eine Kalibrierungsgerade wurde mit einem Rinderserumalbumin (BSA) Standard (Applichem, Produktnummer A 1391) hergestellt und diente zur Berechnung der MFKM Proteinkonzentrationen in den Emulsionen. Für den Proteinstandard wurde BSA in MilliQ-Wasser gelöst, die Proteinkonzentration anhand der optischen Dichte bei 279 nm ( $A_{279 \text{ nm}}^{1 \text{ g/l}} = 0,667$ ) bestimmt und anschließend die BSA Konzentration auf 1 mg/ml eingestellt.

Als MFKM Proteinmengen wurde ca. 20-80  $\mu\text{g}$  Protein eingesetzt. Von jeder Emulsionsprobe wurden zwei verschiedene Proteinmengen gemessen. Dabei wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Der Lowry Assay wurde nach dem Arbeitsprotokoll von YU-LI durchgeführt. Nach der Entwicklung der Färbung nach 40 min wurden die Lipide durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Butanol von der wässrigen Phase extrahiert. Die Eppendorfreaktionsgefäße wurden dazu bei 37 °C und

1400 rpm 5 min geschüttelt. Hierdurch wurden Streu- und Absorptionseffekte der Fetttropfen während der Absorptionsmessungen verhindert. Nach kurzer Zentrifugation (13.000 rpm) wurde die Absorption der wässrigen Phasen in 1 ml Kunststoffküvetten am UV/Vis-Spektrometer bei 750 nm gemessen. Die Mittelwerte aus den Doppelbestimmungen und der zweifachen Proteinbestimmung pro Probe wurden gebildet und daraus die Proteinkonzentration der Emulsionen berechnet.

#### 3.2.6.6 SDS-PAGE

Die einzelnen MFK Membranproteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt [YE et al., 2004a; YE et al., 2002]. MFK-Proben wurden bei 15.000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Die entstandene Fettschicht wurde abgenommen und mit 0,5 M Tris-HCL Puffer (pH 6.8) mit 10 % Glycerin, 15 % SDS und 0,05 % Bromphenolblau suspendiert. Natriumdodecylsulfat (SDS) ersetzt dabei die MFKM-Proteine an der Öl-Wasser-Grenzfläche und stabilisiert die Proteinmoleküle in einer gestreckten Konformation [DE FEIJTER et al., 1987]. Die Proben wurden im Wasserbad 5 min bei 42 °C erwärmt, gut durchmischt und anschließend für reduzierende Bedingungen mit 5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt. Nach wiederholtem Durchmischen wurden die Proben 5 min in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Um das Fett zu entfernen, wurden die Proben ein weiteres Mal zentrifugiert (2500 x g, 20 min, 4 °C). Mit einem Spatel wurden die gebildeten Fettschichten entfernt und die im Probenpuffer gelösten MFK Membranproteine wurden mit einer Hamiltonspritze auf ein SDS-Gel geladen. Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von LAEMMLI [1970] durchgeführt. 15; 12,5; 10 und 8%igen Acrylamid-Gele wurden in einem vertikalen Elektrophorese System gegossen und bei 180-200 V gefahren.

Die Proteinbanden wurden mit einer Lösung von Coomassieblau R-250 fixiert und über Nacht angefärbt. Nach der Entfärbung (3 x 30 min mit 40 % Methanol und 10 % Essigsäure und 1 x 15 min mit dest. H<sub>2</sub>O) wurden die Gele mit einem Densitometer eingescannt.

Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte durch einen Proteinstandard (Albumin aus Hühnereiweiß, Sigma Produktnummer A 5503). Unterschiedliche Mengen des Standards (0,45-2,25  $\mu$ g) wurden auf die SDS-Gele aufgetragen, um Standardkurven zu erhalten. Es wurde ein linearer Zusammenhang ( $R^2 = 0.99$ ) zwischen den integrierten Peakflächen und den Probenkonzentrationen verwendet, um die Menge der MFKM-Proteine in den Proben zu quantifizieren.

#### 3.2.6.7 In-Gel-Verdau und Bestimmung der Peptide per Massenspektrometer

Zur Identifikation der Proteinbanden der SDS-Gele wurden einzelne Proteinbanden aus einem mit einer kollidalen Coomassiefärbung gefärbten SDS-Gel herausgeschnitten und die Proteine im Gel verdaut. Die Gelstücke wurden dazu mit 50 % Acetonitril entfärbt, getrocknet, mit Trypsinlösung (50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 12,5 ng/ $\mu$ l Trypsin (Promega, Mannheim, Deutschland)) rehydriert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die gewonnenen Peptide wurden mit Acetonitril aus den Stücken extrahiert, die Extrakte in der Vakuumzentrifuge getrocknet, und nach dem Aufnehmen in 0,1 % Ameisensäure über ZipTip (Millipore Corporation) aufgereinigt. Die Proben wurden

anschließend in 50 % Methanol und 1 % Ameisensäure aufgenommen und ins Massenspektrometer eingespritzt [JENSEN et al., 1999]. Die Massenspektren der Peptide wurden am Q-ToF Ultima ESI Massenspektrometer (Waters, UK) im positiven ESI-Modus aufgenommen. Einstellungen am Massenspektrometer wurden wie folgt gewählt: Kapillarspannung 2,5-2,8 kV und Cone-Spannung 80 V. Die Verarbeitung der Daten erfolgte mit MassLynx 4.0 Software (Waters Corporation).

### 3.2.6.8 Größenverteilungsbestimmung der MFK

Die simultane Detektion der FRAUENHOFERschen Beugungsringe bei 750 nm und der Lichtsignale der MIEschen Streuung bei 450 nm, 600 nm und 900 nm mittels Laserbeugungsanalyse ermöglicht eine Messung der Partikeldurchmesser im Bereich von 0,1 bis 900  $\mu\text{m}$  [HINRICHS, 1994].

MFK-Emulsionen wurden vor der Partikelgrößenbestimmung mit dem entsprechenden Verdünnungsmedium (siehe 3.2.4 und 3.2.4.3) vorverdünnt und anschließend mit einer Pipette in das Flüssigmodul des Laserspektroskops gegeben. Die Probenkonzentration in der Messzelle wurde auf 45-55 % eingestellt (gemessen als Trübung). Das Verdünnungsmedium im Partikelmessgerät war gefiltertes (45  $\mu\text{m}$ ), destilliertes Wasser. Die Pumpengeschwindigkeit betrug 29 % der Pumpenleistung. Die Messdauer pro Probe betrug 120 s. Die Messungen wurden in einem klimatisierten Raum ( $20 \pm 1$  °C) durchgeführt ( $n = 1-3$ ).

Für die Berechnung der Partikelgrößenverteilung der MFK über das Modell von MIE ist die Kenntnis der Brechungsindizes der MFK und des Lösungsmittels (dest.  $\text{H}_2\text{O}$ ) notwendig. Der Einfluss der MFK Membran brauchte nach SOMMER [1992, zit. nach HINRICHS, 1994] nicht berücksichtigt zu werden, unter der Voraussetzung, dass die Membrandicke gegenüber dem Fettkugeldurchmesser gering ist. Die Brechungsindizes der MFK konnten nach einer von WALSTRA und JENNES [1984] aufgestellten Gleichung für die im Laserspektroskop verwendeten Wellenlängen berechnet werden (siehe Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Brechungsindizes für Wasser und Milchfett bei 20 °C

Wellenlänge $\lambda$ [nm]	450	600	750	900
Brechungsindex <sup>1</sup> Wasser n [-]	1,342	1,333	1,329	1,326
Brechungsindex Milchfett n [-]	1,471	1,462	1,458	1,455

<sup>1</sup>Nach MICHALSKI et al., 2001 hat 0,1 % SDS keinen signifikanten Einfluss auf den Brechungsindex von Wasser.

## 4 Ergebnisse

Der folgende Ergebnisteil ist in insgesamt vier Kapitel gegliedert. Die Markierung der MFK mit Fluoreszenzfarbstoffen sowie die Bestimmung der Fluoreszenz der mit lipidkonjugierten Fluoreszenzfarbstoffen markierten MFK wird zuerst beschrieben, da dies Voraussetzung für die darauffolgenden Untersuchungen war. Anschließend folgen die Beschreibung und der Aufbau des Messsystems zur Bestimmung der Aggregation und Fusion der MFK. Das dritte Unterkapitel zeigt die Anwendbarkeit des Messsystems zur Untersuchung der Emulsionsstabilität homogenisierter Rahmproben. Im letzten Kapitel wird die emulsionsstabilisierende Eigenschaft der MFKM-Proteine mittels proteolytischer Verdauung der Membranproteine untersucht.

### 4.1 Markierung der MFK mit NBD und Rhodamin

Für die Markierung der MFK mit Fluoreszenzfarbstoffen mussten die an Phosphoethanolamin kovalent gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe NBD und Rhodamin in die Membran von MFK integriert werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Verfahren entwickelt, mit dem aus Rohmilch isolierte MFK mit den Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden können. Um die Integration der Farbstoffe in die Membran der MFK zu überprüfen, wurde die Effizienz des Fluoreszenzresonanzenergietransfers (FRET) zwischen NBD-PE und Rhodamin-PE bestimmt. Hierfür musste nach einer Messmethode gesucht werden, mit der die Fluoreszenz von NBD in der MFKM quantifiziert werden kann. Für die Ermittlung der optimalen Fluoreszenzfarbstoffkonzentration wurden konzentrationsabhängige Untersuchungen durchgeführt. Damit wurde der Einfluss der Konzentration der Farbstoffe NBD und Rhodamin auf den FRET in den MFKM systematisch untersucht.

In den folgenden Unterkapiteln werden die ermittelten Ergebnisse bezüglich der Markierung der MFK, der Bestimmung der Fluoreszenz der MFK sowie des Einbaus der Farbstoffe in die MFKM dargestellt.

#### 4.1.1 Markierung der MFK mit lipidkonjugierten Fluoreszenzfarbstoffen

Die lipidkonjugierten Fluoreszenzfarbstoffe wurden aus Chloroform durch Verdampfen des Lösungsmittels in einem Eppendorfreaktionsgefäß und anschließender Rehydrierung als multilamellare Vesikel in ein wässriges Medium gebracht und mit den isolierten MFK gemischt. Durch 30minütige Inkubation bei 37 °C und einen nachfolgenden Sonifizierungsschritt wurden NBD-PE und Rh-PE in die Membran der MFK eingebaut. Die nicht eingebauten Fluoreszenzlipide wurden von den markierten MFK durch einen darauffolgenden Reinigungsschritt abgetrennt. Abb. 4.1 zeigt die notwendigen Arbeitsschritte für die Markierung der MFKM mit den lipidkonjugierten Fluoreszenzfarbstoffen. Eine detaillierte Beschreibung des Markierungs- und Reinigungsprozesses findet sich im Kapitel 3.2.2.

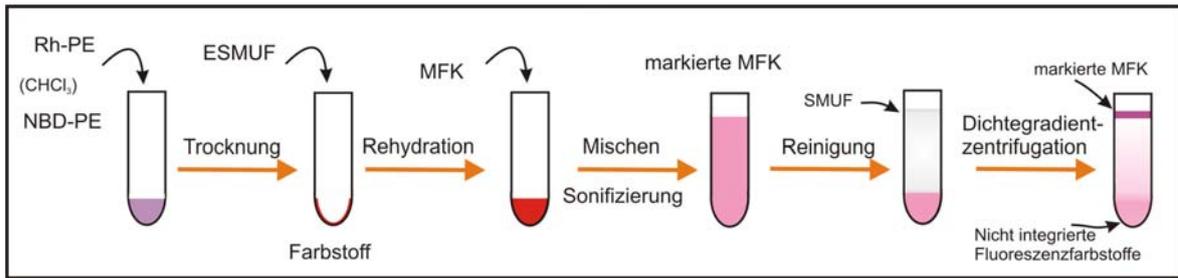


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des Markierungsprozesses der MFKM mit Fluoreszenzfarbstoffen.

Vorversuche zeigten, dass die aufgetrockneten Fluoreszenzfarbstoffe nicht in die wässrige Phase gebracht werden können, wenn im verwendeten Medium freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen vorhanden sind (siehe Abb. 4.2). Deutlich ist in dem linken Eppendorfreaktionsgefäß das aufgetrocknete NBD-PE und Rh-PE zu erkennen, das nicht durch synthetisches Milchultrafiltrat (SMUF) rehydriert werden konnte.

Um die Calciumionen zu komplexieren, wurde als Medium daher SMUF mit 10 mM EDTA verwendet. Mit diesem Medium konnten NBD-PE und Rh-PE in die wässrige Phase suspendiert werden (rechtes Eppendorfreaktionsgefäß Abb. 4.2). Zu den entstandenen Fluoreszenzfarbstoffvesikeln wurden isolierte MFK pipettiert, die ebenfalls in SMUF mit 10 mM EDTA isoliert worden waren. Anschließend wurden die Proben bei 37 °C 30 min inkubiert und darauffolgend mit Ultraschall behandelt. Hierdurch konnten die Farbstoffe in die Membran der MFK eingebracht werden, wie visuell anhand der farbigen Fettschicht nach einer Zentrifugation beobachtet werden konnte. Durch den Reinigungsschritt erfolgte die Abtrennung der nicht eingebauten Fluoreszenzlipide von den markierten MFK und ein Wechsel des Mediums, so dass die MFK nach dem Markierungsprozess wieder in einem milchähnlichen Medium (SMUF) vorlagen. Für eine standardisierte Markierung der MFK mit NBD-PE und Rh-PE musste die Phospholipidkonzentration der MFKM bekannt sein, da diese als Referenz benutzt wird, um die einzusetzende Markerlipidkonzentration festzulegen.

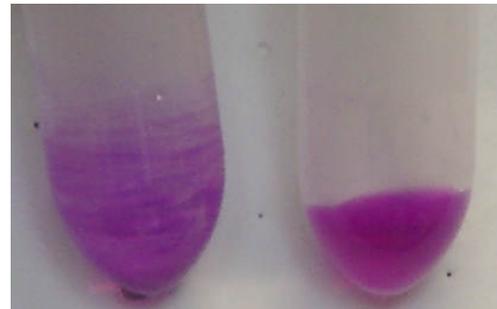


Abb. 4.2: Eppendorfreaktionsgefäße nach dem Rehydrationsprozess. Links Rehydrierung mit SMUF; Rechts mit SMUF mit 10 mM EDTA.

#### Fluoreszenzfarbstoffkonzentration für die Markierung der MFK

Für die Berechnung der einzusetzenden Konzentration der Fluoreszenzlipide für die Markierung von biologischen Membranen wird der sog. Stoffmengenprozent- oder Molprozent-Anteil an Fluoreszenzlipiden, bezogen auf den Gesamtgehalt der Phospholipide der zu markierenden Membran, benutzt. Für die Berechnung der Markerlipidkonzentration muss daher die Konzentration der Phospholipide in der MFKM bekannt sein oder bestimmt werden. BITMAN and WOOD [1990] geben als saisonalen Schwankungsbereich 0,56-1,11 % Phospholipid des Gesamtfettgehalts der Milch an. Aufgrund der Variabilität, die in einem natürlichen System wie der Milch vorhanden ist,

kommt es zu diesen saisonalen Schwankungen der Phospholipidkonzentration in der MFKM. Daher konnte keine auf Literaturwerten basierende allgemein gültige Phospholipidkonzentration für MFK angenommen werden.

Durch eigene Phospholipidbestimmungen von isolierten MFKM wurde ebenfalls eine Variabilität der Phospholipidkonzentration der Membranen der MFK über das gesamte Jahr festgestellt. Als Mittelwert wurde eine Phospholipidkonzentration von  $0,6 \pm 0,05$  % der MFKM vom Gesamtfett der MFK ermittelt. Dieser Mittelwert diente als Referenzwert und wurde für die Berechnung der Menge an NBD-PE und Rh-PE für die Markierung der MFK benutzt. Die eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffkonzentration für die Markierung der MFKM mit NBD- und Rh-PE wurde durch Extraktionen der Lipide aus der MFKM überprüft, dabei wurde eine hohe Korrelation zwischen der berechneten und der erzielten Markerlipidkonzentration festgestellt (siehe Abb. 7.3 in Kapitel 7).

### 4.1.2 Bestimmung der Fluoreszenz der MFK

Zur Bestimmung der Fluoreszenz der markierten MFK wurden zunächst zwei klassische fluoreszenzspektroskopische Messverfahren ausgewählt: Die Fluoreszenzmikroskopie und die Fluoreszenzspektrometrie. Mit dem ersten Verfahren sollte der Einbau der Fluoreszenzfarbstoffe in die MFKM sowie die Fluoreszenz der MFK bestimmt werden, mit dem zweiten Verfahren der FRET zwischen NDB-PE und Rh-PE in der MFKM gemessen werden.

Die Diffusion von NBD-PE und Rh-PE aus den rehydrierten Fluoreszenzfarbstoffvesikeln in die MFKM konnte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops überprüft werden. Abb. 4.3 zeigt MFK, die mit NBD-PE und Rh-PE markiert wurden, wobei NBD mit Licht der Wellenlänge 450-490 nm und Rh mit Licht der Wellenlänge 530-585 nm angeregt worden sind.

In Abb. 4.3 ist anhand der Fluoreszenz der MFK zu erkennen, dass der Farbstoff an die Membran der MFK gebunden und gleichmäßig über die MFKM verteilt ist. Der FRET in der MFKM konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie jedoch nicht nachgewiesen werden, da NBD nicht mit dem vorhandenen Fluoreszenzfiltersatz angeregt und gleichzeitig die Rhodaminfluoreszenz beobachtet werden konnte. Daher konnte die Integration der Fluoreszenzfarbstoffe in die Phospholipiddoppelschicht der MFK mittels der Fluoreszenzmikroskopie nur qualitativ charakterisiert werden. Zusätzlich bleichten die Farbstoffe durch die intensive Bestrahlung der Fluoreszenzlampe innerhalb weniger Sekunden aus, was zu einem Verlust der Emissionsintensität der Fluoreszenzfarbstoffe führte. Somit war es nicht möglich, mit dem verwendeten Fluoreszenzmikroskop eine Quantifizierung und Charakterisierung des Einbaus von NDB- und Rh-PE in die Membran vorzunehmen. Deshalb sollte die Markierung der MFK und der FRET-Effekt der in die Membran eingebauten Fluoreszenzfarbstoffe spektrometrisch überprüft werden. Ziel dabei war, die Übertragung der Energie von NBD-Molekülen nach deren Anregung bei 460 nm auf Rhodamin-

moleküle (Emission bei 590 nm) in der Membran der MFK nachzuweisen und eine Verminderung der Donorfluoreszenz aufzuzeigen.

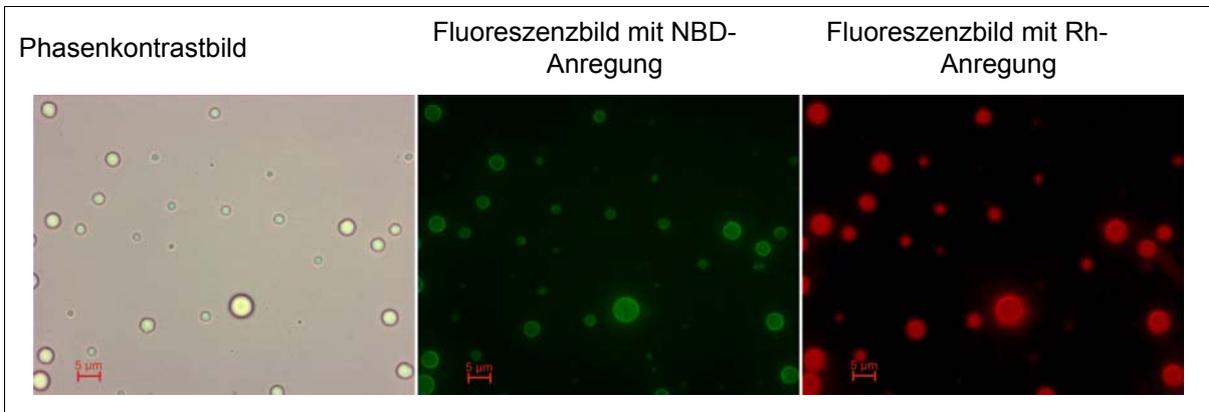


Abb. 4.3: Mit NBD-PE und Rh-PE markierte MFK bei Anregungswellenlängen von 450-490 nm für NBD-PE bzw. von 530-585 nm für Rh-PE (1300-fache Vergrößerung).

Abb. 4.4 zeigt die Fluoreszenzspektren von unmarkierten MFK, NBD-MFK und FRET-MFK (NBD-PE plus Rh-PE markiert MFK) mit 1,0 mol-% Farbstoff sowie von synthetischen Vergleichsliposomen mit 0,8 mol-% NBD-PE und Rh-PE, die als Referenzprobe dienten. Unmarkierte MFK zeigen eine rel. hohe Abstrahlung bei 400-440 nm, wenn sie mit einer Wellenlänge von 460 nm bestrahlt werden. Diese Strahlung wird vermutlich durch das Streulicht der MFK verursacht.

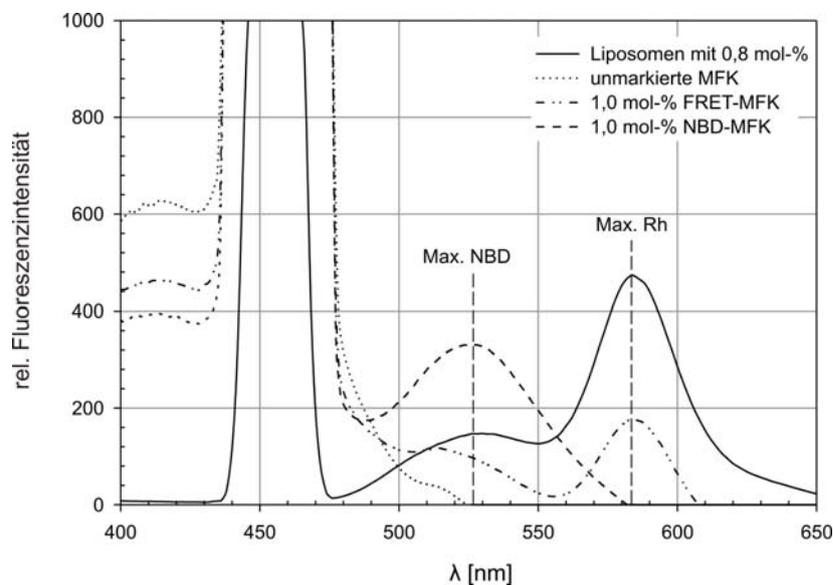


Abb. 4.4: Fluoreszenzspektren von unmarkierten MFK, FRET-MFK und NBD-MFK mit 1,0 mol-% Fluoreszenzfarbstoff und Liposomen mit 0,8 mol-% NBD- und Rh-PE nach Anregung bei 460 nm.

Die eingestrahlte Wellenlänge wird von den MFK stark reflektiert, wie durch den breiten Anregungspeak und die hohe Fluoreszenz bei 400-440 nm im Fluoreszenzspektrum zu erkennen

ist. Diese Emission zeigt (400-440 nm) eine starke Streuung, obwohl die Verdünnung der MFK-Proben gleich war.

Durch eine Bestrahlung bei 460 nm wird NBD in der MFKM angeregt und fluoresziert mit einem Maximum von ca. 530 nm (nur NBD-MFK). Wird zusätzlich Rh-PE in die Membran eingebaut (FRET-MFK), tritt ein deutliches Quenching auf, bei dem NBD seine Fluoreszenz strahlungslos auf Rhodamin überträgt. Dieses emittiert in der MFKM maximal bei ca. 582 nm. Aus dem Auftreten von FRET kann geschlussfolgert werden, dass die Lipide so in der Membran orientiert und integriert sind, dass ein FRET zwischen NBD und Rhodamin stattfinden kann. Auffällig am Fluoreszenzspektrum der FRET-MFK ist jedoch die stark abfallende Schulter ab ca. 515 nm im Vergleich zu dem Spektrum der synthetischen Vergleichsliposomen. Hierdurch kann kein Maximum der NBD-Fluoreszenz bei ca. 530 nm im Spektrum der FRET-MFK ermittelt werden, so dass eine genaue Quantifizierung der NBD-Fluoreszenz der MFKM mit einem Fluoreszenzspektrometer nicht möglich war. Dies ist jedoch Voraussetzung, um die Effizienz des Energietransfers zwischen NBD-PE und Rh-PE und damit die Membranintegration der Moleküle charakterisieren zu können. Für die Bestimmung der Membranfusion mit einem Spektralfluorimeter muss ebenfalls die NBD-Fluoreszenz exakt zeitaufgelöst bestimmbar sein, da durch die emittierte Strahlung von NBD der Aggregations- und Fusionsprozess quantifiziert wird [HOEKSTRA und DÜZGÜNES, 1993]. Folglich musste nach anderen messtechnischen Möglichkeiten gesucht werden, um die NBD-Fluoreszenz von MFK bestimmen zu können.

### **4.1.3 Quantifizierung der Fluoreszenz der MFK mittels der Durchflusszytometrie**

Für die Quantifizierung der Fluoreszenz der MFK wurde nach einer Möglichkeit der Erfassung der Fluoreszenz von Partikeln gesucht. Eine mögliche Methode stellt die Durchflusszytometrie dar. Dieses Messverfahren wird verwendet, um die Fluoreszenz von Partikeln und Zellen zu erfassen. Daher könnte sich die Durchflusszytometrie auch für MFK als geeignetes Messverfahren herausstellen, mit dem die auftretenden optischen Probleme der Fluoreszenzmessung in dispersen Systemen, wie starke Streu- und Absorptionseffekte, umgangen werden können.

Nach der in 3.2.2 beschriebenen Methode wurden MFK mit 2,8 mol-% NBD-PE, Rh-PE bzw. NBD-PE puls Rh-PE markiert und die Fluoreszenz der MFK im Vergleich zu den unmarkierten MFK mit dem Durchflusszytometer bestimmt. Abb. 4.5 zeigt die graphische Darstellung der vier unterschiedlich gefärbten MFK-Populationen in Abhängigkeit der rel. Rhodamin- bzw. NBD-Fluoreszenz. Die Ergebnisse der vier Einzelmessungen von unmarkierten, NBD-, Rh- und FRET-markierten MFK wurden in Abb. 4.5 zusammen dargestellt. Wie zu sehen ist, kann man den gefärbten MFK definierte Bereiche (Gates) im rel. Fluoreszenzdiagramm zuordnen, wenn die rel. Rhodamin-Fluoreszenz gegenüber der rel. NBD-Fluoreszenz der MFK aufgetragen wird. Die Einteilung der MFK erfolgt dann nach dem Verhältnis der Signale (rel. NBD- und Rh-Fluoreszenz) in das entsprechende Gate.

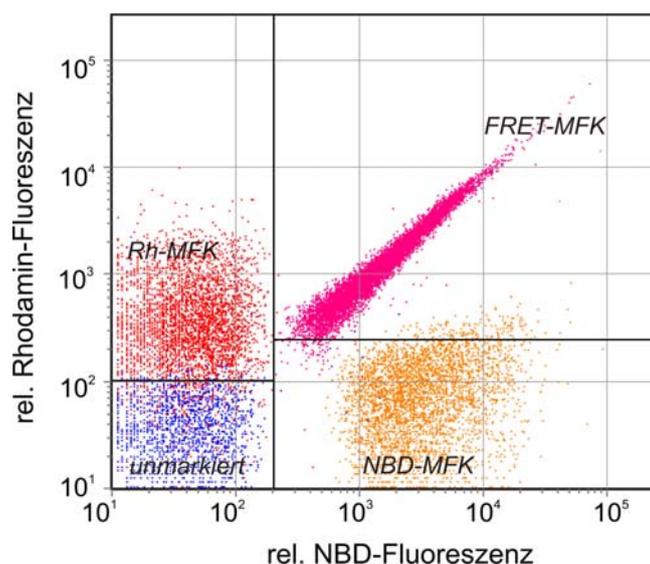


Abb. 4.5: Graphische Darstellung der rel. Rhodamin-Fluoreszenz in Abhängigkeit der rel. NBD-Fluoreszenz für vier unterschiedliche MFK-Populationen. Pro MFK-Population sind 5000 Ereignisse dargestellt.

Die Differenz in der Fluoreszenz der MFK zwischen der NBD-Population und der FRET-Population ist bei einer Farbstoffkonzentration von 2.8 mol% rel. groß, so dass diese von unmarkierten MFK unterschieden werden können. Die Population der Rh-MFK und der unmarkierten MFK überlappen sich leicht, was für den Aufbau des Messsystems unerheblich war, da diese beiden Populationen nicht miteinander gemischt werden sollten, um die Interaktion der MFK zu bestimmen.

Mit der entwickelten Anfärbemethode konnten 98-99% der MFK homogen mit NBD-PE und Rh-PE markiert werden (siehe Anhang 7.4). Durch diese hohe Markierungseffizienz wird gewährleistet, dass eine Interaktion zwischen den Fettkugeln anhand der resultierenden Fluoreszenzveränderungen erfasst wird.

Die in Abb. 4.5 dargestellten Ergebnisse wurde mit der Software FCS Express Version 3 ausgewertet. Hierdurch wurde der Medianwert der rel. NBD-Fluoreszenz (siehe Tab. 4.1) der verschiedenen MKF-Populationen, der für die Berechnung des FRET-Effekts benötigt wird, bestimmt. Durch diese Quantifizierung der NBD-Fluoreszenz mittels des Durchflusscytometers kann, wie im folgenden Kapitel gezeigt wird, der Einbau der Fluoreszenzlipide in die MFKM charakterisiert werden.

Tab. 4.1: Medianwert der rel. NBD-Fluoreszenz der verschiedenen Gates in Abb. 4.5

Gate	<i>Unmarkierte</i>	<i>NBD-MFK</i>	<i>Rh-MFK</i>	<i>FRET-MFK</i>
Medianwert der rel. NBD-F. ( $\lambda = 530 \text{ nm}$ )	25,08	5106,29	26,32	2074,29

Mit der durchflusscytometrischen Fluoreszenzmessung der MFK wurden die optischen Probleme, die bei der Bestimmung von Fluoreszenzen in konzentrierten dispersen Systemen auftreten,

eliminiert. Die hohe Verdünnung der Proben und die Vereinzelung der MFK im Messgerät ermöglichen die Quantifizierung der Fluoreszenz der MFK, so dass im folgenden ausschließlich die Durchflusszytometrie für die Fluoreszenzmessungen verwendet wurde.

#### 4.1.4 Bestimmung des FRET-Effekts in der MFKM

Um den Einbau der Farbstoffmoleküle in die Membran der MFK zu überprüfen, wurde die Effizienz des Energieübertrags beim FRET in der Membran der MFK bestimmt. Nach der Förster-Gleichung (1.2) ist der FRET mit der 6. Potenz vom Abstand zwischen Donor (NBD) und Akzeptor (Rhodamin) abhängig und reagiert somit sehr sensitiv auf Veränderung der Distanz zwischen den Fluorophoren. Bei einem Einbau der Farbstoffe in die Membran der MFK muss eine Abnahme des FRET-Effektes beobachtet werden, da die rehydrierten Farbstoffe in den Fluoreszenzfarbstoffvesikeln zunächst dicht gepackt sind und somit einen hohen FRET (geringer Abstand zwischen Donor und Akzeptor) aufweisen. „Verdünnen“ sich nun die Farbstoffe, indem sie sich in die Membran der MFK einbauen, nimmt der FRET-Effekt ab, da sich der Abstand zwischen NBD und Rhodamin vergrößert.

Da der molekulare Abstand  $R$  zwischen Donor und Akzeptor in der Praxis nicht bekannt ist, wurde die Effizienz des Energieübertrags ( $E$ ) über die reduzierte Donorfluoreszenz bestimmt (Gleichung (4.1)). Hierbei wurde mit dem Durchflusszytometer der Medianwert (berechnet aus 10.000 Messereignissen einer Probe) der NBD-Fluoreszenz von markierten MFK sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit des Akzeptors ermittelt. Damit waren alle Gleichungsgrößen bekannt und  $E$  konnte nach (4.1) berechnet werden.

$$E = 1 - \frac{\text{rel. NBD-Fluoreszenz der MFK}_{\text{mit Rh-PE}}}{\text{rel. NBD-Fluoreszenz der MFK}_{\text{ohne Rh-PE}}} \quad (4.1)$$

Für die systematische Untersuchung der Integration der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe in die MFKM wurden isolierte MFK nur mit NBD oder mit beiden Fluoreszenzfarbstoffen in einer Konzentration von 0,8-3,8 mol-% gemischt und entweder auf Eis gestellt oder durch den Markierungsprozess in die MFKM integriert. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur der MFKM bei ca. 8-18,3 °C [APPELL et al., 1982; DUFOUR et al., 1999; WANINGE et al., 2003] ist die MFKM gefroren, so dass die an PE gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe nicht in die Membran diffundieren können. In diesem Zustand kann kein „Verdünnen“ der Farbstoffe durch einen Einbau in die Membran stattfinden, so dass  $E$  Werte von nahezu 1 aufweisen muss. In Abb. 4.6 ist die Abhängigkeit der Effizienz des Energietransfers von der verwendeten nominalen Farbstoffkonzentration dargestellt.

Zunächst wird deutlich, dass der Energietransfer über die gesamte Farbstoffkonzentration konstant hoch ist, wenn kein Einbau der Farbstoffmoleküle in die Membran erfolgt (die Proben wurden mit der rehydrierten Farbstofflösung gemischt und dann direkt auf Eis gestellt). Bei 0 °C ist die Membran gefroren, daher konnten die Farbstoffe nicht einbaut werden und sich somit auch nicht

„verdünnen“. Interessant ist jedoch, dass die MFKM mit NBD-PE und Rh-PE markiert werden konnte, obwohl die Membran gefroren war. Anscheinend gibt es auf der erstarrten nativen MFK genügend hydrophobe Bereiche, an welche die Fettsäureketten von PE binden können, bzw. scheinen die hydrierten Farbstoffvesikel mit der Phospholipiddoppelschicht der MFK zu interagieren. Eine signifikante Verdünnung der Farbstoffe in die Membranstruktur der MFK konnte aufgrund der starren Phospholipiddoppelschicht dagegen nicht erfolgen.

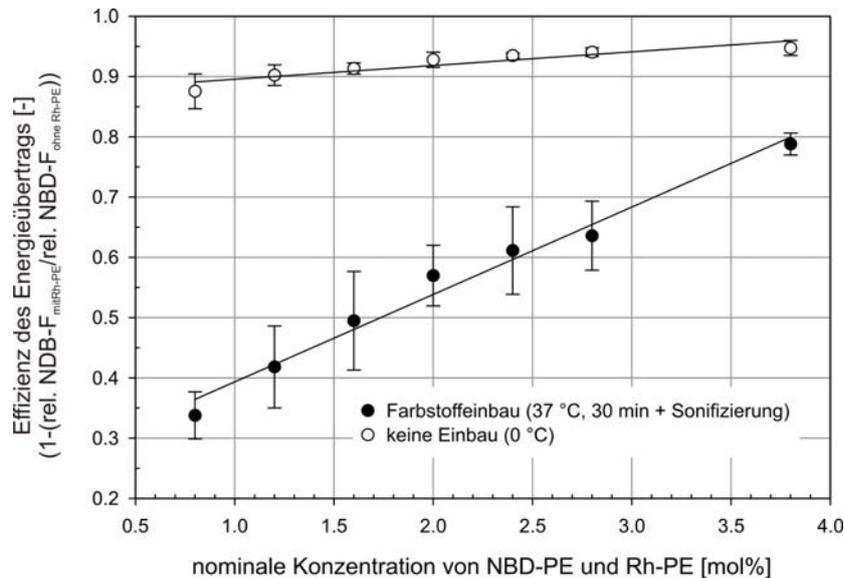


Abb. 4.6: Abhängigkeit der Effizienz des Energietransfers von NBD-PE zu Rh-PE in Abhängigkeit der nominalen Farbstoffkonzentration (mit und ohne Einbau der Moleküle in die MFKM). Messpunkte stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dar ( $n = 2-4$  unabhängige Messungen).

Wenn ein Einbau von NBD-PE und Rh-PE bei 37 °C erfolgt, korreliert die Farbstoffkonzentration in der MFKM mit dem Energietransfer zwischen NBD-PE und Rh-PE. Mit der Zunahme der Farbstoffkonzentration kann eine Zunahme des Energietransfers nach einem Einbau der Moleküle in die Membran beobachtet werden. Bei einer höheren Konzentration von NBD-PE und Rhodamin-PE in der MFKM nimmt der FRET zu, weil der molekulare Abstand zwischen Donor und Akzeptor kleiner wird. Wie im Kapitel 5.1 diskutiert wird, kann hieraus geschlossen werden, dass mit der entwickelten Methode ein Einbau der Farbstoffe in die MFKM Phospholipiddoppelschicht erfolgt. Jedoch ist unbekannt, welche Konzentration von Markerlipiden für die Bestimmung der Aggregation und Fusion von MFK mittels des reduzierten FRETs optimal ist, und wie die Reduzierung des FRET-Effektes kinetisch mit dem Durchflussscytometer erfasst werden kann.

#### Theoretische Fluoreszenzveränderungen der MFK bei der Fusion

Die Zunahme der NBD-Fluoreszenz bzw. die Abnahme des FRETs muss zeitabhängig mit der verwendeten Fluoreszenzmessmethode gemessen werden können. Statische Methoden, wie mittels Gleichung (4.1), welche die Veränderung der FRET-Effizienz in Abhängigkeit der Fluorophorkonzentration bestimmen, können aufgrund der dynamischen und damit unbekanntem Veränder-

ungen der Markerlipidkonzentration während der Aggregation und Fusion der MFK bei kinetischen Messungen nicht verwendet werden. Daher musste untersucht werden, wie unterschiedliche NBD-PE- und Rh-PE-Konzentrationen in der MFKM das Fluoreszenzsignal der MFK verändern. Hieraus lassen sich dynamische Veränderungen der FRETs bei der Fusion abschätzen.

MFK wurden mit 0,8-3,8 mol-% NBD-PE und Rh-PE markiert und die Fluoreszenz mittels Durchflussscytometer bestimmt. Die Fluoreszenzintensität der FRET-MFK zeigt, wie aus Abb. 4.5 zu erkennen ist (siehe Kapitel 4.1.3), eine Korrelation zwischen der rel. Rhodamin-Fluoreszenz und der rel. NBD-Fluoreszenz. Dieser Zusammenhang wurde genutzt, um die Veränderung der FRET-Effizienz bei unterschiedlichen NBD-PE- und Rh-PE-Konzentrationen aber gleichbleibendem Verhältnis von NBD- zu Rh-PE anhand von durchflussscytometrischen Messungen zu zeigen. Da das Verhältnis zwischen Rh-Fluoreszenz und NBD-Fluoreszenz ein indirektes Maß für den FRET-Effekt ist, wurden die Regressionsgraden für die unterschiedlich markierten MFK berechnet und im Fluoreszenzdiagramm dargestellt.

Abb. 4.7 zeigt die Fluoreszenzwerte von MFK, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Markerlipiden (NBD-PE plus Rh-PE) markiert wurden. Wie in Abb. 4.7 zu sehen ist, nimmt die Steigung der Regressionsgeraden mit der Konzentration der Markerlipide in der Membran der MFK zu. Je mehr NBD-PE und Rh-PE in die Membran der MFK eingebaut wurden, desto stärker wurde der FRET-Effekt, so dass der Anteil der rel. Rh-Fluoreszenz zur rel. NBD-Fluoreszenz zunimmt. Daher wird die Steigung der Regression trotz gleichbleibendem Fluoreszenzfarbstoffverhältnis größer. Um die berechnete Effizienz des Energieübertrags ( $E$ ) der jeweiligen Markerlipidkonzentration mit der jeweiligen Steigung der Regressionsgeraden zu korrelieren, wurde  $E$  gegenüber der Steigung der Regressionsgeraden aufgetragen (Abb. 4.8). Es ist zu erkennen, dass die Steigung der Geraden im Fluoreszenzdiagramm mit der berechneten Effizienz des Energieübertrags von NBD-PE auf Rh-PE in den MFK-Membranen korreliert. Somit ist die Steigung der Geraden ein direktes Maß für die Effizienz des Energieübertrags, d.h. nimmt die Steigung der Regressionsgeraden der FRET-MFK im Verlauf einer Messung am Durchflussscytometer ab, muss eine Reduzierung der Konzentration von NBD-PE und Rh-PE durch einen Aggregations- und Fusionsprozess vorausgegangen sein. Damit kann der FRET während der Messungen am Durchflussscytometer verfolgt werden. In den folgenden Aggregations- und Fusionsexperimenten konnte somit die Fusion der MFK durch die Reduzierung der Geradensteigung bewiesen werden. Anhand der dargestellten experimentellen Daten wurde als Farbstoffstandardkonzentration zur Markierung der MFK 2,8 mol-% ausgewählt. Bei dieser Konzentration kann bei den verwendeten Messparametern am Durchflussscytometer ein großer Unterschied in der Fluoreszenz zwischen markierten und unmarkierten MFK bestimmt werden. Alle folgenden Experimente wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit einer Farbstoffkonzentration von 2,8 mol-% durchgeführt.

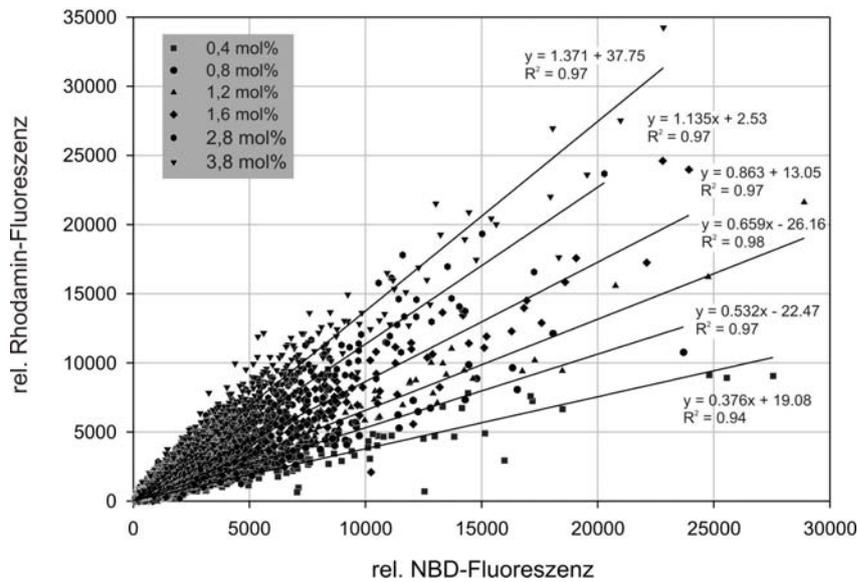


Abb. 4.7: Fluoreszenzdiagramm von FRET-MFK mit unterschiedlichen nominalen Konzentrationen von sowohl NBD-PE als auch Rh-PE (für jede Konzentration sind 5000 Ereignisse, die sich teilweise überlagern, aufgetragen). Die angegebenen Markerlipidkonzentrationen gelten sowohl für NBD- als auch für Rh-PE. Die jeweiligen linearen Regressionsgeraden zu jeder Konzentration sind dargestellt.

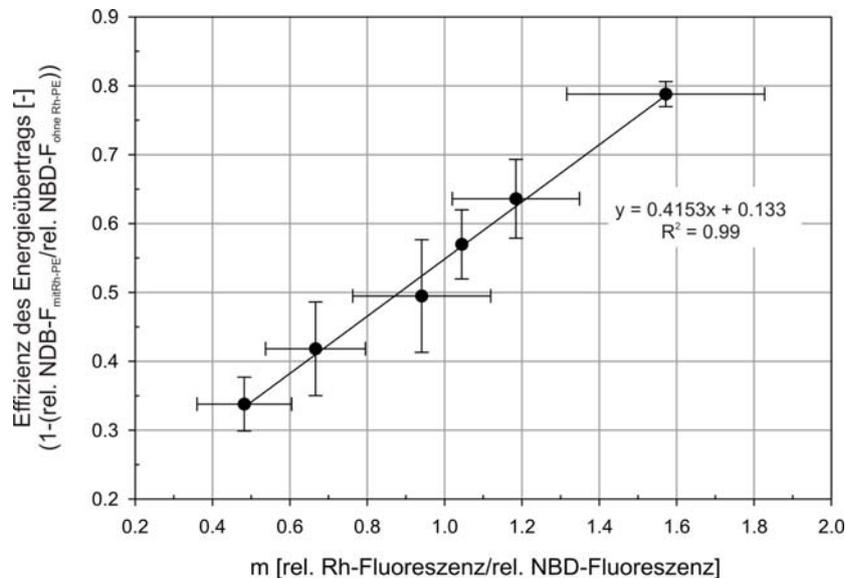


Abb. 4.8: Graphische Darstellung der Abhängigkeit der Steigung der linearen Regressionsgeraden ( $R^2 \geq 0,95$ ) im Fluoreszenzdiagramm von der Effizienz des Energieübertrags von NBD-PE zu Rh-PE bei nominalen Konzentrationen von 0,8-3,8 mol%. Messpunkte stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dar ( $n = 3$  unabhängige Messungen).

Da die Voraussetzung der Markierung der MFK mit Fluoreszenzfarbstoffen erfüllt werden konnte, wurde aufbauend auf den erhaltenen Ergebnissen in den folgenden Experimenten ein Zusammenhang zwischen der Aggregation und Fusion der MFK und der Veränderung der Fluoreszenz der MFK bei diesen Prozessen untersucht.

## 4.2 Entwicklung eines Aggregations- und Fusionsassay für MFK

Membranebundene Fluoreszenzfarbstoffe können dazu genutzt werden, um die Aggregation und Fusion von Phospholipiddoppelmembranen zu untersuchen [DÜZGÜNES et al., 1987; HOFMANN et al., 2004; STRUCK et al., 1981]. Basierend auf dem Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) wird die Interaktion der Membranen anhand der Abnahme des FRETs durch die Abstandsvergrößerung zwischen Donorfarbstoff und Akzeptorfarbstoff bei einem Fusionsereignis bestimmt. Dies ermöglicht detaillierte kinetische Studien, die es erlauben, Mechanismen und Ursachen der Aggregation und Fusion biologischer Systeme zu evaluieren [HOEKSTRA und DÜZGÜNES, 1993]. Als Techniken stehen dazu der Mixing Assay und der Diluting Assay zur Verfügung. Ziel dieser Arbeit war es, die genannten Methoden auf das System der MFK zu übertragen und die Aggregation und Fusion von MFK mit diesen zu verfolgen. In den folgenden Unterkapiteln werden die Ergebnisse der Bestimmung der Aggregation und Fusion von MFK durch fluoreszenzmarkierte Lipide dargestellt.

### 4.2.1 Durchmischung der MFKM bei der Fusion der MFK

Um die Fusion der MFK mittels FRET erfassen zu können, muss vorausgesetzt werden, dass sich die Lipide der Membran bei der Fusion vermischen und damit die Verdünnung der fluoreszenzmarkierten Lipide gewährleistet ist. Diese Voraussetzung musste im Fall der MFK überprüft werden, da die Membran der MFK wesentlich komplexer aufgebaut ist als diejenige synthetischer Membransysteme, wie z.B. Liposomen, bei denen FRET üblicherweise als Werkzeug benutzt wird, um die Membranaggregation und -fusion zu untersuchen. Bisherige in der Literatur beschriebene Untersuchungen bestätigen zwar den Lipiddoppelschichtcharakter der MFKM, jedoch wird vermutet, dass die äußere MFKM und der hydrophobe Lipidkern durch ein Proteinnetzwerk, bestehend aus BTN-Dimeren oder von über Disulfidbrücken verknüpften BTN- und XDH-Aggregaten, zusammengehalten wird [MATHER und KEENAN, 1998; ROBENEK et al., 2006]. Fraglich war daher, ob eine derart stabilisierte Phospholipidmembran noch den Charakter einer fluiden Membran hat und FRET als Werkzeug für die Bestimmung der Membranvermischung genutzt werden kann.

Zur Überprüfung der Vermischung der Lipidmembranen der MFK bei einer Fusion wurde ein sog. Mixing Assay durchgeführt. Ziel war es, damit die Verteilung der Farbstoffe in der Membran der MFK bei Verschmelzung zweier unterschiedlich markierter MFK zu visualisieren. Zu diesem Zweck wurden MFK entweder mit NBD-PE oder mit Rh-PE markiert, die beiden Populationen 1:1 gemischt, die Interaktion durch  $\text{Ca}^{2+}$  initiiert und mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen beobachtet. Um die Diffusion der Farbstoffe in der Membran der MFK anhand von Hemifusionsereignissen, bei denen nur die äußeren Membranen der MFK miteinander verschmelzen, während die inneren Phospholipidmembranen und die Fettkerne noch voneinander getrennt vorliegen, beobachten zu können, wurde ein Teil der Proben 5 Minuten nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe (Inkubation

erfolgte bei 37 °C) mit 35 mM EDTA-Lösung (pH 6,5) verdünnt. Hierdurch wurden durch Calciumbrücken zusammengehaltene MFK-Aggregate zerstört, so dass nur vollständige Fusionsereignisse sowie über hydrophobe Wechselwirkungen der Phospholipidmembranen stabilisierte Hemifusionsereignisse erhalten blieben.

Abb. 4.9 zeigt die Aggregation und Fusion der mit NBD oder Rhodamin angefärbten MFK anhand von Phasenkontrast- und Fluoreszenzbildern. Sehr deutlich ist anhand der Aufnahmen in Abb. 4.9 der Aggregations- bzw. Fusionsprozess der MFK zu erkennen.

Wurden NBD bzw. Rhodamin markierte MFK ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe gemischt (Abb. 4.9 A) und das Phasenkontrastbild mit den zwei Fluoreszenzbildern verglichen, lagen die verschieden gefärbten MFK vereinzelt vor.

Wurden zu der Mischung von NBD- und Rh-MFK Calciumionen gegeben, entstanden innerhalb von 5 min Aggregate (Abb. 4.9 B, schwarze Pfeile). Weiterhin traten MFK auf, die bei beiden Wellenlängen fluoreszierten, so dass sie nur durch eine Fusion von NBD-MFK mit Rh-MFK entstanden sein konnten (Abb. 4.9 B, weiße Sterne). Fusionsereignisse, die durch Fusion gleichmarkierter MFK entstanden, konnten mit dieser Methode nicht erfasst werden.

Wurde dieselbe Probe zunächst mit 35 mM EDTA 1:1 vorverdünnt, bevor die Probe mit SMUF verdünnt wurde, zerfielen die über Calciumbrücken gebildeten MFK-Aggregate, und es blieben nur solche Aggregate übrig, die bereits über hydrophobe Wechselwirkungen der MFKM stabilisiert wurden. Weiterhin konnten durch die EDTA-Verdünnung vollständige Fusionsereignisse beobachtet werden (Abb. 4.9 C, schwarze Sterne). Durch die Hemifusionsereignisse (Abb. 4.9 C und Abb. 4.9 B, weiße Pfeile) konnte gezeigt werden, dass eine Hemifusion bereits zu einer Vermischung und damit Verdünnung der Farbstoffe in den äußeren Membranen der MFK führt. Darüber hinaus konnte verdeutlicht werden, dass der Fusionsvorgang der MFKM den Zustand der Hemifusion durchläuft. In diesem Zustand können Phospholipidmoleküle von der äußeren Membran der einen MFK in die Membran der anderen Fettkugel diffundieren. Wie später diskutiert wird (Kapitel 5.2), folgt daraus, dass die Phospholipiddoppelschicht der Fettkugelmembran nicht starr ist. Stattdessen scheint die Membran in sich dynamisch zu sein und auf dem inneren Fettkern zu „schwimmen“. Die Phospholipide befinden sich, wie auch in anderen biologischen Membranen, je nach Temperatur in einem flüssig-kristallinen Phasenzustand.

Mit fluoreszenzmarkierten MFK konnte eine Aggregation und Fusion in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen beobachtet werden. Jedoch konnte mit Hilfe dieser Methode keine Quantifizierung des Ausmaßes der Aggregation und Fusion unternommen werden, da, wie schon unter 4.1.2 beschrieben, die Farbstoffe lichtempfindlich sind und die NBD- und Rh-Fluoreszenz der MFK durch die Anregung am Fluoreszenzmikroskop relativ schnell photogeleicht wird. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden deshalb kinetische Messungen der Destabilisierung von MFK durch Calciumchlorid durchgeführt und die Veränderung der Fluoreszenz der MFK bestimmt.

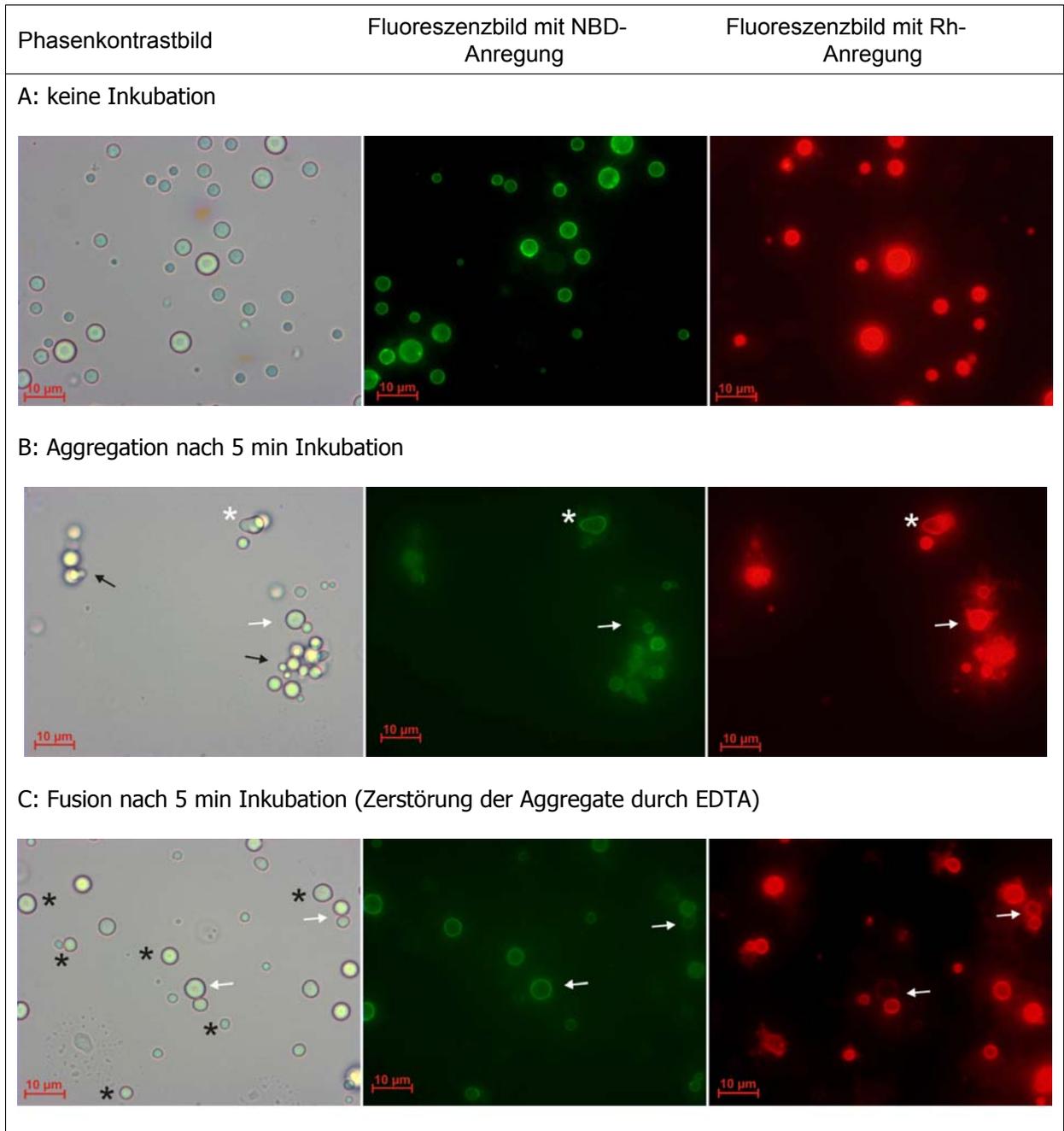


Abb. 4.9: Phasenkontrastbilder und Fluoreszenzbilder mit NBD- bzw. Rhodaminanregung von MFK im Mixing Assay. (A) Mit SMUF verdünnte Mischung von NBD-MFK mit Rh-MFK 1:1 (ohne Inkubation). (B) Mit SMUF verdünnte Probe nach 5 min Inkubation (Aggregate [schwarze Pfeile auf dem Phasenkontrastbild] und fusionierte MFK sind sichtbar [weiße Sterne]). (C) 1:1 mit 35 mM EDTA und anschließend mit SMUF verdünnte Probe nach 5 min Inkubation (fusionierte MFK sind mit schwarzen Sternen hervorgehoben). Weiße Pfeile zeigen Hemifusionsereignisse, bei denen eine Durchmischung der Farbstoffe der unterschiedlich gefärbten MFK zu erkennen ist.

#### 4.2.2 Quantifizierung der Aggregation und Fusion von MFK mittels des Mixing Assays

Wie bereits gezeigt werden konnte (Kapitel 4.1.3), ist die Durchflusscytometrie eine geeignete quantitative Methode, um die Anzahl und die optischen Eigenschaften von MFK zu bestimmen. Daher kann dieses Messsystem eingesetzt werden, um anhand der Fluoreszenz der MFK kinetische Untersuchungen zur Aggregation und Fusion von MFK durchzuführen. Um die im Fluoreszenzmikroskop beobachteten Ergebnisse zu quantifizieren, wurde zunächst ein sog. Mixing Assay durchgeführt, bei dem zwei unterschiedlich markierte MFK-Populationen miteinander gemischt wurden und anschließend die Interaktion der MFK mittels Zugabe von Calciumionen induziert wurde. Zur Unterscheidung von Aggregation und Fusion wurden zwei Versuchsansätze durchgeführt.

Zunächst wurden die Proben nur mit SMUF verdünnt, die Interaktion durch  $\text{Ca}^{2+}$  initiiert und die Fluoreszenz und die Anzahl der MFK mit dem Durchflusscytometer in Abhängigkeit der Inkubationszeit bestimmt. Die durch diesen Versuchsansatz gewonnenen Daten geben die Aggregation und/oder Fusion der MFK wieder.

Die zweite Versuchsreihe wurde genauso durchgeführt, jedoch wurden die Proben vor der Verdünnung mit SMUF mit 35 mM EDTA vorverdünnt (1:10 - 1:20). Hierdurch wurde die irreversible Hemifusion und Fusion der MFK gemessen.

Zur Messung der  $\text{Ca}^{2+}$  unabhängigen Fusion von MFK bzw. dem Austausch von Rh-PE und NBD-PE durch Trefferereignisse von unterschiedlich markierten MFK ohne Aggregations- bzw. Fusionsereignisse wurde zur Mischung von NBD- und RH-MFK nur SMUF anstatt von  $\text{Ca}^{2+}$  gegeben, die Proben bei 37 °C inkubiert und die Fluoreszenz der MFK zeitabhängig ermittelt.

Die gewonnenen Ergebnisse werden zunächst anhand von repräsentativen Fluoreszenzdiagrammen dargestellt, um die beobachteten Veränderungen der Fluoreszenz der MFK bei der Destabilisierung der Emulsionen zu verdeutlichen (Abb. 4.10 und Abb. 4.11). Abb. 4.10 zeigt die Ergebnisse zur Aggregation und Fusion der MFK ( $\text{Ca}^{2+}$  induziert); Abb. 4.11 zeigt die Ergebnisse zur Fusion der MFK ( $\text{Ca}^{2+}$  induziert, reversible Aggregathaufen durch EDTA zerstört).

Wurden Rh-MFK und NBD-MFK zunächst 1:1 gemischt, unmittelbar nach der Präparation ein Aliquots mit SMUF verdünnt und anschließend die Fluoreszenz der Emulsion bestimmt, sind zwei getrennt voneinander liegende MFK-Populationen im Fluoreszenzdiagramm zu beobachten (Abb. 4.10 A). Diesen Populationen wurden die entsprechenden Gates zugeordnet, und die Anzahl der Ereignisse in den definierten Bereichen somit quantifiziert.

Wurde die Emulsion durch Zugabe von Calciumionen destabilisiert, traten Ereignisse mit einer NBD- und Rh-Fluoreszenz außerhalb der gesetzten Gates auf. Diese Ereignisse repräsentieren die Aggregation oder Fusion unterschiedlich markierter MFK (Abb. 4.10 B).

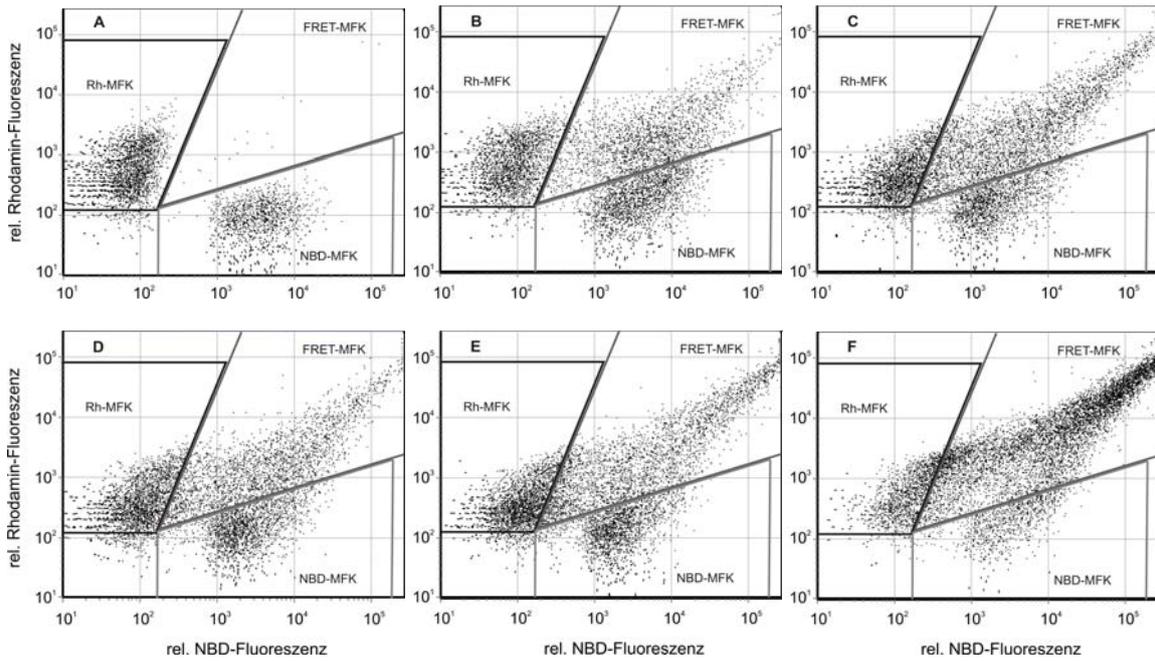


Abb. 4.10: Fluoreszenzdiagramme von MFK zu verschiedenen Aggregations- und Fusionszeitpunkten des Mixing Assays. A, B, C, D, E und F repräsentieren 0, 2, 4, 8, 12 und 24 Minuten der Reaktionskinetik. Die Interaktion wurde durch Zugabe von 5 mM  $\text{CaCl}_2$  induziert. Die Proben wurden mit SMUF verdünnt und die Fluoreszenz der MFK mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Rh-MFK = Gate der Rhodamin markierten MFK, NBD-MFK = Gate der NBD markierten MFK, FRET-MFK = Gate der FRET markierten MFK.

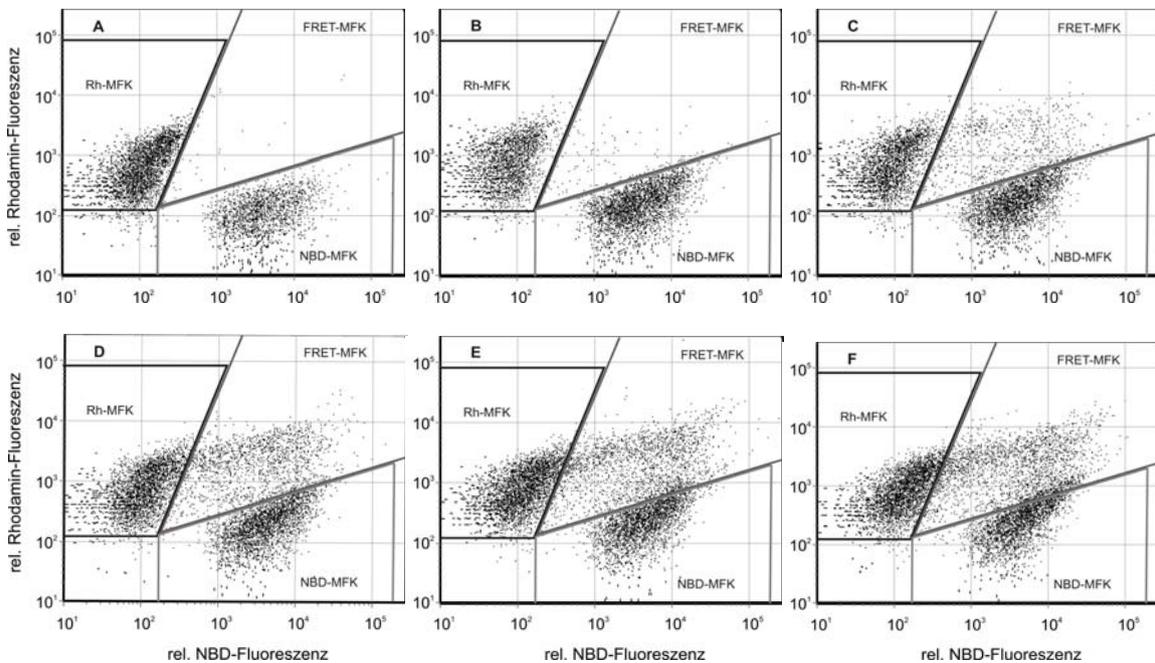


Abb. 4.11: Fluoreszenzdiagramme von MFK zu verschiedenen Fusionszeitpunkten des Mixing Assays. A, B, C, D, E und F repräsentieren 0, 2, 4, 8, 12 und 24 Minuten der Reaktionskinetik. Die Interaktion wurde durch Zugabe von 5 mM  $\text{CaCl}_2$  induziert. Die Proben wurden mit EDTA und anschließend mit SMUF verdünnt (Gates wie oben).

Während der Inkubation der Emulsionen wurde eine Abnahme der MFK-Ereignisse in den Rh- und NBD-Gates und eine Zunahme der MFK, die beide Fluoreszenzen tragen und somit FRET positiv sind, beobachtet. Die Fluoreszenz der aggregierten und/oder fusionierten MFK erhöhte sich um einen Faktor von  $10^1$ - $10^3$  und ist vermutlich auf die Bildung von MFK-Aggregathaufen zurückzuführen. Diese tragen eine hohe Anzahl von Fluoreszenzmolekülen auf der Oberfläche und weisen somit eine hohe Fluoreszenz auf. Wurden die Proben vor der Fluoreszenzbestimmung mit EDTA verdünnt, zerfielen die Aggregathaufen, wie bereits anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen gezeigt wurde.

Die Zerstörung von MFK-Aggregaten durch EDTA konnte auch durch Partikelmessungen bestätigt werden, wenn nach der calciuminduzierten Destabilisierung der MFK-Emulsion die Veränderung des  $d_{50.3}$  mittels Partikelgrößenbestimmung gemessen wurde. Wie aus Abb. 4.12 zu erkennen ist, nimmt der  $d_{50.3}$  nach 16 min Inkubation mit 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 37 °C

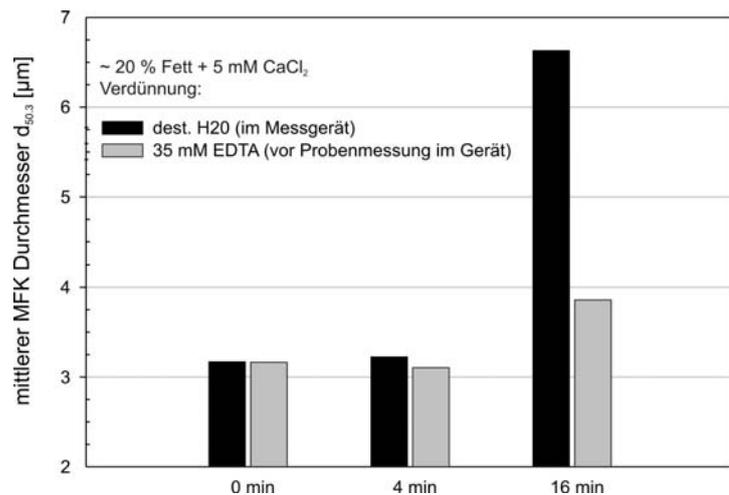


Abb. 4.12: Einfluss des Verdünnungsmittels bei der Partikelgrößenbestimmung auf den mittleren MFK-Durchmesser  $d_{50.3}$  bei der calciuminduzierten Destabilisierung der MFK.

Probe vor der Partikelmessung mit 35 mM EDTA verdünnt, zerfallen die gebildeten Aggregate. Dennoch ist der gemessene  $d_{50.3}$  größer als der mittlere MFK-Durchmesser der Kontrollprobe (0 min Inkubation), so dass diese ca. 18%ige Zunahme des  $d_{50.3}$  durch die Fusion der MFK verursacht wurde.

Wird die Veränderung der Fluoreszenzintensität der fusionierten MFK im Vergleich auf die ursprüngliche Fluoreszenz der MFK betrachtet (Abb. 4.11), beträgt diese nur noch ca.  $10^1$ . Die Rh-MFK- und NBD-MFK-Populationen traten nicht in das FRET-MFK-Gate über, so dass im FRET-Gate nur Hemifusions- bzw. Fusionsereignisse bestimmt wurden. Qualitativ ist zu erkennen, dass deutliche Fusionsereignisse erst nach 4 Minuten auftraten. Anhand der Partikelmessung konnte nach 4 min Inkubation keine Fusion festgestellt werden, jedoch eine geringe Aggregation der MFK.

Die Kontrolle der calciumabhängigen Interaktion zeigte, dass NBD- und Rh-MFK ohne Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen innerhalb ihrer definierten Gates blieben, so dass ohne Induktion der Interaktion der MFK keine Fluoreszenzveränderung der verschiedenen MFK-Populationen beobachtet werden konnte.

Tab. 3.2: Verwendete Enzyminhibitoren für das Abstoppen der Proteolyse der MFKM-Proteine

Enzyminhibitor	Bezogen von	Benutzt für Enzym	Stamm- lösung <sup>1</sup>	Verdünnung <sup>2</sup>	Endkonzentration
Phenylmethylsulfonylfluorid	Fluka, Deutschland	$\alpha$ -Chymosin, Thrombin und Endoprotease V8	90 mM in 100 % Ethanol	Kurz vor der Verwendung 1:30 mit SMUF	0,5 mM
Iodacetamid	Sigma, Deutschland	Papain	180 mM in SMUF <sup>3</sup>	-	30 mM
Trypsininhibitor (aus Sojabohne)	Sigma, Deutschland	Trypsin	3 mg/ml in SMUF	-	0,6 mg/ml
3,4 Dichloroisocoumarin	Sigma, Deutschland	Endoprotease V8	90 mM in SMUF <sup>3</sup>	1:15 mit SMUF	1 mM

<sup>1</sup> Stammlösungen wurden nach der Herstellung bei -20 °C gelagert.

<sup>2</sup> Alle Verdünnungen wurden nach dem Ansetzen auf Eis gelagert.

<sup>3</sup> Wurde frisch am Versuchstag angesetzt.

### 3.2.5 Erhitzung und Homogenisierung von Rahmproben

Ausgangsprodukt für die Erhitzung und Homogenisierung von Rahmproben war pasteurisierter Rahm (72 °C, 20 s) mit einem Fettgehalt von 38-40 % und Magermilch der Staatlichen Molkerei Weihenstephan GmbH & Co. KG. Durch Mischen von Rahm und Magermilch wurde der Fettgehalt auf 10 % bzw. 30 % eingestellt.

Die Erhitzungs- und Homogenisierungsversuche wurden am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie der TUM durchgeführt. Für die Experimente wurde eine Technikumsanlage verwendet, in der die Homogenisierungsbedingungen variiert werden konnten. Die in dieser Arbeit untersuchten Verarbeitungsbedingungen des Rahms sind in Abb. 3.3 dargestellt.

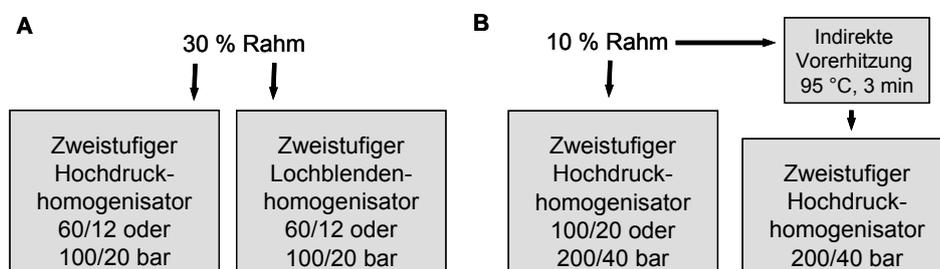


Abb. 3.3: Versuchsvarianten der Rahmbehandlung: Rahm A (30 % FG) und B (10 % FG) wurde bei 65 °C und einem Volumenstrom von 70 l h<sup>-1</sup> homogenisiert.

Die mittels des nachgeschalteten Wärmeaustauschers gekühlten Rahmproben (10 °C) wurden am selben Tag weiterverarbeitet. Um die Serumproteine zu entfernen, wurden die MFK wie unter 3.2.1

Durch Setzung der Gates im Fluoreszenzdiagramm konnten die gewonnenen Daten des Mixing Assays quantitativ ausgewertet werden. Die Aggregation und/oder Fusion bzw. die vollständige Fusion der MFK wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Interaktion} = \frac{(\text{Anzahl der MFK im Gate FRET} - \text{MFK}_t)}{(\text{Gesamtanzahl der MFK}_t)} \cdot 100\% \quad (4.2)$$

Für die Ergebnisse der Abb. 4.10 und Abb. 4.10 wurde das Maß der Interaktion in Abhängigkeit der Zeit berechnet und in Abb. 4.13 graphisch dargestellt.

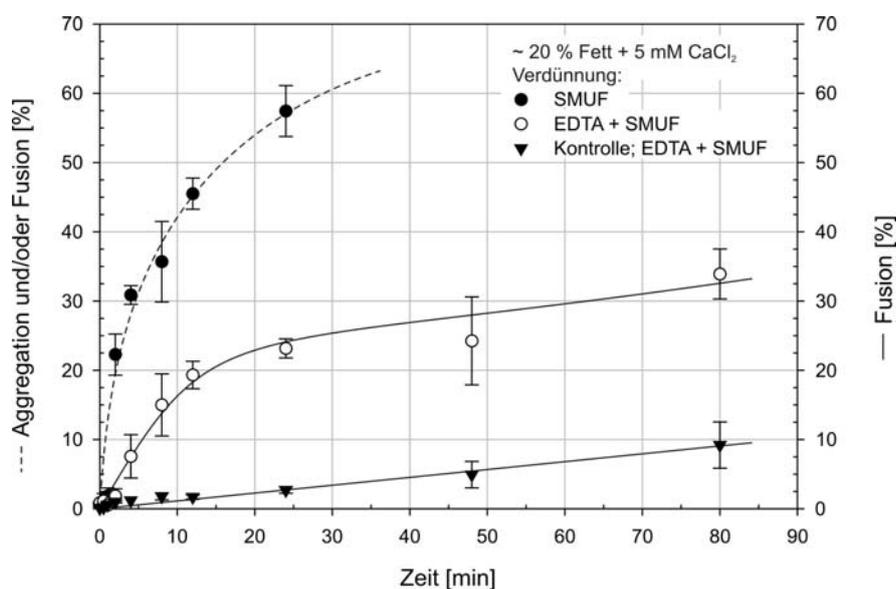


Abb. 4.13: Aggregation und Fusion von MFK, bestimmt durch den Mixing Assay. Die Messung der Aggregation und/oder Fusion (unterbrochene Linie) bzw. der Fusion (durchgezogene Linie) ist vom Verdünnungsmedium abhängig (siehe 3.2.4.2). Messpunkte stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dar ( $n = 2-4$  unabhängige Messungen).

In Abb. 4.13 ist zu erkennen, dass die mittels des Mixing Assays erfasste  $\text{Ca}^{2+}$  unabhängige Fusion, die durch das Mischen von Rh-MFK und NBD-MFK und deren Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  bestimmt wurde, zunächst schwach ausgeprägt ist (umgekehrte Dreiecke in Abb. 4.13). Erst mit längerer Versuchsdauer steigt die Hintergrundfusion kontinuierlich leicht an und nach 80 min wird ein Wert von ca. 10 % erreicht.

Nach Induktion der Interaktion der MFK durch  $5\text{ mM Ca}^{2+}$  wurde eine sehr starke Aggregation in Abhängigkeit der Zeit festgestellt. Nach 24 Minuten sind ca. 60 % der ursprünglichen MFK in Wechselwirkung mit anderen MFK getreten.

Wurde nur die Fusion der MFKM durch Verdünnen der Proben mit EDTA mittels des Mixing Assays bestimmt, wurde eine rasche Fusion innerhalb von 12 Minuten beobachtet. Danach nimmt die Fusionsgeschwindigkeit stark ab, und es treten pro Zeiteinheit weniger Fusionsereignisse auf. Im Vergleich zur Aggregation ist das Ausmaß der Fusion um einen Faktor 2,5-4 kleiner. Das ist darauf

zurückzuführen, dass der Mixing Assay wenig sensitiv ist, um die Fusion biologischer Membranen zu untersuchen [DÜZGÜNES et al., 1987]. Daher wurde der Diluting Assay als eine weitere etablierte, FRET-basierte Messmethode für die Messung der Fusion von Liposomen sowie biologischer Membranen verwendet, um die Aggregation und Fusion von MFK durch fluoreszenzmarkierte Phospholipide bestimmen zu können.

### **4.2.3 Quantifizierung der Aggregation und Fusion der MFK mittels des Diluting Assays**

Hintergrund des Diluting Assays ist die Zunahme des Abstandes zwischen den beiden Fluorophoren auf der Oberfläche der Membran während der Fusion von farbstoffmarkierten MFK mit unmarkierten MFK. Bei der Fusion reduziert sich die Akzeptorfluoreszenz (Rhodamin), während die Donorfluoreszenz (NBD) steigt. Diese erhöhte NBD-Fluoreszenz fusionierter MFK sollte im Fluoreszenzdiagramm deutlich zu beobachten sein, wenn unmarkierte MFK und markierte MFK fusioniert sind. Die Differenzierung zwischen Aggregation und Fusion erfolgte ebenso wie im vorherigen Kapitel bei Mixing Assay durch eine Verdünnung mit EDTA.

Markierte und unmarkierte MFK wurden im Verhältnis 1:5 gemischt. Die Interaktion der MFK wurde durch eine Erhöhung der Calciumionenkonzentration im Serum der Emulsionen (durch Zugabe von Calciumchlorid) induziert. Zunächst wurden die Proben nur mit SMUF verdünnt. Die Fluoreszenz der MFK wurde mit dem Durchflusscytometer in Abhängigkeit der Inkubationszeit gemessen. Bei der zweiten Versuchsreihe wurden die Proben vor der Verdünnung mit SMUF 1:10 - 1:20 mit 35 mM EDTA vorverdünnt.

Die qualitativen Ergebnisse der Fluoreszenzveränderung der MFK bei Aggregation und Fusion innerhalb von 60 Minuten zeigen Abb. 4.14 und Abb. 4.15. Wurde die Destabilisierung des Emulsionssystems induziert, erfolgte innerhalb von 4-24 Minuten eine rasche Aggregation und/oder Fusion, wie durch das Auftreten von Ereignissen unterhalb des FRET-MFK-Gates (hervorgehoben durch Pfeile in Abb. 4.14, MFK haben eine etwas geringere Rh-Fluoreszenz als FRET-MFK) und an denen nach rechts aus dem Gate der unmarkierten MFK heraustretenden MFK zu erkennen ist (siehe Abb. 4.14). Nach 60 Minuten waren beide MFK-Populationen miteinander verschmolzen, und die entstandene Population hatte eine reduzierte Rh-Fluoreszenz und eine höhere NBD-Fluoreszenz als die ursprüngliche FRET-Population. Jedoch traten auch viele Ereignisse auf, die sowohl eine starke Erhöhung der Rh- als auch der NBD-Fluoreszenz aufwiesen. Die Ursachen für diese große Fluoreszenzzunahme der interagierten MFK werden im Kapitel 5.2.2 diskutiert.

Erfolgte eine Verdünnung der Proben vor der Fluoreszenzbestimmung mit EDTA, so dass Calciumaggregate zerfielen, erfolgte keine vollständige Vermischung der verschiedenen MFK-Populationen (siehe Abb. 4.15).

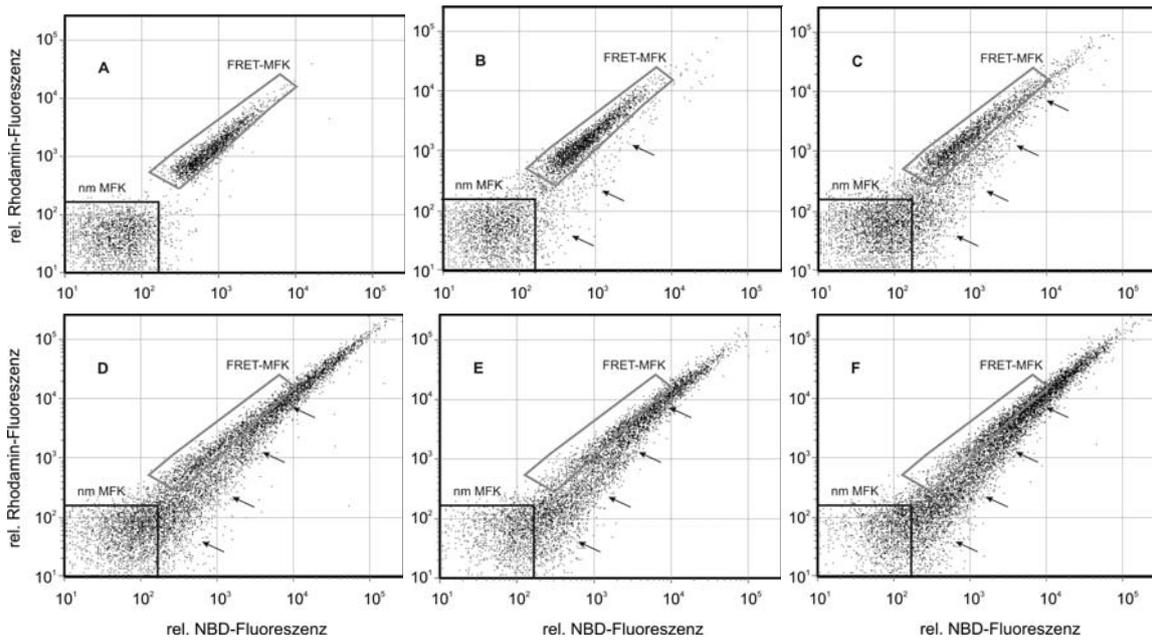


Abb. 4.14: Fluoreszenzdiagramm von MFK zu verschiedenen Aggregations- und Fusionszeitpunkten des Diluting Assays. A, B, C, D, E und F repräsentieren 0, 4, 8, 24, 48 und 60 Minuten der Reaktionskinetik. Die Interaktion wurde durch Zugabe von 5 mM  $\text{CaCl}_2$  induziert. Die Proben wurden mit SMUF verdünnt und die Fluoreszenz der MFK per Durchflusszytometrie bestimmt. nm-MFK = Gate der nicht markierten MFK, FRET-MFK = Gate der FRET markierten MFK. Die Pfeile deuten die Verschiebung der beiden verschiedenen MFK-Populationen an.

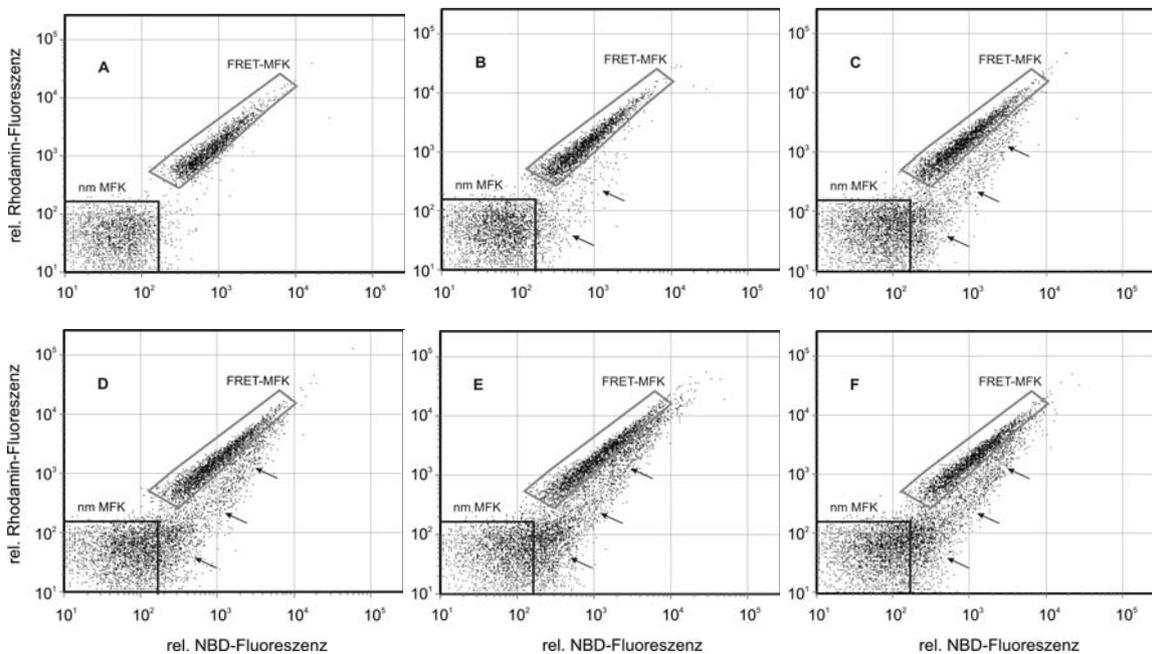


Abb. 4.15: Fluoreszenzdiagramm von MFK zu verschiedenen Fusionszeitpunkten des Diluting Assays. A, B, C, D, E und F repräsentieren 0, 4, 8, 24, 48 und 80 Minuten der Reaktionskinetik. Die Interaktion wurde durch Zugabe von 5 mM  $\text{CaCl}_2$  induziert. Die Proben wurden mit EDTA und anschließend mit SMUF verdünnt und die Fluoreszenz der MFK per Durchflusszytometrie bestimmt. Die Pfeile deuten die Entstehung fusionierter MFK an.

Vielmehr entstand eine neue Population, da die ursprüngliche FRET-Population und die nicht markierte MFK-Population während des kinetischen Verlaufs des Experiments bestehen blieben. Die „neue“ Population von MFK repräsentiert daher solche MFK, die aus einer Hemifusion bzw. aus einer vollständigen Fusion von nicht markierten MFK mit FRET-MFK entstanden sind. Daher weisen diese fusionierten MFK eine verringerte FRET-Effizienz in der Membran auf, die durch die Verteilung der Farbstoffe auf der vergrößerten Membranoberfläche bedingt ist. Hierdurch nimmt die NBD-Fluoreszenz der MFK zu und die MFK-Wolken rücken nach rechts im Fluoreszenzdiagramm.

Abb. 4.16 zeigt eine kinetische Auswertung der in Abb. 4.14 und Abb. 4.15 dargestellten Ergebnisse. Die Auswertung erfolgte durch die Ermittlung der Abnahme der Ereignisse im Gate der unmarkierten MFK in Anhängigkeit der Zeit. Die Interaktion der Fettkugeln wurde wieder entweder als Aggregation und Fusion bzw., wenn die Proben vorher mit EDTA verdünnt worden waren, als reine Fusion ausgewertet. Die Destabilisierung der MFK wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Interaktion} = \frac{[1 - \text{Ereignisse Gate nm MFK}(t)]}{\text{Ereignisse Gate nm MFK}(t = 0)} \cdot 100\% \quad (4.3)$$

Wurde eine Interaktion der Milchfettkugeln ausgelöst und die entstandenen Aggregate nicht durch eine Verdünnung mit EDTA zerstört, war eine sehr starke Aggregation und/oder Fusion der MFK innerhalb von 10–20 Minuten zu beobachten (siehe Abb. 4.16).

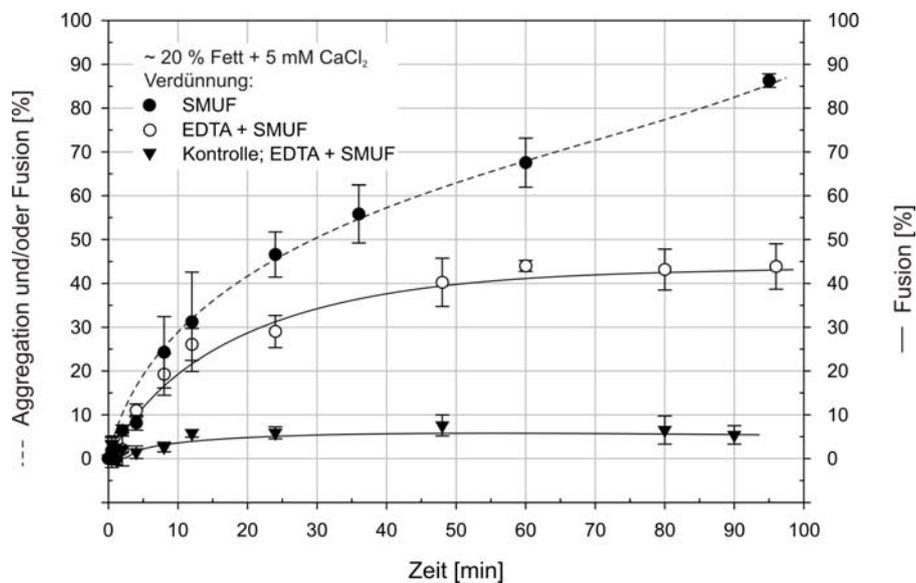


Abb. 4.16 Aggregation und Fusion von MFK, bestimmt durch den Diluting Assay. Die Messung der Aggregation und/oder Fusion (gestrichelte Linie) bzw. der Fusion (durchgezogene Linie) der MFK ist vom Verdünnungsmedium abhängig. Bei den Kontrollproben wurde SMUF statt  $\text{CaCl}_2$  zu den Emulsionen gegeben. Messpunkte stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dar ( $n = 2-4$  unabhängige Messungen).

Wurden die Aggregate durch eine EDTA-Zugabe zerstört, ergab sich eine um etwa die Hälfte reduzierte Fusion der MFK. Diese Interaktion beruht auf einer Fusion der MFK, wie aus Abb. 4.17 ersichtlich wird. Der Fusionsprozess der MFK wurde durch die Abnahme der FRET-Effizienz in den Membranen der fusionierten MFK für die mit EDTA verdünnten Proben beispielhaft für einen Messpunkt nachgewiesen. Wie unter 4.1.4 beschrieben, kann aus der Abnahme der Steigung der Geraden der FRET-MFK in Abb. 4.17 auf eine Abnahme der FRET-Effizienz geschlossen werden. Hierdurch kann der gemessene Destabilisierungsprozess als Fusionsprozess der MFK charakterisiert werden. Somit kann durch das entwickelte Messsystem nicht nur das Ausmaß der Wechselwirkung von MFK bestimmt werden, sondern auch die Art der Interaktion. Die Abnahme der FRET-Effizienz kann damit als qualitatives Merkmal dienen, um zwischen der Aggregation und Fusion der MFK bei weiteren Untersuchungen zu unterscheiden.

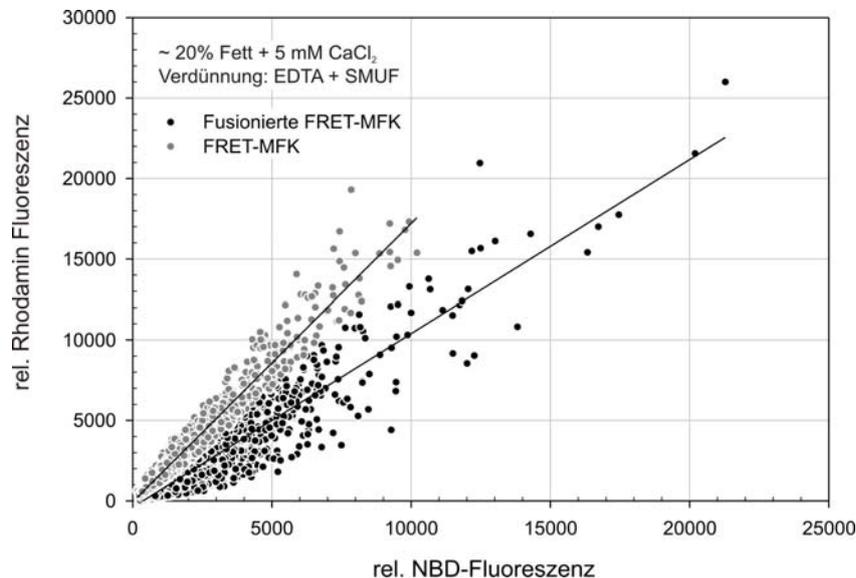


Abb. 4.17: Reduzierung der FRET-Effizienz durch Fusionsereignisse von FRET-MFK mit unmarkierten MFK. Die Probe wurden mit EDTA und anschließend mit SMUF verdünnt und die Fluoreszenz der MFK mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Das Diagramm zeigt die NBD- und Rh-Fluoreszenz der FRET-MFK und der fusionierten MFK nach 48 min.

#### 4.2.4 Vergleich zwischen Mixing und Diluting Assay

Sowohl der Mixing Assay als auch der Diluting Assay können für die Messung der Aggregation und Fusion mittels fluoreszenzmarkierter MFK eingesetzt werden, weil im Gegensatz zur Fluoreszenzspektroskopie mittels der Durchflusszytometrie Einzelpartikel und einzelne Aggregathaufen vermessen werden und nicht wie bei einem Fluoreszenzspektrometer die Fluoreszenzintensitätssumme einer kollidalen Lösung bestimmt wird. Daher musste geprüft werden, welches der beiden Messsysteme (Mixing oder Diluting Assay) besser geeignet ist, die Interaktion der MFK zu messen. Dazu müssen die gewonnenen Ergebnisse der beiden Messsysteme miteinander verglichen werden. Hierfür wurden die jeweiligen Hintergrundfusionen, die durch die Kontrollmessungen gewonnen

worden waren, von den Messergebnissen der Aggregation und Fusion der MFK abgezogen, und die Daten graphisch dargestellt (Abb. 4.18).

Wie in Abb. 4.18 zu erkennen ist, wird mit dem Mixing Assay eine schnellere und stärkere Aggregation der MFK bestimmt als mit dem Diluting Assay. Nach 12 Minuten wird mit dem Mixing Assay eine Aggregation und/oder Fusion von 45 % und mit dem Diluting Assay von 25 % beobachtet. Werden die Fusionsdaten miteinander verglichen, zeigt sich, dass zwar mit dem Mixing Assay eine ähnliche Fusionssteigerung in den ersten 10 Minuten wie mit dem Diluting Assay bestimmt wird, die gemessene Interaktion ist nach 80 min jedoch um etwa den Faktor 1.5 geringer als die des Diluting Assays. Diese Ergebnisse bestätigen die Aussagen von DÜZGÜNES et al. [1987], dass der Mixing Assay eher die Aggregation als die Fusion membranbasierter disperser Systeme messen kann.

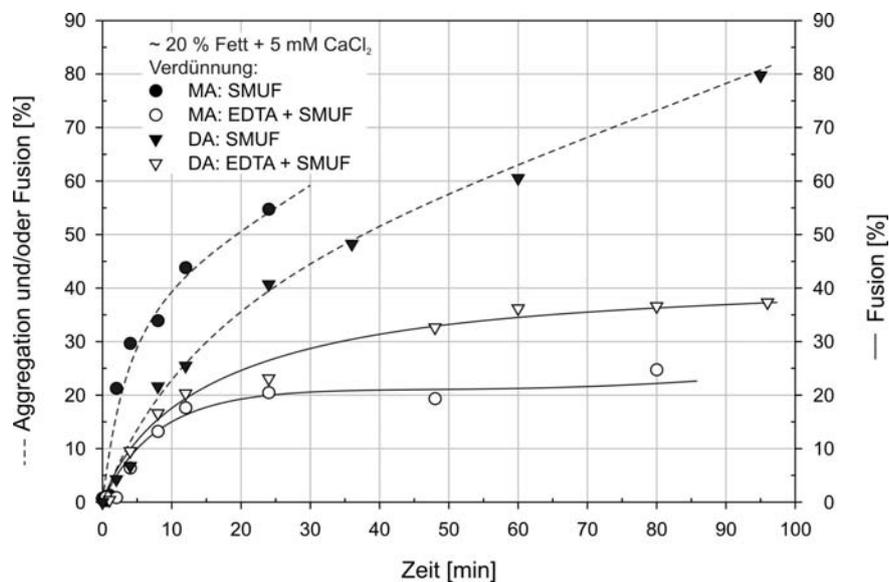


Abb. 4.18: Vergleich der gemessenen Interaktion der MFK im Mixing Assay (MA) und im Diluting Assay (DA). Messung der Aggregation und/oder Fusion (gestrichelte Linien) bzw. der Fusion (geschlossene Linien) der MFK ist vom Verdünnungsmedium abhängig. Die Hintergrundfusion, ermittelt durch Messung von MFK-Emulsionen, bei denen keine Interaktion induziert wurde, wurde subtrahiert.

Ein weiterer Nachteil des Mixing Assays besteht darin, dass zwei unterschiedlich markierte MFK-Emulsionen miteinander gemischt werden müssen. Hierfür müssen beide Membranpopulationen mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt werden. Dies ist jedoch nicht möglich, wenn MFK aus technologisch verarbeiteten Milchprodukten bezüglich ihrer Emulsionsstabilität untersucht werden sollen. Durch den Markierungsprozess würde die Membranstruktur verändert werden, so dass die Korrelation zwischen den mit einem Mixing Assay gewonnenen Daten und den technologischen Eigenschaften der MFK erschwert ist. Der Diluting Assay ist dagegen universell einsetzbar. FRET-MFK können standardisiert aus nativen MFK hergestellt und zu verschiedenen Emulsionssystemen zugegeben werden, wie im weiteren Teil der Arbeit noch untersucht wird.

Weiterhin können, wie später gezeigt wird, die Daten des Diluting Assay durch ein mathematisches Reaktionsmodell ausgewertet werden, während die Daten des Mixing Assay sehr aufwendig einem reaktionsmathematischen Modell angepasst werden müssten. Daher wurden nur aus den Daten des Diluting Assay die rel. Geschwindigkeitskonstanten für die Aggregation und Fusion berechnet (siehe Kapitel 5.2.5).

Wie in Kapitel 4.2.2 gezeigt wurde, ist der Diluting Assay in der Lage, zwischen Aggregation und Fusion von MFK zu unterscheiden. Basierend auf den in den Kapiteln 4.1 und 4.2 erzielten Ergebnissen soll die Möglichkeit von FRET-markierten MFK für die Untersuchung von Emulsionsstabilitäten homogenisierter Rahmproben im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Zunächst jedoch wird die Temperaturabhängigkeit des Messsystems charakterisiert, um die Versuchstemperatur für die Untersuchung homogenisierter Rahmproben festlegen zu können.

### **4.2.5 Einfluss der Temperatur auf die mittels des Diluting Assays erfasste Aggregation und Fusion der MFK**

Ziel dieses Teilkapitels ist, die Interaktion der FRET-MFK mit unmarkierten MFK im Diluting Assay in Abhängigkeit der Temperatur zu untersuchen. Die Temperatur beeinflusst die Stabilität der Fettkugeln durch den Einfluss des Phasenzustandes der Phospholipide der Membran und der Triglyceride im Fettkern. Unterhalb der Schmelztemperatur von 8-18.3 °C ist die Membran starr, die Ketten der Phospholipide sind gefroren und die Phospholipide daher nicht frei in der Membran beweglich. Demgemäß ist die Diffusion der fluoreszenzmarkierten Phospholipide bei einem Fusionsereignis nur möglich, wenn die Membran fluide ist, so dass die Bestimmung der Emulsionsstabilität mit fluoreszenzmarkierten MFK vermutlich auf Temperaturen oberhalb der Phasenübergangstemperatur der MFKM beschränkt ist.

Der Fettkugelnkern besteht aus einem Gemisch hoch- und niedrignschmelzender Triglyceriden, die je nach Umgebungstemperatur in verschiedenen Kristallisationsstadien vorliegen, so dass nur bei 37 °C nahezu das gesamte Fett in flüssiger Form vorliegt. Unterhalb dieser Schmelztemperatur beeinflussen die Fettkristalle zusätzlich der Stabilität der MFK. Hochschmelzende Triglyceride können bei Temperaturen unter 37 °C an die Innenseite der Membran auskristallisieren und so eine Stabilisierung der Membran bewirken. Eine vollständige Fusion ist demzufolge nicht mehr zu erwarten, da das starre Fett ein Zusammenfließen der Fettkugeln verhindert. Somit kann erwartet werden, dass die Fusion der MFK bei Temperaturen unter 37 °C vermindert ist.

Für die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit wurde der Diluting Assay wie bisher beschrieben eingesetzt. Im Vergleich zu vorherigen Experimenten wurde die Inkubationstemperatur zwischen 10 und 37 °C variiert. Die Proben wurden zuvor über 18 h bei 0 °C gelagert, so dass der größte Teil des Milchfettes bei Versuchsbeginn kristallin vorlag.

Es konnte eine starke Temperaturabhängigkeit der Aggregation und/oder Fusion der MFK beobachtet werden, wobei zwischen zwei Temperaturbereichen unterschieden werden kann. Bei Temperaturen unterhalb von 20 °C konnte nahezu keine Aggregation und Fusion von MFK festgestellt werden (Abb. 4.19). Erst wenn die Temperatur auf 30 °C erhöht wurde, beschleunigte sich die Geschwindigkeit der Destabilisierung des Emulsionssystems deutlich und unterschied sich nicht signifikant von der bei 37 °C.

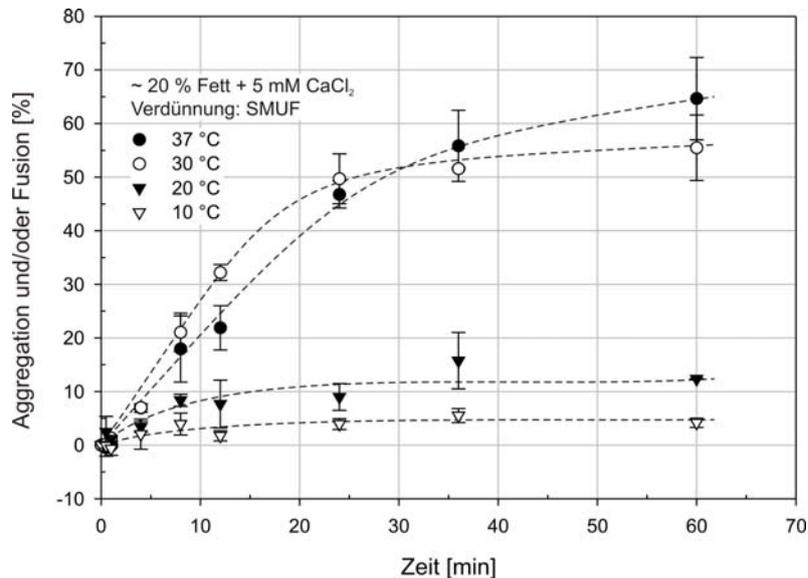


Abb. 4.19: Temperaturabhängige Aggregation und/oder Fusion der MFK. Messpunkte stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dar.

Mit abnehmender Temperatur nimmt auch die kinetische Energie bzw. die Beweglichkeit der Emulsionströpfchen ab. Daher sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass bei Zusammentreffen zweier MFK die Energiebarriere der Abstoßung der MFK überwunden wird. Ein weiterer Grund für die nicht vorhandene Aggregation bei 10 °C könnte die möglicherweise veränderte molekulare Organisation der MFKM sein, so dass die Membran keine bzw. schwächere calciuminduzierte Wechselwirkungen ausbildet. Gebildete MFK-Aggregate sind dann möglicherweise durch den Verdünnungsprozess für die Fluoreszenzbestimmung wieder zerstört worden.

Wird die Fusion der MFK in Abhängigkeit der Temperatur betrachtet, kann eine deutliche Temperaturabhängigkeit festgestellt werden: Mit steigender Temperatur nimmt die Fusion im Gegensatz zur Aggregation kontinuierlich zu (Abb. 4.20). Unterhalb von 37 °C ist ein Teil des Milchfettes kristallin und behindert die vollständige Fusion der MFK, so dass, obwohl bei 30 °C die Aggregation der MFK ähnlich stark ist, die Fusion gegenüber 37 °C reduziert ist. Bei 10 °C findet erwartungsgemäß keine Fusion statt. Die gefrorene Membran verhindert bei dieser Temperatur die Fusion der MFK, bzw. kann durch die fehlende Aggregation der MFK kein Fusionsprozess stattfinden.

Die Temperaturabhängigkeit der Bestimmung der Aggregation und Fusion der MFK durch fluoreszenzmarkierte MFK konnte bestätigt werden. Bei 37 °C wurde die stärkste Destabilisierung der MFK mit FRET-MFK bestimmt. Mögliche Ursachen für diese Beobachtungen werden im Diskussionsteil (siehe 5.2) dieser Arbeit erörtert.

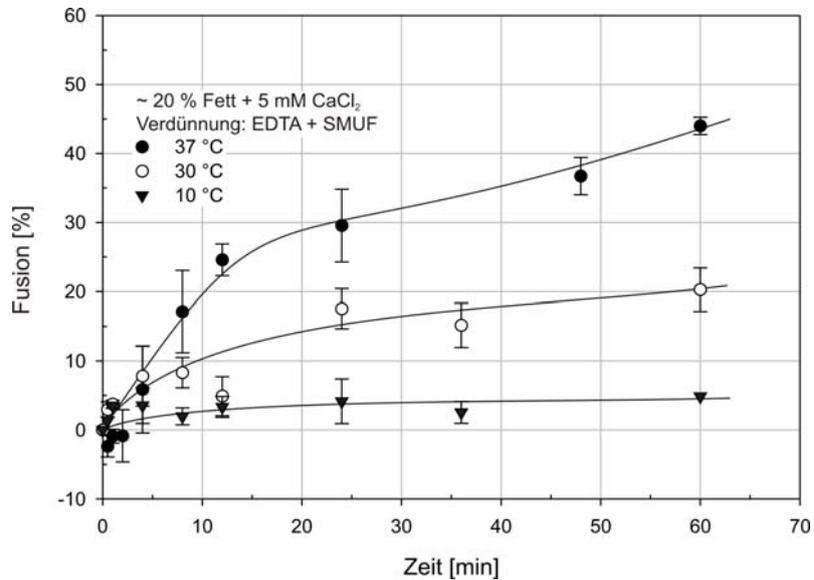


Abb. 4.20: Temperaturabhängige Messung der Fusion der MFK. Messpunkte stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dar.

Wie gezeigt wurde, kann mittels der fluoreszenzmarkierten MFK und des Diluting Assays die Aggregation und Fusion von MFK durch durchflusscytometrische Messungen zeitaufgelöst erfasst werden. Im nächsten Abschnitt dieser Arbeit soll untersucht werden, ob mit diesem Messsystem die Destabilisierung homogenisierter MFK bei 37 °C beobachtet werden kann, und hierdurch die Anwendbarkeit des Messsystems auf technologische Fragestellungen überprüft werden.

### 4.3 Bestimmung der Emulsionsstabilität von Rahmproben durch FRET-markierte MFK

Wie in den vorherigen Kapiteln gezeigt wurde, kann mit Hilfe des Diluting Assays die Destabilisierung von MFK-Emulsionen untersucht werden. Die kolloidalen Wechselwirkungen zwischen einzelnen MFK hängen dabei stark vom Membranaufbau ab, der wiederum stark von der technologischen Prozessierung der MFK abhängig ist. Homogenisierte MFK sind sehr stabil gegenüber einer Fusion. Jedoch ist die Aggregationsneigung homogenisierter Fettkugeln zum Teil erheblich erhöht, da aufgrund des hohen Anteils an Caseinen die SFKM hydrophober als die native MFKM ist und intensiver mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen reagiert [KESSLER, 1996].

Ziel der folgenden Versuche war es daher, die Eigenschaften des Diluting Assays für die Charakterisierung verschiedener Milchfettkugelmembranen zu untersuchen. Hierzu wurden 10%ige bzw. 30%ige Rahmproben unterschiedlich homogenisiert, so dass der Membranaufbau der SFKM gezielt variiert wurde (siehe Kapitel 3.2.5). Die MFK wurden aus den Rahmproben mit der Methode von PATTON und HUSTON [1986] isoliert, und die Stabilität der MFKM gegenüber einer calciuminduzierten Aggregation und Fusion untersucht.

In Abb. 4.21 ist die Fusion der MFK aus unterschiedlich homogenisierten 30%igen Rahmproben mit FRET-MFK dargestellt. Durch die Zugabe von Calciumionen konnten, wie erwartet, die Wechselwirkungen zwischen den MFK verstärkt und damit die Fusion von hochdruckbehandelten MFK induziert werden. Die Fusion der MFK ist, wie beobachtet werden konnte, von den Homogenisierungsbedingungen abhängig.

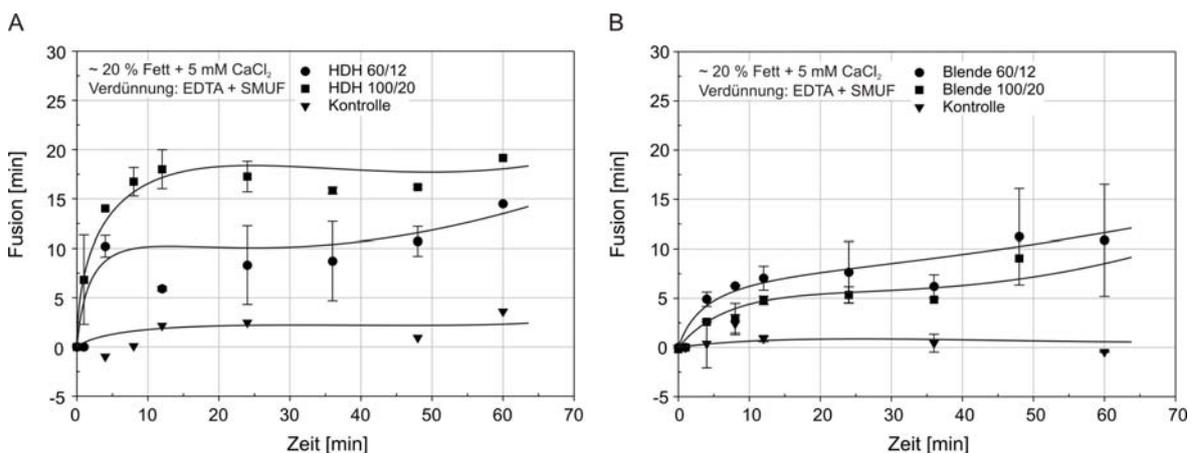


Abb. 4.21: Bestimmung der Fusion von unterschiedlich homogenisierten MFK durch den Diluting Assay. A) 30%iger Rahm wurde zweistufig bei 65 °C im Hochdruckhomogenisator (HDH) homogenisiert. B) 30%iger Rahm wurde zweistufig bei 65 °C im Lochblendenhomogenisator homogenisiert. Drücke sind in bar angegeben. Die Kontrollen wurden jeweils mit den bei 100/20 homogenisierten MFK durchgeführt. Zu den MFK-Emulsionen wurden SMUF statt 5 mM  $\text{CaCl}_2$  zugegeben.

Wurden die Rahmproben mit einem klassischen Hochdruckhomogenisator unter den im Kapitel 3.2.5 beschriebenen Bedingungen homogenisiert, so konnte innerhalb von 10 Minuten ein rascher Anstieg der Fusion beobachtet werden. Die Geschwindigkeit der Fusion schwächte sich dannach stark ab, und der Anteil der fusionierten MFK blieb nahezu konstant. Dabei zeigten MFK, die mit einem Homogenisierungsdruck von 100/20 (Drücke in bar) behandelt worden waren, eine stärkere Interaktion mit den markierten MFK als solche, die bei einem Druck von 60/12 homogenisiert wurden. Grund ist vermutlich die unterschiedliche Membranbeladung der homogenisierten MFK mit Serumproteinen der Milch, die zu einer unterschiedlichen Stabilität der Sekundärmembran führt. CANO-RUIZ et al. [1997] konnten eine Abhängigkeit der Proteinbeladung der MFK vom Homogenisierungsdruck nachweisen. Wurden die MFK mittels eines Lochblendenhomogenisators homogenisiert, konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Druckvarianten festgestellt werden. Die MFK zeigten eine etwas schwächere Fusionsgeschwindigkeit als die MFK, die mittels eines HDH homogenisiert wurde, wobei vermutlich wieder die Membranbeladung der MFK für dieses unterschiedliche Fusionsverhalten verantwortlich ist. Der Zusammenhang zwischen der Stabilität und der Proteinbeladung der MFK, die durch die Homogenisierungsbedingungen beeinflusst wird, wird in Kapitel 5.2.4 diskutiert.

Um die Abhängigkeit der calciuminduzierten Wechselwirkungen von der Membranbeladung der MFK genauer zu untersuchen, wurde in einem Einzelversuch 10%iger Rahm unterschiedlich erhitzt und homogenisiert. Erwartet wurde, durch den geringen Fettgehalt und die Homogenisierung besonders große Differenzen im Membranaufbau der MFK erreichen zu können. Für eine Verstärkung der Wechselwirkung zwischen den aus den homogenisierten Rahmproben isolierten SMFK wurden die Aggregation und Fusion der MFK mit 10 mM Calcium induziert. Die Versuchsdurchführung war ansonsten gleich mit denen der vorherigen Versuche.

Wie auch bereits bei den 30%igen Rahmproben wird durch Calcium eine Interaktion der MFK ausgelöst. Auffällig ist jedoch, dass bei den 10%igen Rahmproben unabhängig von den Erhitzungs- und Homogenisierungsbedingungen keine Fusion der MFK induziert werden konnte (Abb. 4.22). Zwar unterscheidet sich das Aggregationsverhalten der verschieden behandelten MFK deutlich, jedoch scheinen die Membranen so stabil zu sein, dass trotz starker Aggregation der MFK bei allen drei unterschiedlich prozessierten Rahmproben innerhalb von 36 Minuten kein Fusionsprozess beobachtet werden konnte. Anscheinend bewirken die gebildeten Sekundärmembranen der MFK eine sehr stabile sterische Abschirmung der Fettkugelkerne durch die absorbierten Serumproteine, so dass die Membranen trotz einer Aggregation der MFK nicht fusionieren können. Bemerkenswert ist, dass durch die unterschiedlichen Erhitzungs- und Homogenisierungsbedingungen sehr starke Unterschiede bei der calciuminduzierten Aggregation verursacht werden. MFK, die zweistufig bei einer Druckeinstellung von 200/40 homogenisiert worden sind, zeigen eine verzögerte Aggregation. Wird derselbe Rahm vorher indirekt bei 95 °C für 3 min erhitzt und anschließend bei 200/40

homogenisiert, verdoppelt bis verdreifacht sich die Aggregation der MFK. Grund hierfür kann wiederum nur der andere Aufbau der Sekundärfettkugelmembran sein.

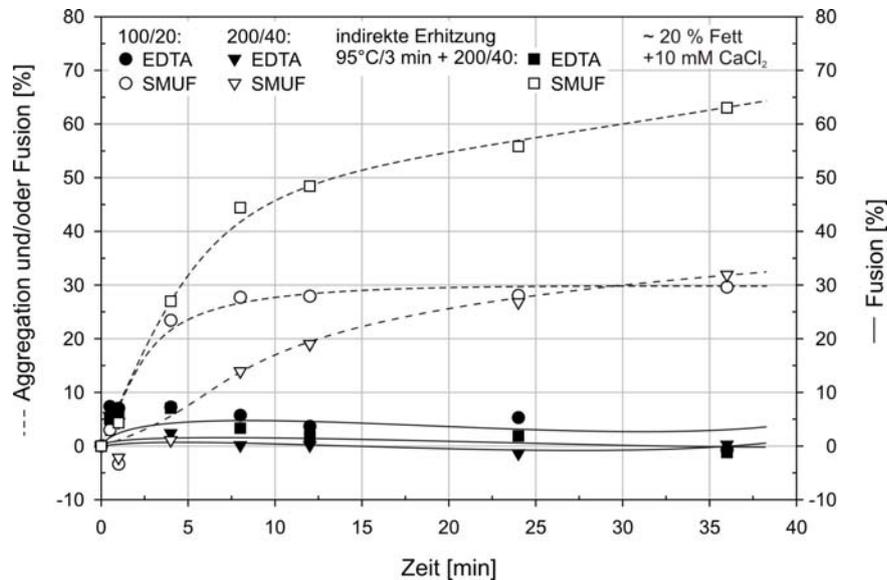


Abb. 4.22: Bestimmung der Aggregation und/oder Fusion bzw. der Fusion von homogenisierten MFK durch den Diluting Assay. 10%iger pasteurisierter Rahm wurde zweistufig mit oder ohne vorherige indirekte Erhitzung bei 65 °C mit verschiedenen Druckeinstellungen homogenisiert. Nach der Induzierung der Interaktion der MFK durch 10 mM Calciumionen wurden die Proben vor der Fluoreszenzbestimmung entweder nur mit SMUF oder mit EDTA und SMUF verdünnt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch FRET-MFK, die aus Rohmilch isoliert worden sind, das Aggregations- und Fusionsverhalten von erhitzten und homogenisierten MFK untersucht werden kann. Interessant hierbei ist das unterschiedliche Aggregationsverhalten der verschiedenen MFKM, welches mittels des Diluting Assays innerhalb kurzer Zeit bestimmt werden kann. Mögliche Ursachen für die unterschiedliche Stabilität der untersuchten MFK werden im Kapitel 5.2.4 diskutiert.

## 4.4 Enzymatische Destabilisierung der Milchfettkugelmembran

### 4.4.1 Makroskopische Veränderung der MFK-Emulsion

Native, technologisch nicht beanspruchte MFK sind relativ stabil gegenüber einer Aggregation und Fusion [WALSTRA, 1995]. Native MFK haben durch ihre Membranproteine eine ausgeprägte Glykokalyx, die vermutlich als sterische Barriere wirkt und daher die MFK in der Rohmilch nach der Sekretion der MFK vor einer Aggregation und Fusion schützt. Untersuchungen von SHIMIZU et al. [1979; 1980] zeigten, dass die Destabilisierung der Fettkugeln durch einen proteolytischen Verdau der Membranproteine erreicht werden kann. Jedoch konnten die Autoren nicht klären, welches der Membranproteine diesen ausgeprägten sterischen Schutz der MFK bewirkt.

Ziel der Untersuchungen war, Membranproteine der MFK zu identifizieren, die einen sterischen Schutz der MFK gegenüber einer Destabilisierung des Emulsionssystems bewirken. Hierzu wurden native MFK aus frischer Rohmilch in SMUF isoliert und mit verschiedenen Proteasen bei 37 °C verdaut. Für die Bestimmung der Destabilisierung in Abhängigkeit der Zeit wurde der enzymatische Verdau zu definierten Zeitpunkten mit einem entsprechenden Enzyminhibitor gestoppt und die Proben auf Eis gelagert, so dass sowohl kein weiterer proteolytischer Verdau der Membranproteine als auch keine weitere Fusion der MFK stattfinden konnte. Das Ausmaß der Destabilisierung der MFK wurde mittels der Partikelgrößenverteilungsmessung in Abhängigkeit der Versuchszeit und der verwendeten Protease bestimmt. Die Proben wurden vor der Messung auf Raumtemperatur angewärmt und gebildete Aggregate durch die Verdünnungen der Proben mit geringen Mengen SDS zerstört. Hierdurch sollte nur die Fusion von MFK gemessen werden, da die Aggregationsbestimmung keine Rückschlüsse auf eine fusionshemmende Wirkung eines der Membranproteine der MFK zugelassen hätte. Da die Verwendung von Detergenz für die Verdünnung der Proben die Fluoreszenzmarkierung der MFK zerstört hätte, konnte für diesen Versuchansatz die neu entwickelte durchflusscytometrische Messmethode nicht verwendet werden.

Wie erwartet, konnte die Destabilisierung der MFK durch einen proteolytischen Verdau der Membranproteine induziert werden (Abb. 4.23). Die Veränderung des mittleren Durchmessers der Volumengrößenverteilung der MFK wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta d_{\text{mean,rel.}} = \frac{d_{\text{mean}}(t) - d_{\text{mean}}(t=0)}{d_{\text{mean}}(t)} \times 100\% \quad (4.4)$$

$d_{\text{mean}} = d_{3,0}$  = volumenbezogener mittlerer Durchmesser der Größenverteilung

Native MFK werden durch die Glykoproteine der Membran, die als sterische Barrieren wirken, stabilisiert. Daher zeigte die Kontrollprobe, zu der keine Protease gegeben worden war, innerhalb der Inkubationszeit von 5 h keine Destabilisierung der MFK. Die Wechselwirkungen zwischen den nativen MFK müssen durch eine Proteolyse der Membranproteine verstärkt werden. Wie vermutet, induzierten unterschiedliche Proteasen eine verschieden starke Zunahme der Größe der MFK (Abb.

4.23). Als Proteasen wurden Proteinase K, Trypsin, Papain und Endoproteinase V8 verwendet. Da diese Enzyme unterschiedliche Spaltstellen in der Aminosäuresequenz von Proteinen haben (siehe Kapitel 7.5), wurde eine Abhängigkeit der Destabilisierung der MFK vom proteolytischen Verdau der einzelnen Membranproteine erwartet.

Die stärkste Destabilisierung induziert Proteinase K, gefolgt von Trypsin und Endoproteinase V8. Ein Papainverdau der Membranproteine zeigt überraschenderweise keinerlei Auswirkung auf die Größenverteilung der MFK.

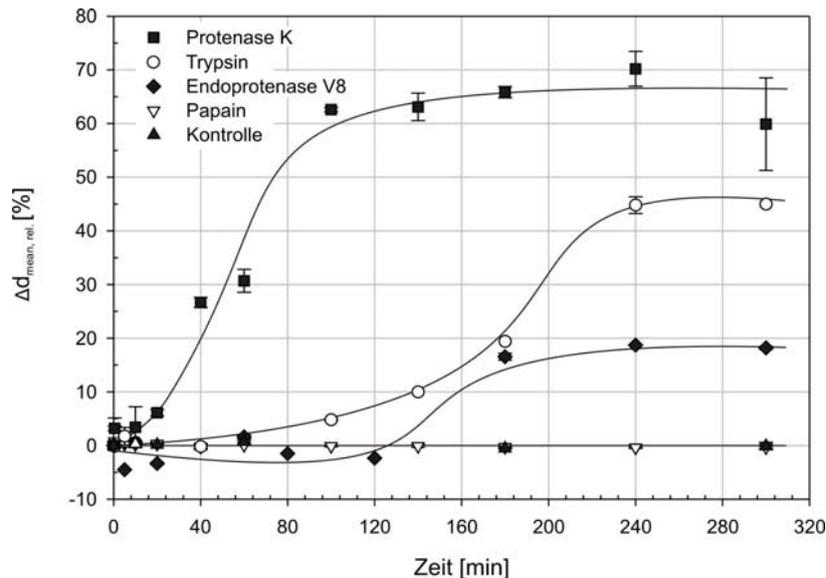


Abb. 4.23: Zunahme des mittleren Durchmessers ( $d_{\text{mean}}$ ) der Partikelgrößenverteilung bei Proteolyse der Membranproteine in 20%igen MFK-Emulsionen mit verschiedenen Proteasen. Messpunkte stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dar ( $n = 2-5$  unabhängige Messungen).

Nach einem steilen Anstieg des mittleren Durchmessers innerhalb von 100 Minuten bei einem Verdau mit Proteinase K verändert sich die Volumengrößenverteilung der MFK praktisch kaum noch, d.h. eine Fusion in nennenswerter Größenordnung findet nicht mehr statt. Vermutlich ist die kinetische Energie der großen, neu entstandenen MFK zu gering, als dass bei einem Zusammentreffen zweier MFK eine weitere Fusion stattfinden kann. Weiterhin nimmt die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens zweier MFK durch die Fusion ab, weil die Anzahl der MFK in einem bestimmten Volumen exponentiell mit der Anzahl der Fusionsereignisse abnimmt. Hierdurch reduziert sich ebenfalls die Wahrscheinlichkeit, dass Fusionsereignisse auftreten können. Im Vergleich mit Proteinase K wurde durch alle anderen verwendeten Proteasen eine schwächere und verzögerte Fusion der MFK erreicht. Wurden die MFKM durch Trypsin hydrolysiert, trat eine verzögerte Fusion nach 40-60 min auf. Die Zunahme des mittleren Partikeldurchmessers stieg langsam im Verlauf von 180 min, beschleunigte sich dann und kam nach 240 min fast zum Stillstand. Durch Endoproteinase V8 wurde eine Fusion der MFK erst ab 120-140 Minuten initiiert. Ebenso war das Ausmaß der Destabilisierung im Vergleich zu Proteinase K und Trypsin wesentlich

geringer. Endoproteinase V8 induzierte eine Zunahme von ca. 20 % des mittleren Partikeldurchmessers der Volumenverteilung der MFK im Vergleich zur Kontrollprobe.

Um den Abbau der Membranproteine mit einer Fusion zu korrelieren, wurde der Abbau der Membranproteine der MFKM durch die verwendeten Enzyme mittels SDS-PAGE nachgewiesen. Die Ergebnisse dazu werden im Folgenden beschrieben.

### **4.4.2 Enzymatischer Verdau der MFKM-Proteine**

Die Proteolyse der Membranproteine wurde durch Zugabe des jeweiligen Enzyminhibitors nach verschiedenen Zeitintervallen gestoppt, um einen Zusammenhang zwischen der Abbaukinetik der MFKM-Proteine und der Fusion der MFK nachzuweisen. Die benutzten Enzyme haben unterschiedliche Schneidemuster in einer Aminosäuresequenz, so dass die gleichen Proteine durch die unterschiedlichen Enzyme verschieden stark abgebaut werden sollten. Es wurden nur die Hauptproteine (MUC1, XDH, MUC15, CD36, BTN, ADPH und PAS 6/7) der MFK durch SDS-PAGE quantifiziert. Je nach verwendeter Nachweismethode können zwar noch bis zu 85 weitere membranintegrierte Proteine in der MFKM nachgewiesen werden. Allerdings sind diese Proteine nur minore Bestandteile der Membran und haben aufgrund ihrer geringen Konzentration vermutlich keine Funktion als fusionshemmende Membrankomponenten. Auch können diese Proteine nicht durch Coomassie-Brillant-Blau gefärbte SDS-Gele nachgewiesen werden.

Zunächst wurden die noch in der MFKM vorhandenen Proteine mittels SDS-PAGE voneinander getrennt. Dies ermöglichte die optische Verfolgung und die Kontrolle des Abbaus der einzelnen MFKM-Proteine. Nach der gelelektrophoretischen Trennung der MFKM-Proteine wurden die Gele mit Coomassie eingefärbt, entfärbt und anschließend eingescannt, und die Proteinbanden mittels eindimensionaler densitometrischer Analyse der Gele quantifiziert.

Beispielhaft für die analysierten SDS-Gele repräsentiert Abb. 4.24 das optische Muster einer Hydrolyse der MFKM durch Trypsin. Die Membranproteine MUC1, XDH, MUC15, CD36, BTN, ADPH und PAS6/7 der nativen MFKM wurden durch ihre Molekularmassen identifiziert. Zusätzlich wurden die erhaltenen Proteinbanden mit publizierten SDS-Gelen von MATHER [2000] und YE [2002] verglichen. Hierdurch konnten zunächst qualitativ die einzelnen Proteinbanden einzelnen MFKM-Proteinen zugeordnet werden. Um jedoch gesicherte Ergebnisse zu erhalten, welches der Membranproteine der MFK einen sterischen Schutz der MFK gegenüber einer Destabilisierung des Emulsionssystems bewirkt, wurden die Proteinbanden in den SDS-Gelen durch einen In-Gel-Verdau der Proteinbanden, eine Peptidbestimmung durch MS und anschließenden Peptidfragmentvergleich identifiziert.

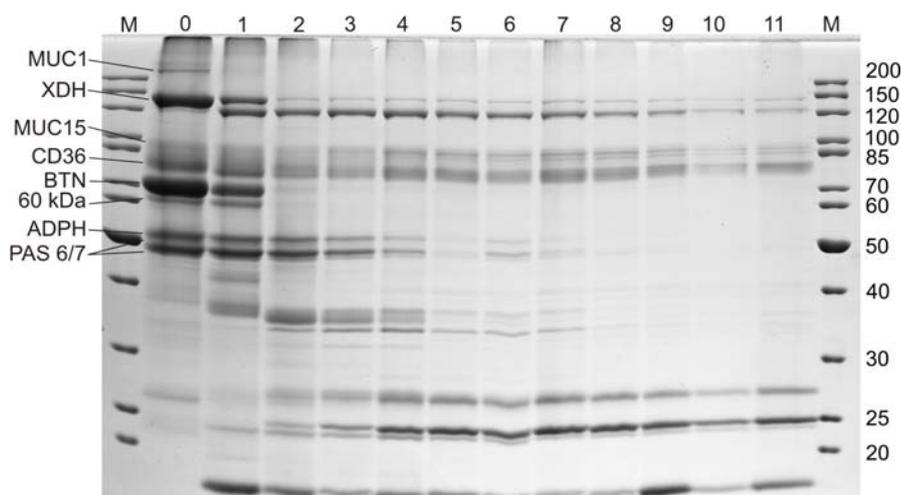


Abb. 4.24: SDS-Gel der MFKM-Proteine in isolierten MFK nach dem Verdau der Membranproteine mit Trypsin. Bande M = Molekularmarker; Banden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 11 repräsentieren 0, 0,5, 5, 10, 20, 40, 60, 100, 140, 180, 240 und 300 Minuten des tryptischen Verdaus. Die Identifizierung der MFKM-Proteine erfolgte mit den in Kapitel 4.4.3 beschriebenen Ergebnissen.

#### 4.4.3 Verifizierung der MFKM-Proteinbanden der SDS-PAGE durch MS

Zur Verifizierung der Proteinbanden in den SDS-Gelen, die den verschiedenen MFKM Hauptproteinen aufgrund der gemessenen Molekularmassen zugeordnet wurden, wurden die verschiedenen Proteinbanden aus einem SDS-Gel ausgeschnitten und ein In-Gel-Verdau mit Trypsin durchgeführt. Die erhaltenen Peptidextrakte wurden per MS vermessen, und die Masse der verschiedenen Peptidfragmente bestimmt. Für die Identifizierung der Proteine anhand der erhaltenen Peptide wurde der ExPASy Proteomics Server [EXPASY, 2007] genutzt.

Die Proteine XDH und BTN sowie ein 60 kDa Fragment von BTN konnten eindeutig durch einen Vergleich der erhaltenen Peptidfragmente mit den theoretisch zu erwartenden Peptidfragmenten identifiziert werden (Tab. 4.2). Für MUC1 wurde kein passendes Peptid, für MUC15 zwei und für CD36 ein passendes Peptid gefunden, so dass keine Identifizierung dieser Proteine durch den In-Gel-Verdau möglich war. Vermutlich stört die starke Glykolysierung von MUC1, MUC15 und CD36 die MS-Bestimmung der Peptidfragmente dieser Proteine. Auch die geringe Konzentration der Proteine in der Membran der MFK kann Ursache für die fehlende Identifizierung sein.

Wurde ein Gelstück bei ca. 46 kDa aus einem SDS-Gel ausgeschnitten, der Verdau durchgeführt und die Peptidfragmente per MS bestimmt, wurden sowohl Peptidfragmente von ADPH als auch von PAS 6/7 gefunden. Für APDH wurden nur drei Peptide bestimmt, jedoch war die maximale Abweichung der gemessenen Peptidmassen 0.04 Da, so dass dieses Protein auch durch nur 3 Peptide identifiziert werden konnte. Wie von KEENAN und MATHER [2006] und MATHER [2000] beschrieben, migrierte PAS 6/7 als eine Doppelbande im SDS-Gel bei 46 und 42 kDa. APDH, welches ein Molekulargewicht von 49 kDa hat, migrierte mit der oberen Bande von PAS 6/7. Eine Unterscheidung zwischen ADPH und der oberen Bande von PAS 6/7 konnte bei der folgenden

Betrachtung des Abbaus der einzelnen MFKM-Proteine deshalb nicht erfolgen, so dass diese zusammengefasst worden sind. 5 von 8 relevanten Proteinbanden konnten aufgrund der Peptid-identifizierung MFKM-Proteinen zugeordnet werden. Daher konnten die nicht durch Peptid-fragmente identifizierten Membranproteine MUC1, MUC15 und CD36 durch ihre Molekularmasse im SDS-Gel genau bestimmt werden. Durch die Identifizierung der Proteinbanden in den SDS-Gelen konnte darauffolgend die densitometrische Auswertung der Gele erfolgen, daraus konnten die Verdaukinetiken der Membranproteine erstellt werden.

Tab. 4.2: Identifizierung der MFKM-Proteine durch Peptidfragmente aus dem In-Gel-Verdau

MFKM Protein	MW im Gel <sup>A</sup>	Passende Peptide <sup>B</sup>	Sequenzabdeckung	SwissProt ID <sup>C</sup>	MW
MUC1	209,7 ± 3,89	-	keine Identifizierung	Q8WML4	58091
XDH	146,7 ± 2,9	13	11 %	P80457	146681
MUC15	90,9 ± 1,25	2	keine Identifizierung	Q8MI01	35715
CD36	76,1 ± 1,0	1	keine Identifizierung	P26201	52737
BTN	62,3 ± 0,87	6	20 %	P18892	59276
60 kDa	57,3 ± 1,15	9	22 %	Fragment von BTN	
ADPH	46,0 ± 0,53	3	10 %	Q9TUM6	49368
PAS 6/7	46,0 ± 0,53	7	19 %	Q95114	47411
	41,8 ± 0,65	12	36 %	Q95114	47411

<sup>A</sup> Mittelwert in kDa ± Standardabweichung (n = 16)

<sup>B</sup> Die Abweichung der bestimmten Peptidmassen zu den theoretischen Massen betrug maximal ± 0.05 Da

<sup>C</sup> Ordnungsnummer von UniProt Sequenzdatenbank [UNIPROT]

#### 4.4.4 Hydrolyse des Gesamtproteins der MFKM

In diesem Kapitel wird ein Zusammenhang zwischen der Fusion der MFK und dem Abbau der MFKM-Proteine untersucht. Zunächst wird der qualitative Abbau der Membranproteine am Beispiel der Hydrolyse der Membranproteine durch Trypsin beschrieben, wie in Abb. 4.24 dargestellt ist. Anschließend wird der Abbau des Gesamtproteins der MFK mit der Fusion der MFK verglichen.

Deutlich ist der zeitliche Verlauf des Abbaus der Membranproteine im Vergleich zur Kontrollprobe (t = 0) in Abb. 4.24 zu erkennen. MUC1 und BTN werden schlagartig nach Zugabe von Trypsin hydrolysiert und sind nach 5 Minuten Inkubation nicht mehr in der MFKM nachzuweisen. ADPH und PAS 6/7 werden innerhalb von 60 Minuten durch Trypsin abgebaut. XDH, MUC15 und CD36 werden nur langsam bzw. nur teilweise durch Trypsin hydrolysiert. Gut sichtbar im Gel sind auch verschiedene partiell abgebaute, noch in die Membran integrierte Proteinfragmente. Überraschend ist, dass Trypsin auch Zugang zu auf der Membraninnenseite liegenden Proteinen wie XDH und

ADPH hat und diese abbaut, obwohl die Membran der nativen MFK eine Phospholipiddoppelschicht darstellt.

Für die Korrelation des Proteinabbaus mit der Fusion der MFK wurden die rel. Proteinkonzentrationen der verschiedenen Hauptproteine mittels der densitometrischen Auswertung der Gele bestimmt. Hierdurch konnte die Kinetik der Abnahme der rel. Gesamtmembranproteinkonzentration sowie die der einzelnen MFKM-Proteine ermittelt werden. Die rel. Proteinkonzentrationen wurden mit folgender Gleichung berechnet.

$$\frac{C_t}{C_0} = \frac{\sum C [\text{MFKM Proteine } (t)]}{\sum C [\text{MFKM Proteine } (t = 0)]} \quad \text{oder} \quad \frac{C_t}{C_0} = \frac{C [\text{MFKM Protein } (t)]}{C [\text{MFKM Protein } (t = 0)]} \quad (4.5)$$

$C_t$  = rel. Proteinkonzentration zum Zeitpunkt  $t$ ,  $C_0$  = rel. Proteinkonzentration der unverdauten MFKM

In Abb. 4.25 ist die rel. Gesamtmembranproteinkonzentration der MFK in Abhängigkeit der Zeit und der verschiedenen Proteasen dargestellt. Wie vermutet, baut Proteinase K innerhalb der ersten 10 Minuten 80 % der Membranproteine der MFK ab. Trypsin wirkt ähnlich stark hydrolysierend auf die Membranproteine der MFK und baut innerhalb von 40 Minuten 80 % der Proteine ab. Die verbleibenden Membranproteine werden von Proteinase K und Trypsin nur noch langsam abgebaut. Die Abbaukinetik von Endoproteinase V8 verläuft wesentlich langsamer als bei Trypsin und Proteinase K. Jedoch hydrolysiert auch Endoproteinase V8 über 80 % der Membranproteine, dies allerdings erst nach 5 Stunden Inkubation.

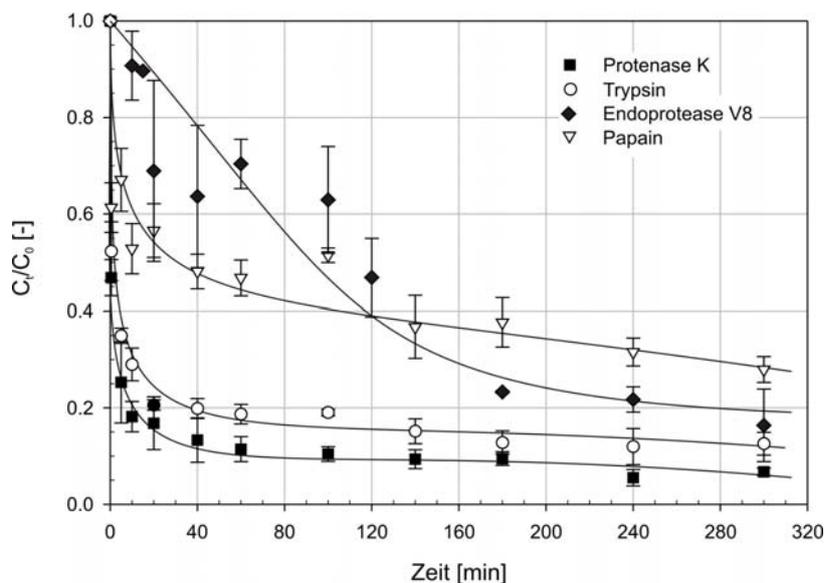


Abb. 4.25: Abnahme der rel. Gesamtmembranproteinkonzentration von MFK, bestimmt durch SDS-PAGE durch Proteolyse der MFKM mit verschiedenen Proteasen. Die eingezeichneten Kurven verdeutlichen den Proteolyseverlauf. Messpunkte stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dar ( $n = 3-5$  unabhängige Bestimmungen).

Aus der Abnahme der rel. Proteinkonzentration wird deutlich, dass auch Papain eine proteolytische Wirkung auf die MFKM-Proteine hat. Jedoch hat in diesem Fall der Abbau der MFKM-Proteine keinen Einfluss auf die Destabilisierung der MFKM, bzw. hat die Glykokalyx die Funktion als Fusionsbarriere noch nicht verloren, obwohl nach 300 Minuten bis zu 70 % des Membranproteins der MFK durch Papain abgebaut worden ist. Dieser Abbau hat dennoch keine Fusion induzieren können (siehe Abb. 4.23). Vermutlich wirkt ein Protein der Membran, das von Papain nicht abgebaut wird, besonders stabilisierend, so dass dieses Protein die MFK vor einer Fusion schützt.

Aus der Abbaugeschwindigkeit der Gesamtmembranproteinkonzentration können die unterschiedlichen Destabilisierungsgeschwindigkeiten der MFK-Emulsionen durch die verschiedenen Proteasen nicht erklärt werden. Deswegen wurden die Abbaukinetiken der einzelnen Hauptproteine analysiert.

### **4.4.5 Analyse des proteolytischen Verdaus einzelner MFKM-Proteine**

Um den Zusammenhang zwischen den Fusionen der MFK und dem Abbau einzelner MFKM-Proteine zu untersuchen, wurden die Abbaukinetiken einzelner Proteine der MFKM mit den Fusionskinetiken aus den Partikelbestimmungen korreliert. MUC1, XDH und BTN wurden im Vorhinein ausgeschlossen, da entweder ihre Lage bzw. ihre Konzentration innerhalb der MFKM oder aber die qualitative Auswertungen der SDS-Gele gezeigt hatte, dass diese Proteine keine Fusionschutzfunktion in der Membran besitzen können.

XDH ist in der dem Fettkern zugewandten Seite der MFKM lokalisiert und kann hierdurch keine sterische Schutzfunktion haben. BTN und MUC1 konnten durch den Trypsinverdau ausgeschlossen werden (Abb. 4.26 und Tab. 4.3), da die Proteine innerhalb von 5-10 Minuten komplett abgebaut werden, jedoch eine Fusion der MFK durch Trypsin erst nach ca. 60 Minuten induziert wurde.

Dieses Argument gilt nicht für die anderen Hauptproteine der MFKM. MUC15 und CD36 sind beides stark glykolysierte Membranproteine, die somit eine Fusionsbarriere in der Glykokalyx der MFKM, wie von SHIMIZU et al. [1980] vermutet, darstellen könnten. Des Weiteren könnten auch ADPH und PAS 6/7 die gesuchte Funktion haben. PAS 6/7 ist ein extrinsisches Protein, welches an der Phospholipiddoppelschicht assoziiert ist und leicht von der Membran dissoziiert, wenn die MFKM aufgrund von hohen Salzkonzentrationen destabilisiert wird [MATHER, 2000]. In Abb. 4.26 sind daher nur der Abbau von MUC15, CD36, ADPH/obere Bande PAS 6/7 und von der unteren Bande PAS 6/7 dargestellt.

Wird der Abbau von CD36 und MUC15 mit dem Beginn der Fusion verglichen (siehe Inset in Abb. 4.26 D und Tab. 4.3), so ist keine Korrelation zwischen dem Abbau der Proteine und dem unterschiedlichen Start der Fusion der MFK festzustellen. Die Proteine werden von den unterschiedlichen Proteinasen in einem zu großen Maße mit ähnlicher Geschwindigkeit und Stärke abgebaut, als dass die unterschiedlichen Destabilisierungsgeschwindigkeiten erklärt werden könnten. So baut auch Papain beide Proteine innerhalb von 300 Minuten zu 60-70% ab, ohne dass dies jedoch eine Fusion zur Folge hat. Somit haben CD36 und MUC15 keine fusionshemmende Wirkung in der MFKM.

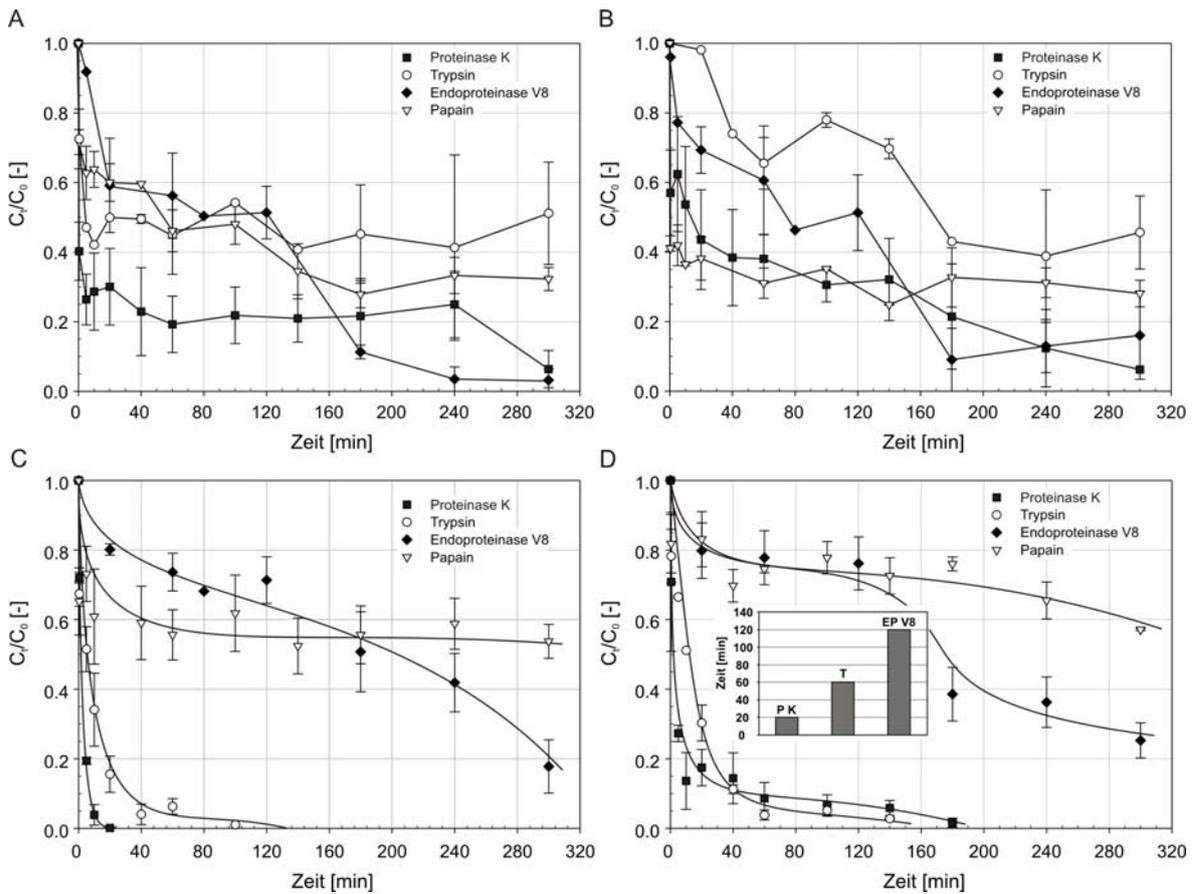


Abb. 4.26: Abbau von CD36 (A), MUC15 (B), ADPH/obere Bande PAS 6/7 (C) und untere Bande PAS 6/7 (D) in der MFKM durch Proteinase K, Trypsin, Endoprotease V8 und Papain. Messpunkte stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler dar ( $n = 3-5$  unabhängige Bestimmungen). Inset in D, Fusionsbeginn der MFK nach Inkubation mit Proteinase K (P K), Trypsin (T) und Endoprotease V8 (EP V8).

Tab. 4.3: Zusammenhang zwischen proteolytischem Abbau der MFKM-Proteine einer Fusion der MFK

Abbau/Fusion	MUC1	XDH	MUC15	CD36	BTN	ADPH/obere Bande PAS 6/7	untere Bande PAS 6/7
Proteinase K	++/↑↑	++/↑↑	+/↑↑	+/↑	++/↑↑	++/↑↑	++/↑↑
Trypsin	++/↑	+/↑	±/↑	±/↑	++/↑	+/↑	+/↑
Endoprotease V8	±/→	+/→	+/→	+/→	+/→	±/→	±/→
Papain	±/×	+/×	+/×	+/×	+/×	±/×	-/×

++ leicht verdaut; + verdaut; ± rel. resistent oder teilweise abgebaut; - resistent gegen Abbau

↑↑ starke Fusion; ↑ Fusion; → schwache Fusion; × keine Fusion

Wird dagegen der Abbau von ADPH/obere Bande von PAS 6/7 und der unteren Bande von PAS 6/7 durch Papain mit dem anderer Protenasen verglichen, so wird deutlich, dass Papain diese Proteine nicht bzw. nur zu 30-40 % abbaut.

Besonders Proteinase K und Trypsin, die beide eine starke Fusion der MFK induzieren, bauen diese Proteine schnell ab. Endoproteinase V8 baut diese Proteine wesentlich langsamer ab, was die verzögerte Induzierung der Fusion durch diese Protenase erklären könnte. Auffällig ist, dass nach 120 Minuten Inkubation Endoproteinase V8 die rel. Proteinkonzentration von PAS 6/7 in der MFKM halbiert (von 80% auf 40%), so dass dies vermutlich die Ursache für die beginnende Fusion der MFK ist (Abb. 4.26 D).

Wird der Zusammenhang zwischen dem proteolytischen Verdau der unterschiedlichen MFKM-Proteine und der Fusion der MFK betrachtet (Tab. 4.3), so kann behauptet werden, dass die Stabilität der MFK hauptsächlich durch die Membranproteine ADPH und PAS 6/7 gewährleistet wird. Diese Proteine scheinen die nativen MFK vor einer Fusion zu schützen, wie in Kapitel 5.3 diskutiert wird.

## 5 Diskussion

### 5.1 Integration von fluoreszenzmarkierten Lipiden in die MFKM und Charakterisierung des Einbaus der Lipide in die Membran der MFK

Das Hauptaugenmerk der Untersuchungen lag zu Beginn dieser Arbeit auf der Markierung der aus Rohmilch isolierten MFK mit fluoreszenzmarkierten Phospholipiden. Die Integration der an Phosphoethanolamin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe NBD und Rhodamin in die Membran der MFK und die Charakterisierung der Integration der Lipide in die Membran waren Grundvoraussetzungen zum Erreichen des gestellten Ziels der Arbeit. Hierfür wurde zunächst eine Markierungsmethode entwickelt, mit der die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe in die MFKM eingebaut werden konnten.

Die Integration der fluoreszenzmarkierten Lipide, die mittels der entwickelten Markierungsmethode in die Membran der MFK eingefügt wurden, sollte aufgrund der Abhängigkeit der Effizienz des Energieübertrags des FRET des verwendeten Donor-Akzeptor-Paares von der Konzentration der fluoreszenzmarkierten Lipide in biologischen Membran bewiesen werden. Die Abhängigkeit der Effizienz des Energietransfers von der Anzahl der NBD-PE- und Rh-PE-Moleküle in den Membranen von Liposomen konnten STRUCK et al. [1981] zeigen. Daher wurde erwartet, dass dieser Zusammenhang auch bei mit NBD- und Rh-PE markierten MFKM gilt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden MFK mit unterschiedlichen Konzentrationen von NBD-PE und Rh-PE markiert und die Effizienz des Energieübertrags von NBD zu Rhodamin bestimmt. Hierfür musste die NBD-Fluoreszenz der MFK bekannt sein, da die Effizienz des Energieübertrags bei unbekanntem molekularem Abstand  $R$  zwischen Donor und Akzeptor mittels Gleichung (4.1) berechnet wird.

Die Farbstoffe für den FRET im „klassischen“ Liposomensystem werden mit einer Konzentration von 0.8 % (mol Markerlipide/mol Phospholipide) eingesetzt [HOFMANN, 2005; HOFMANN et al., 2004]. Mit dieser verwendeten Farbstoffkonzentration kann mit dem FRET sensitiv die Aggregation und Fusion von Liposomen erfasst werden. Wie Veröffentlichungen gezeigt haben [BITMAN und WOOD, 1990; JENSEN und NEWBURG, 1995], variiert die Phospholipidkonzentration von MFK im Gegensatz zu einem in-vitro-System erheblich. Aufgrund dieser starken Schwankungen konnte keine allgemein gültige Phospholipidkonzentration für die isolierten MFK angenommen werden. Eigene Untersuchungen bestimmten eine durchschnittliche Phospholipidkonzentration in der MFKM von 0,6 %, so dass dieser Wert als Referenzwert für die Phospholipidkonzentration der MFKM benutzt wurde. Eine jeweils neue Phospholipidbestimmung der MFKM nach der Isolierung der MFK aus Rohmilch hätte zwar die saisonalen Änderungen in der MFKM berücksichtigt, war aber

aufgrund des experimentellen Aufwandes vor dem eigentlichen Markierungsprozess nicht praktikabel.

Wie fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen gezeigt haben (Abb. 4.3), konnten MFK durch die an PE kovalent gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe NDB und Rhodamin mittels der entwickelten Markierungsmethode fluoreszenzmarkiert werden. Da zur Bestimmung des FRET-Effektes die NBD-Fluoreszenz quantitativ erfasst werden musste, wurde die Fluoreszenz der markierten MFK mit einem Spektralfluorimeter untersucht und das Fluoreszenzspektrum mit dem von Standardliposomen verglichen. Der qualitative Vergleich des Spektrums von FRET-MFK mit dem der Standardliposomen zeigte, dass die an PE gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe NDB und Rhodamin so in die Membran integriert werden, dass FRET zwischen NBD und Rhodamin auftritt, wenn NBD in der MFKM bei 460 nm angeregt wird. Die Rhodaminemission der FRET-MFK war bei einer sechsfach höheren Konzentration der Markerlipide in den MFK gegenüber der Markerlipidkonzentration in den Standardliposomen in den verdünnten Proben (FRET-MFK 0,9 nM, Standardliposomen 0,15 nM) um ca. das 2,5fache geringer als die Rhodaminemission der Standardliposomen. Entweder ist die Effizienz des Energieübertrags von Donor zum Akzeptor in der MFKM wesentlich ineffektiver als bei den Standardliposomen oder die Fluoreszenz der MFK wurde durch Lichtstreuung und Adsorption beeinträchtigt, die auftreten, wenn disperse Systeme mit monochromatischem Licht bestrahlt werden. Wird ein solches System mit Licht bestrahlt, tritt immer multiple Streuung auf, d. h., das eingestrahlte Licht und die Fluoreszenzemission werden mehrmals durch die in der Lösung dispergierten Teilchen gestreut. Diese Effekte müssen für die korrekte Bestimmung der Fluoreszenz in verdünnten dispersen Systemen durch an das jeweilige Bestimmungssystem angepasste Annäherungen berücksichtigt werden [TAKAM MANGOVA, 2002]. Daher ist die Quantifizierung der Fluoreszenz in dispersen Systemen sehr aufwendig, so dass durch ein Spektralfluorimeter die NBD-Fluoreszenz aufgrund der hohen Absorption und Streuung der verdünnten MFK-Emulsionen nicht korrekt bestimmt werden kann.

Zusätzlich wird, wie später noch genauer diskutiert wird, die NBD-Fluoreszenz vermutlich durch MFKM Komponenten beeinflusst. Dies ist möglicherweise eine weitere Ursache für die problematische Quantifizierung der NBD-Fluoreszenz mittels der Fluoreszenzspektroskopie.

Ein weiteres Argument gegen die Verwendung eines Fluoreszenzspektrometers war, dass die Fluoreszenz der MFK in einem dynamischen System untersucht werden sollte. Bei der Destabilisierung eines Emulsionssystems verändert sich die Anzahl der Partikel pro Volumen über die Zeit, so dass die Streuung und Absorption, die von der Anzahl der Partikel und deren Größe abhängig ist [RÄTY und PEIPONEN, 1999], ebenfalls verändert wird. Demzufolge konnte nicht davon ausgegangen werden, dass die Absorption und Streuung der MFK über die Zeit konstant ist. Diese Parameter müssten, wie oben gezeigt, bei der NBD-Fluoreszenzbestimmung während der Messungen mit einem Fluoreszenzspektrometer berücksichtigt werden. Die NBD-Fluoreszenz muss dabei nach HOEKSTRA und DÜZGÜNES [1993] zeitaufgelöst bestimmbar sein, wenn ein Aggregations- und Fusionsprozess über diese optische Eigenschaft quantifiziert werden soll. Um dieses Problem

zu lösen, wurde ein Messsystem verwendet, das die Fluoreszenz von einzelnen Partikeln aus dispersen Systemen vermessen kann.

Die optischen Probleme der Fluoreszenzbestimmung in dispersen Systemen konnten eliminiert werden, indem die rel. Fluoreszenz der MFK mittels der Durchfluscytometrie quantifiziert wurde. Diese Messmethode hat sich als sehr geeignet erwiesen, um die optischen Eigenschaften von Zellsuspensionen zu bestimmen [ORMEROD, 1994; SHAPIRO, 2005], wobei die Messparameter flexibel den jeweiligen Anforderungen angepasst werden können. NBD-MFK, Rh-MFK, FRET-MFK und unmarkierte MFK lassen sich anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften durch eine durchfluscytometrische Messung unterscheiden, wie Abb. 4.5 zeigt, wobei die NBD-Fluoreszenz der jeweiligen MFK-Population quantifiziert werden kann. Somit konnte die Berechnung der Effizienz des Energietransfers von NDB zu Rhodamin in der MFKM erfolgen.

Die Bestimmung des FRET in den mit NBD-PE und Rh-PE markierten MFK erfolgte aus zwei Gründen: Zuerst wurde die Integration der an PE gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe in die Membran der MFK überprüft. Darauf aufbauend sollte die Fusion der MFK, die den FRET in der MFKM beeinflusst, mit diesem strahlungslosen Energieübertrag charakterisiert werden. Wie Abb. 5.1 zeigt, ist der FRET stark abhängig vom Abstand der Fluorophore, so dass dieser Effekt auch als ein Art molekulares Lineal verwendet werden kann [STRYER und HAUGLAND, 1967].

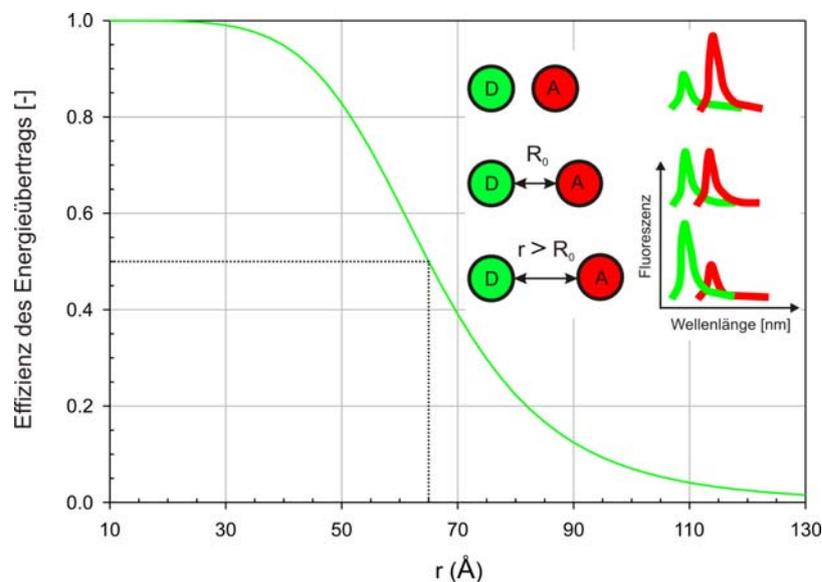


Abb. 5.1: Theoretische Effizienz des Energieübertrags von NDB auf Rhodamin in Abhängigkeit des molekularen Abstandes der Fluoreszenzfarbstoffe ( $R_0 = 65 \text{ \AA}$  [DÜZGÜNES et al., 1987]).

Werden durch den Markierungsprozess NBD-PE und Rh-PE in unterschiedlichen Konzentrationen in die Membran der MFK eingebaut, so ergibt sich eine Abhängigkeit der Effizienz des

Energietransfers von der Konzentration der NBD- und Rh-PE-Moleküle. Daraus kann geschlossen werden, dass die PE-Moleküle in die Membran der MFK richtig integriert werden und der in Abb. 5.1 gezeigte Zusammenhang für den Energietransfer in den MFKM gilt. Steigt die Anzahl der Farbstoffmoleküle in der MFKM, sinkt der Abstand zwischen den Fluoreszenzmolekülen auf der Membran, und die Effizienz des FRET-Effektes nimmt zu.

Überraschenderweise bedecken die Fluoreszenzfarbstoffmoleküle die MFKM sogar dann, wenn die hydrierten Farbstoffvesikel mit den isolierten MFK bei 0 °C gemischt werden. Da die Membran aufgrund der Phasenübergangstemperatur der Phospholipidseitenketten gefroren ist, kann kein Verdünnungseffekt beobachtet werden. Vermutlich aggregieren die Farbstoffvesikel mit der MFKM bzw. absorbieren an hydrophobe Stellen der MFKM. Wie später noch diskutiert wird (Kapitel 5.3), scheint die MFKM keine wirklich kompakte und geschlossene Phospholipiddoppelschicht zu sein, da die Farbstoffvesikel in Wechselwirkung mit der Membran treten können. Die MFKM soll jedoch durch die verwendete Isolationsmethode [PATTON und HUSTON, 1986] nicht beschädigt werden [MICHALSKI et al., 2002a]. Die Autoren zeigten, dass mit der benutzten Isolationsmethode gewonnene MFK in ihrer Membranzusammensetzung unverändert waren, da keine Unterschiede des Zeta-Potentials der isolierten MFK und MFK in Rohmilch festgestellt werden konnten. Eigene SDS-PAGE-Untersuchungen (siehe Kapitel 4.4 in Abb. 4.24) haben alle Hauptproteine der MFK in den isolierten MFK (Nullprobe) nachgewiesen, so dass von einer intakten MFKM ausgegangen werden kann. Wie in Kapitel 5.3 diskutiert, hat die MFKM jedoch eher eine gebrochene Struktur. Möglicherweise können die Farbstoffvesikel daher bei 0 °C mit den Membranproteinen der MFK bzw. der Phospholipiddoppelschicht interagieren und so an die Membran binden.

Wie in Abb. 4.6 gezeigt wurde, müssen für einen Energieübertrag von 50 % ca. 2.0 mol% Markerlipide in die MFKM eingebaut werden. STRUCK et al. [1981] zeigten, dass in Liposomen mit 1,0 mol% NBD-PE und Rh-PE ca. 80 % Energietransfer stattfindet. Von einer etwas geringeren Transfereffizienz (ca. 65% Energietransfer) für 1,0 mol% NBD-PE und Rh-PE in synthetischen Phospholipiddoppelmembranen berichteten MALININ et al. [2001]. Für menschliche rote Blutzellen, die mit 1 mol% NBD-PC und Rh-PE markiert wurden, haben CONNOR und SCHROIT [1987] eine Effizienz des Energietransfers von 40 % bestimmt. Dieser Wert für ein natürliches Membransystem stimmt gut mit der erhaltenen Energietransfereffizienz für MFKM mit 1 mol% NBD-PE und Rh-PE überein.

Die Phospholipiddoppelschicht von synthetischen Liposomen ist wesentlich einfacher aufgebaut als die von MFK. Im Gegensatz zu den Membranen der Liposomen, die in der Regel aus Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin bestehen, enthält die MFKM noch Phosphatidylinositol, Glycosphingolipide, Cholesterol, Neutralfette und bis zu 60 % membrangebundene Proteine. Vermutlich beeinflussen diese Membrankomponenten die spektroskopischen Eigenschaften der verwendeten Fluorophore. Die NBD-Fluoreszenz ist sehr sensitiv gegenüber der Umgebung des Fluorophors und polaritäts- und pH-abhängig

[CHATTOPADHYAY, 1990]. MICHALSKI et al. [2007] zeigten, dass die Milchfettkugelmembran wasserbindend ist. Da NBD in wässrigen Suspensionen praktisch nicht fluoresziert, beeinflusst möglicherweise die Hydrierung der Membran, hervorgerufen durch die Glykokalyx der MFKM, die spektralen Eigenschaften von NBD und erklärt die geringe Energietransfereffizienz trotz hoher Konzentration von NBD- und Rh-PE in der MFKM. Nach CHATTOHADHYAY befindet sich die NBD-Gruppe von NBD-PE in der polaren Region von Phospholipiddoppelmembranen, so dass eine verringerte NBD-Fluoreszenz aufgrund der Polarität der Phasengrenze der MFKM eine mögliche Erklärung für die geringen Energietransferraten von NBD-PE zu RH-PE ist.

Um die Sensitivität des FRET-Effektes auszunutzen, sollten die markierten MFK zu Beginn der Interaktionsuntersuchungen Energietransfereffizienzen von 60-80% haben. Der molekulare Abstand der Fluorophore ist dabei  $< R_0$ . Vergrößert sich der Abstand zwischen Donor und Akzeptor durch eine Membranfusion, ist  $R > R_0$ , und die höchste Veränderung der NBD-Fluoreszenz wird registriert (siehe Inset in Abb. 5.1). Daher wurden als Standardfluoreszenzfarbstoffkonzentration zur Markierung der MFK 2.8 mol% NBD-PE und RH-PE benutzt, da bei dieser Konzentration der FRET ca. 60 % beträgt und somit  $R < R_0$  ist. Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Auswahl dieser Konzentration war die Tatsache, dass bei durchflusszytometrischen Messungen ein möglichst großer Unterschied in der rel. Fluoreszenz zwischen ungefärbten und gefärbten Proben bestehen sollte. Dies wurde mit der gewählten Standardkonzentration der Fluorophore gewährleistet. Die entwickelte Markierungsmethode erlaubte somit die Integration von NBD-PE und Rh-PE in die Phospholipiddoppelmembran der MFK. Die markierten MFK konnten in den weiteren Experimenten erfolgreich eingesetzt werden.

## 5.2 Erfassung der Aggregation und Fusion von MFK mittels fluoreszenzmarkierten MFK

### 5.2.1 Durchmischung der MFKM bei der Fusion der MFK

Die bisher verwendeten Messsysteme für die Bestimmung der Destabilisierung von MFK-Emulsionen sind nicht in der Lage, die Aggregation und Fusion der MFK auf der molekularen Ebene der MFKM zu bestimmen. Die Mechanismen und Ursachen der Aggregation und Fusion biologischer Systeme können auf molekularer Ebene mittels NBD- und Rh-markierten Phospholipiden evaluiert werden [HOEKSTRA und DÜZGÜNES, 1993]. MFK haben, wie solche biologischen Membransysteme, eine Phospholipiddoppelschicht als Membran. Daher wurde die methodische Strategie entwickelt, mittels des FRETs die Aggregations- und Fusionsprozesse der MFK auf Membranebene zu untersuchen. Um diese methodische Hypothese zu bestätigen, wurden MFK mit NBD-PE und Rh-PE markiert und die Aggregation und Fusion der MFK mittels der Fluoreszenzveränderungen der MFK charakterisiert.

Zu diesem Zweck wurde die Verteilung der lipidkonjugierten Fluoreszenzfarbstoffe während der Fusion der MFK untersucht. Basis dieser Versuche war der in Kapitel 3.2.4.2 detailliert beschriebene Mixing Assay, bei dem NBD-markierte und Rh-markierte MFK miteinander gemischt werden. Die Verteilung der Fluoreszenzfarbstoffe während der Fusion der MFK wurde mittels der Fluoreszenzmikroskopie verfolgt. Die Fusion von MFK kann aufgrund der fluoreszenzmikroskopischen Bilder durch drei Phasen charakterisiert werden:

- A. Annäherung und Aggregation der MFK, wobei die MFKM der Emulsionströpfchen noch separat vorliegen,
- B. Verschmelzung der äußeren Membranen der Phospholipiddoppelschicht zur Hemifusion,
- C. Übergang vom Fusionsintermediats in eine vollständige Fusion der MFK.

Hieraus können zwei Schlussfolgerungen gezogen werden. Erstens ist die MFKM vermutlich trotz ihrer Komplexität eine fluidale mosaikartige Biomembran nach dem Modell von SINGER und NICOLSON [1972, zit. nach VENTUROLI et al., 2006], und zweitens ist der Fusionsprozess ähnlich wie bei einer „einfachen“ Liposomenfusion aufgebaut. Die Diffusion von NBD-PE und Rh-PE während der Hemifusion kann nur erfolgt sein, weil die MFKM bei Temperaturen über der Phasengrenze von 8-18.3 °C kein starres Membransystem ist. Die MFKM ist so flexibel, dass während der Aggregation, Hemifusion und Fusion der MFK eine Umorganisation der Membrankomponenten erfolgen kann. Bevor diese Vorgänge im Einzelnen beschrieben werden, muss zunächst die Antriebsenergie für die beobachtete Aggregation und Fusion der MFK diskutiert werden.

Wie festgestellt wurde, zeigten die MFK eine calciuminduzierte Fusion. Dieses Phänomen wurde in den bisherigen Veröffentlichungen nicht erwähnt. Calcium ist ein divalentes Kation, das in Milch in

einem kompliziert geregelten Gleichgewichtssystem vorliegt, so dass die freie Calciumionenkonzentration in Milch nahezu konstant ca. 9 mM beträgt [NEVILLE et al., 1995]. Bei dieser  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration zeigten die MFK keine Aggregation und Fusion, wie anhand der Kontrollmessungen beobachtet werden konnte. Wurde die freie Calciumkonzentration jedoch um 5 mM erhöht, konnte eine Aggregation und Fusion der MFK festgestellt werden. Dies zeigt, dass die Membran der MFK calciumsensitiv ist. Möglicherweise ist diese veränderte Eigenschaft der Membran durch die Markierung der MFKM hervorgerufen worden. Es ist eindeutig, dass MFK nicht durch eine in der Milch natürlich vorkommende  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration destabilisiert wird, da Milch sonst ein höchst instabiles Emulsionssystem wäre. Bisher wurde eine calcium-induzierbare Fusion nur für die Mikrolipidtröpfchen nachgewiesen, die als Vorläufer der MFK im Cytosol der Milchepithelzellen vorkommen [VALIVULLAH et al., 1988]. Die Membran dieser Mikrolipidtröpfchen ist jedoch anders aufgebaut als die der sekretierten MFK und weist keine Lipidbilayerstruktur auf [KEENAN und DYLEWSKI, 1995], so dass diese Fusion nur bedingt mit der von sekretierten MFK verglichen werden kann.

Die Phospholipiddoppelschicht der MFKM enthält etwa 6 % negativ geladene Phospholipide ( $\sim 4$  % PS und  $\sim 2$  % LS) und besitzt ein negatives  $\zeta$ -Potential von -14 mV. Diese negative Ladung und die Glykokalyx der MFKM, aufgebaut aus den Glycolipiden und glykolisierten Membranproteinen, sind für die abstoßenden und stabilisierenden Kräfte der MFKM verantwortlich. In vielen Publikationen konnte gezeigt werden, dass  $\text{Ca}^{2+}$  mit dem negativ geladenen PS im Lipidbilayer interagiert und somit die Fusion von PS enthaltenden Phospholipiddoppelschichten ermöglicht [HOEKSTRA, 1982; MORRIS et al., 1985; OHKI und ARNOLD, 2000; PAPAHAJDOPOULOS et al., 1988; WILSCHUT et al., 1985]. Durch die Zugabe von Calciumionen werden die Lipidbilayer dehydratisiert, so dass der molekulare Kontakt der sich sonst abstoßenden Membranen erreicht und die Fusion hierdurch induziert wird. Der Fusionsprozess der MFK ist vermutlich auf ein ähnliches Prinzip aufgebaut. Erstaunlich ist, dass die MFKM, die aus innerem Monolayer, cytosolischem Raum und dem Lipidbilayer besteht, flexibel und dynamisch genug ist, um einen Fusionsprozess zu durchlaufen. Die Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration bewirkt vermutlich eine Bindung der Calciumionen an die MFKM. Hierdurch können die Membraneigenschaften verändert werden. Die Membran wird hydrophober und die abstoßende Hydrathülle der MFK kleiner. Dadurch wird eine starke Adhäsion der MFKM bei einem zufälligen Trefferereignis, das aus der hohen Dichte der MFK pro Volumeneinheit resultiert, ermöglicht. Es tritt eine Deformation und Destabilisierung der Phospholipiddoppelschicht auf. Die Membranlipide mischen sich während der Hemifusion. Dies führt wiederum zur vollständigen Fusion der MFK. Nach der Fusion verteilen sich die Membrankomponenten durch eine Lateral-diffusion auf der vergrößerten Membranoberfläche, wie auf den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen beobachtet werden konnte. Auf Basis dieser Beobachtungen konnte die geschlossen werden, dass sich bei der Fusion der MFK die lipidkonjugierten Fluoreszenzfarbstoffe verdünnen und somit die Fusion der MFK mittels der Veränderung der Fluoreszenzeigenschaften von NBD- und Rh-PE ermittelt werden kann.

### 5.2.2 Quantifizierung der Aggregation und Fusion – Mixing versus Diluting Assay

Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnte die Fusion von NBD-markierten und Rh-markierten MFK beobachtet werden. Jedoch wird NBD durch eine kontinuierliche Bestrahlung während der Fluoreszenzmikroskopie photoebleicht, was sich als Problem für die Quantifizierung der Interaktion mit NBD-konjugierten Phospholipiden mittels der Fluoreszenzmikroskopie erweist [CHATTOPADHYAY, 1990; USTER und PAGANO, 1986]. Für die Quantifizierung der Aggregation und Fusion der MFK wurden daher durchflusscytometrische Messungen eingesetzt. Hierbei stand zunächst im Vordergrund, die am Fluoreszenzmikroskop beobachteten Vorgänge zu erfassen, so dass zunächst ein Mixing Assay durchgeführt wurde. Deutlich konnte eine drastische Veränderung der MFK-Populationen beobachtet werden, wenn die Destabilisierung der Emulsion durch Zugabe von 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  induziert wurde. Dabei zeigte sich, dass die Veränderung der Fluoreszenz der MFK vom Medium (SMUF oder EDTA + SMUF), mit dem die Proben vor der durchflusscytometrischen Messung verdünnt wurden, abhängig ist (Abb. 4.10 und Abb. 4.11). Diese Ergebnisse konnten durch Partikelmessungen bestätigt werden (Abb. 4.12). Eine Verdünnung der MFK-Emulsionen mit EDTA zerstört über Calciumbrücken zusammengehaltene Aggregate, wie auch MCCRAE und LEPOETRE [1996] für über Calciumbrücken stabilisierte sekundäre MFK-Kluster gezeigt haben.

Daraus folgt, dass durch eine Verdünnung der Proben mit SMUF die Aggregation und/oder Fusion der MFK gemessen wird. Eine Unterscheidung zwischen diesen zwei Aggregationsarten kann nur erfolgen, wenn die Proben vor der SMUF-Verdünnung zusätzlich mit EDTA verdünnt werden. Hierdurch werden die irreversible Hemifusion und vollständige Fusion der MFK erfasst. Wie sich zeigte, ist die ermittelte Fusion der MFK im Mixing Assay wesentlich geringer als die Aggregation. Wie schon DÜZGÜNES et al. [1987] berichteten, ist der Mixing Assay sehr sensitiv für die Messung der Membranaggregation, da bei einer Annäherung der Membran ab einem Abstand von 100 Å FRET auftreten kann. Jedoch kann das Ausmaß der Fusion durch diesen Assay nicht korrekt ermittelt werden. Ein weiterer Nachteil, der gegen die Verwendung des Mixing Assays für die Messung der Aggregation und Fusion von MFK spricht, besteht darin, dass hierfür zwei unterschiedlich markierte Membran-Populationen miteinander gemischt werden müssen. Eine bessere Methode ist die Integration beider Fluoreszenzfarbstoffe in dieselbe Membran-Population. Der Diluting Assay ist besonders vielfältig anwendbar, da diese Membran-Population (FRET-MFK) mit jeder Ziellmembran gemischt und anschließend die Fusion untersucht werden kann [HOEKSTRA und DÜZGÜNES, 1993]. Dieser Vorteil des Diluting Assays konnte, wie gezeigt wurde, benutzt werden, um die Emulsionsstabilität von Rahmproben zu untersuchen.

Nach DÜZGÜNES et al. [1987] ist der Diluting Assay eher ungeeignet, um die Aggregation von Membransystemen zu untersuchen. Es zeigte sich jedoch, dass durch den Diluting Assay sowohl die Aggregation und/oder Fusion als auch die irreversible Hemifusion und Fusion der MFK bestimmt werden kann. Dies ist damit zu begründen, dass die Fluoreszenz der MFK mit einem Durchflusscytometers und nicht mit einem Spektralfluorimeter bestimmt wurde. Fliegt ein Partikel durch den Laserstrahl des Durchflusscytometers, wird die mittlere Fluoreszenz des Partikels erfasst, d.h.,

aggregieren zwei markierte FRET-MFK, haben diese eine höhere NBD- und Rh-Fluoreszenz als die jeweiligen einzelnen FRET-MFK. Aggregieren FRET-MFK und unmarkierte MFK, reduziert sich zwar geringfügig die Fluoreszenz der FRET-MFK, der Partikel weist jedoch gegenüber den unmarkierten MFK eine deutlich höhere NBD- und Rh-Fluoreszenz auf. Allerdings verändert sich durch die Aggregation der MFK das Verhältnis zwischen NBD- und Rh-Fluoreszenz nicht wesentlich. Erst wenn eine Fusion der MFK (Verschmelzung der Membranen) erfolgt, tritt ein Dequenching des FRET zwischen NBD und Rhodamin in der MFKM auf, wie durch die Abnahme der Steigung der Regressionsgeraden der NBD-Fluoreszenz der MFK gezeigt werden konnte (Abb. 4.17). Weiterhin vermischen sich die nicht fusionierten FRET-MFK nicht mit denen der fusionierten MFK, wie anhand der vorhandenen FRET-MFK-Population bei der Verdünnung der Proben mit EDTA beobachtet werden konnte. Diese zwei Kriterien ermöglichen mittels durchflusscytometrischer Messungen des Diluting Assays klar die Unterscheidung zwischen einer reversiblen und einer irreversiblen Aggregation, wie der Hemifusion und Fusion.

Bisherige FRET basierte Untersuchungen mittels der Durchflusscytometrie wurden eher für die Charakterisierung der Verteilung von membranintegrierten fluoreszenzmarkierten Proteinen [DYE, 2005; HE et al., 2003; SONG et al., 2000] in Zellmembranen benutzt, während sich nur zwei Publikationen mit Hilfe des FRET direkt mit der Charakterisierung von Aggregation und Fusion biologischer Membran beschäftigt haben [ANZAR et al., 2002; HUERTA et al., 2006]. Auch diese Autoren benutzten die Definition von Gates, um die Aggregation und Fusion der vermessenen biologischen Systeme zu quantifizieren. Ein Vergleich der gewonnenen Aggregations- und Fusionsraten mit anderen Messsystemen der Aggregation und Fusion von MFK, wie z.B. der Partikelmessung, ist vermutlich nicht unmittelbar möglich. Zwar basieren sowohl die Partikelmessung als auch die Fluoreszenzveränderungsmessung mittels Durchflusscytometer auf der Veränderung der Oberflächeneigenschaften der MFK während der Destabilisierung der Fettkugeln; ob diese gemessenen Destabilisierungsgeschwindigkeiten direkt vergleichbar sind, konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Wie später gezeigt wird, konnte allerdings der Diluting Assay mittels eines Reaktionsmodells kinetisch beschrieben werden. Hiermit können Aggregationsgeschwindigkeitskonstanten ermittelt werden, die eine höhere Vergleichbarkeit haben als die absoluten Aggregations- und Fusionsraten.

### **5.2.3 Temperaturabhängigkeit der Aggregation und Fusion von MFK**

Für eine weitere Charakterisierung des entwickelten Messsystems wurde die Temperaturabhängigkeit des Diluting Assays untersucht, da die Stabilität der MFK vom fest/flüssig-Verhältnis des Fettes und der Anordnung der Kristalle im Inneren beeinflusst wird [HINRICHS, 1994]. Des Weiteren hat die MFKM eine Phasenübergangstemperatur zwischen 8 und 18.3 °C, die von der Schmelztemperatur der Fettsäureketten der Phospholipide abhängig ist [APPELL et al., 1982; DUFOUR et al., 1999; WANINGE et al., 2003], so dass hierdurch ebenfalls die Fusionseigenschaften der MFK beeinflusst werden.

Es konnte festgestellt werden, dass die calciuminduzierte Aggregation und/oder Fusion der MFK überraschend stark temperaturabhängig ist. Darauf basierend kann behauptet werden, dass die Fusion ebenso temperaturabhängig ist, da unterhalb der Schmelztemperatur die Membran starr und somit die Deformation der MFKM nicht mehr möglich ist. Somit können Hemifusion und daher auch Diffusion der fluoreszenzmarkierten Phospholipide bei einem Aggregationsereignis unterhalb der Phasenübergangstemperatur der MFK nicht erfolgen. Weiterhin wird bei Temperaturen unterhalb von 37 °C die MFKM zusätzlich durch hochschmelzende Triglyceride stabilisiert, indem diese an der Innenseite des Monolayers auskristallisieren. Hierdurch kann die geringe Fusion der MFK bei 30 °C im Vergleich zum stärkeren Fusionsprozess bei 37 °C erklärt werden. Demzufolge kann auch bei 10 °C keine Fusion erfolgen, weil bei diesen Temperaturen bereits keine Aggregation der MFK beobachtet werden konnte. Letzteres ist jedoch insofern erklärungsbedürftig, als dass ionische Wechselwirkungen nicht durch die Temperatur beeinflusst werden sollten, so dass eine Bindung von Calciumionen an die MFKM auch bei Temperaturen von 10 °C stattfinden können sollte. Die hydrophoben Wechselwirkungen, die zur Überwindung der abstoßenden Kräfte bei einer Annäherung der MFK (unterhalb von 4 nm, KURZHALS [1973, zit. nach HINRICHS, 1994] notwendig sind, werden jedoch von der Temperatur beeinflusst und verringern sich mit der Temperatur. Offenbar reicht diese Reduktion der hydrophoben Kräfte aus, um die Aggregation der MFK zu verhindern bzw. gebildete Aggregate zu zerstören, weil die sie stabilisierenden Kräfte zu gering sind. Möglicherweise werden diese Vorgänge zusätzlich durch die veränderte molekulare Organisation der Membrankomponenten bei niedrigen Temperaturen verstärkt. Nach EVERS [2004] kann eine Veränderung der Membranstruktur der MFK durch Kühlung von Milch vermutet werden. Bisherige morphologische Untersuchungen reichen jedoch nicht aus, um die fehlende calciuminduzierte Aggregation der MFK bei 10 und 20 °C zu erklären.

### **5.2.4 FRET-markierte MFK für die Untersuchung der Stabilität von MFK-Emulsionen**

Mittels der FRET-markierten MFK konnte die Aggregation und Fusion von MFK charakterisiert werden. Da die physikalische Stabilität der MFK gegenüber der Aggregation und Fusion im Wesentlichen von den Eigenschaften der MFKM abhängig ist [LOPEZ et al., 2007], müssten mittels der FRET-markierten MFK auch die Eigenschaften der SFKM untersucht werden können. Hierzu wurden unterschiedlich homogenisierte MFK mittels der FRET-markierten MFK auf ihre Membranstabilität unter Einsatz des Diluting Assays untersucht.

Für die Überprüfung dieser Eigenschaft der FRET-MFK an molkereitechnologisch verarbeiteten MFK wurden 10%ige und 30%ige Rahmproben unterschiedlich homogenisiert und die Stabilität der MFKM dieser Fettkugeln gegenüber calciuminduzierten Wechselwirkungen beobachtet. Zunächst wurden 30%ige Rahmproben mit unterschiedlichen Homogenisatoren homogenisiert. Wie sich zeigte (Abb. 4.21), hatten sowohl der verwendete Homogenisatortyp als auch der verwendete Homogenisierungsdruck einen Einfluss auf die calciuminduzierte Fusion der MFK. Die Kontrollproben, bei denen keine Zugabe von Calciumchlorid erfolgte, zeigten keine Fusion.

Interessant ist, dass im Vergleich zum klassischen Hochdruckhomogenisator langsam ansteigende Fusionskinetiken beobachtet wurden, wenn die Rahmproben mit einem Lochblendenhomogenisator homogenisiert wurden. Weiterhin ist im Gegensatz zur Hochdruckhomogenisation bei der Lochblendenhomogenisation kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei verschiedenen Druckstufen zu erkennen. Grund hierfür ist möglicherweise der unterschiedliche Membranaufbau der homogenisierten MFK, der durch die unterschiedlichen Prozesstechnologien verursacht wird. Die stärkere Interaktion der MFK, die bei einer Druckstellung von 100/20 im HDH, im Vergleich zu den MFK, die bei einer Druckstellung von 60/12 im HDH, und den MFK, die im Lochblendenhomogenisator homogenisiert wurden, ist aufgrund der unterschiedlichen Membranbeladung der MFK zu erklären, wie Abb. 5.2 A zeigt. Durch die starke Zerkleinerung der MFK im Homogenisator reicht das natürlich vorhandene Membranmaterial nicht aus, um die neu entstandene Fettoberfläche mit Membranmaterial zu bedecken.

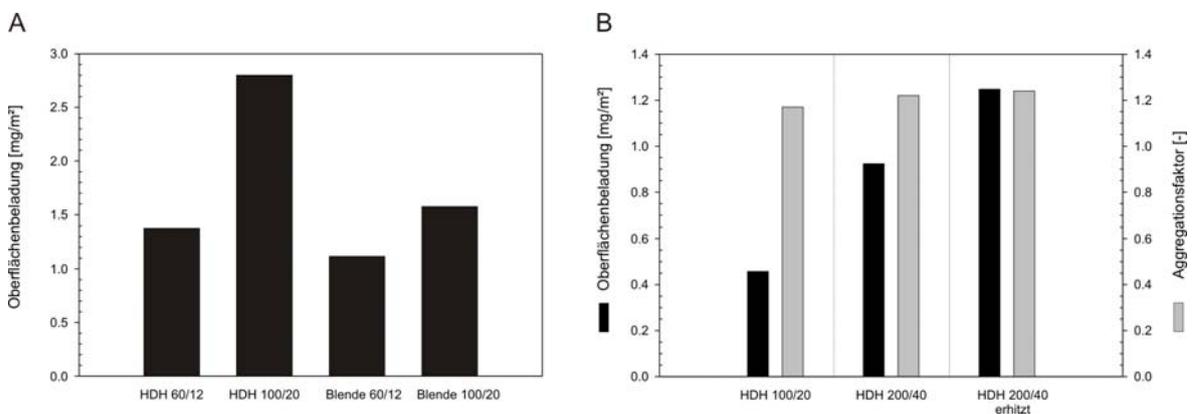


Abb. 5.2: Oberflächenbeladung von unterschiedlich homogenisierten Rahmproben (berechnet nach<sup>2</sup>). A: 30%iger Rahm wurde zweistufig bei 65 °C im Hochdruckhomogenisator oder im Lochblendenhomogenisator homogenisiert. B: 10%iger Rahm wurde zweistufig mit oder ohne vorherige indirekte Erhitzung (95 °C, 3 min) bei 65 °C zweistufig homogenisiert. Der Aggregationsfaktor der Proben wurde nach<sup>3</sup> berechnet. Die unterschiedlichen Drücke (erste Stufe/zweite Stufe) sind in bar angegeben.

Die Oberflächenbeladung steigt dabei mit dem verwendeten Homogenisierungsdruck, wie auch gut anhand der MFK, die mit dem HDH verarbeitet wurden, zu erkennen ist. Durch die höhere Membranbeladung durch Serumproteine der Milch können Aggregate über Calciumbrücken zwischen den Fettkugeln gebildet werden. Fettkugeln, die nur eine unzureichende Membranbedeckung bzw. eine instabile Membran besitzen, können auch einen Fusionsprozess

$$^2 \quad M_o = \frac{P_{MFKM}}{A_F}; \quad M_o = \text{Oberflächenmembranbeladung der Fettkugeln}, \quad P_{MFKM} = \frac{\text{Membranprotein der Fettkugeln [mg]}}{\text{Masse der Fettkugeln [g]}}$$

(bestimmt durch densitometrische SDS-PAGE-Analyse) und  $A_F [m^2/dm^3] = \text{spezifische Fettkugeloberfläche} = \frac{6}{d_{vs}}$

mit  $d_{vs}$  = oberflächenbezogener mittlerer Durchmesser der Fettkugelverteilung

$$^3 \quad \text{Aggregationsfaktor} = \frac{d_{50,3}(\text{Wasserverdünnung})}{d_{50,3}(\text{SDS-Verdünnung})}$$

durchlaufen. Dies konnte jedoch nur bei den 30%igen Rahmproben beobachtet werden. Wurden 10%ige Rahmproben in HDH homogenisiert, konnte trotz höherer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration keine Fusion der MFK erfasst werden. Nach CANO-RUIZ und RICHTER [1997] hat der Homogenisierungsdruck nur einen geringen Effekt auf die Membranzusammensetzung. Somit müssen durch die unterschiedlichen Homogenisierungsbedingungen verschiedene Membranstrukturen erzeugt werden, die im Fall der 10%igen Rahmproben besonders fusionsstabil sind. Dies wird deutlich, wenn die Membranbeladung der 10%igen Rahmproben analysiert wird. Die stärkste Aggregation wurde beobachtet, wenn die MFK bei einem Druck von 200/40 vor der Homogenisierung indirekt erhitzt wurden. Obwohl die Oberflächenbeladung dieser MFK um ca. das 1.4fache höher ist als die der nur homogenisierten MFK, zeigen die sowohl vorerhitzten als auch homogenisierten MFK eine zweifach bis dreifach stärkere Aggregation im Vergleich zu nur homogenisierten MFK. Die Erklärung für dieses Phänomen liefern die Molkenproteine. Durch Erhitzung von MFK in Anwesenheit von Serumproteinen der Milch binden verstärkt  $\beta$ -Lactoglobulin sowie in geringen Konzentrationen  $\alpha$ -Lactalbumin an die MFKM, während nur eine geringe Absorption von Caseinen an die MFKM durch eine Rahmerhitzung verursacht wird [DALGLEISH und BANKS, 1991; YE et al., 2004b; YE et al., 2004c]. Diese Bindung von Serumproteinen erzeugt eine etwas höhere Membranbeladung, als wenn der 10%ige Rahm direkt homogenisiert würde. Die wesentlich stärkere Aggregation der vorerhitzten MFK wird durch eine veränderte Membranstruktur, die vermutlich aus der Vorerhitzung des Rahms resultiert, verursacht. Die entstandene Membran muss hydrophober sein und stärker  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden als die der nicht vorerhitzten MFK.

Auffällig ist, dass der Aggregationsfaktor der 10%igen Rahmproben, der mittels der Partikelgrößenbestimmung der MFK durch Verdünnen der Emulsionen mit bzw. ohne SDS ermittelt wird, für alle drei unterschiedlich verarbeiteten Rahmproben nahezu gleich ist. Dies beweist, dass die Membraneigenschaften der MFK nicht unmittelbar mit der Partikelgrößenbestimmung erfasst werden können. Bedingt durch die rel. großen Unterschiede im Aggregations- und Fusionsverhalten von unterschiedlich prozessierten MFK wäre es interessant, weitere Untersuchungen mit dem entwickelten Messsystem durchzuführen; diese hätten den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit allerdings überschritten. Hierdurch könnten insbesondere Informationen zur Abhängigkeit der Stabilität der Sekundärfettkugel vom Membranaufbau gewonnen werden, da das benutzte Messsystem sich auch durch ein Reaktionsmodell kinetisch beschreiben lässt, wie im folgenden Abschnitt erläutert wird.

### 5.2.5 Kinetische Beschreibung der Fusion und Aggregation von fluoreszenzmarkierten MFK

Für das Verständnis sowie eine bessere Interpretation der Reaktionsmechanismen der Aggregation und Fusion müssen beobachtete Veränderungen in einem Emulsionssystem kinetisch beschrieben werden. Daher soll geprüft werden, ob die mittels der fluoreszenzmarkierten MFK am Durchflusscytometer gewonnenen Ergebnisse zur Aggregation und Fusion in MFK-Emulsionen für die Bestimmung von Reaktionskonstanten genutzt werden können. Ein Ansatz für die Entwicklung eines mathematischen Reaktionsmodells könnte die Theorie von SMOLUCHOWSKI [1916] über die Aggregation von kollidalen Lösungen sein. Nach dieser Theorie kann die Aggregation durch die Abnahme der Anzahl der kollidalen Partikel in einer Lösung beschrieben werden, so dass die Geschwindigkeit der Reaktion von der Anzahl der Partikel abhängig ist. Eine zeitliche Veränderung der Partikelanzahl in kollidalen Lösungen kann somit durch Gleichung (5.1) beschrieben werden.

$$-\frac{d(\sum P)}{dt} = 0,5k(\sum P)^2 \quad (5.1)$$

P = Anzahl der Partikel, k = Geschwindigkeitskonstante der Aggregation

Wird auf der Grundlage von SMOLUCHOWSKI [1916] ein Reaktionsmodell für die Aggregation der MFK entwickelt, muss als Vereinfachung angenommen werden, dass die Abnahme der Partikelanzahl mit der Aggregation der MFK gleichzusetzen ist, d. h., interagieren zwei MFK miteinander und bilden dabei einen Emulsionspartikel, gleicht dies einem Aggregationsprozess, unabhängig davon ob dieser Schritt reversibel oder irreversibel ist. Zur Veranschaulichung werden die Reaktionsabläufe beim Diluting Assay, bei dem unmarkierte MFK mit FRET-markierten MFK gemischt werden, in Abb. 5.3 dargestellt: Die Aggregation der MFK reduziert die Anzahl der unmarkierten MFK durch die Reaktionen 1. und 3., während die Anzahl der markierten MFK nur durch die Reaktion 2. abnimmt.

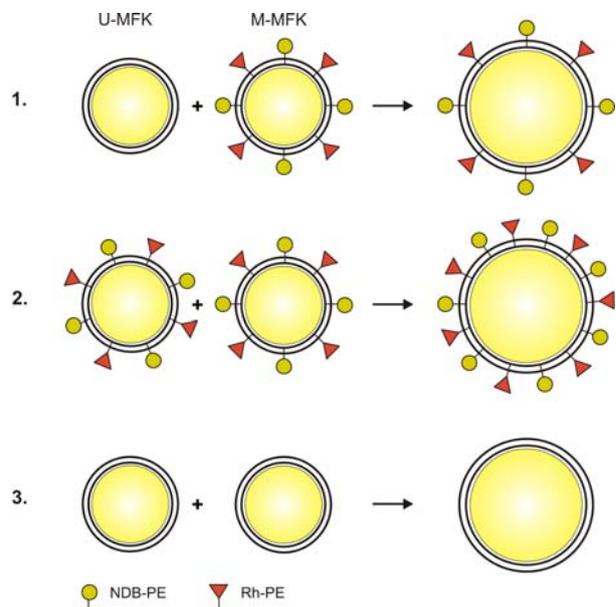


Abb. 5.3: Theoretische Reaktionsabläufe beim Mischen von unmarkierten MFK (U-MFK) und markierten MFK (M-MFK) bei einem Diluting Assay.

Die Veränderung der Anzahl von unmarkierten und markierten MFK kann durch das Gleichungssystem (5.2) beschrieben werden. Die Geschwindigkeit

der Abnahme der markierten MFK ist zur Gesamtkonzentration der markierten MFK hoch zwei

proportional. Die Konzentration der unmarkierten MFK kann als Folge der Reaktionen 1. und 3. beschrieben werden. Zur Kontrolle des aufgestellten Gleichungssystems wird die Summe der beiden Gleichungen (5.4) gebildet, die Gleichung (5.1) äquivalent sein muss.

$$\left\{ \begin{array}{l} -\frac{d \sum M}{dt} = 0,5k(\sum M)^2 \\ -\frac{d \sum U}{dt} = 0,5k(\sum U)^2 + k \sum M \sum U \end{array} \right. \quad (5.2)$$

$$\sum \frac{d(\sum M + \sum U)}{dt} = 0,5k(\sum M + \sum U)^2 \quad (5.3)$$

M = Anzahl der markierten MFK (FRET-MFK) pro Volumeneinheit, U = Anzahl der unmarkierten MFK pro Volumeneinheit

Zum Lösen des Gleichungssystems durch Integration muss eine neue Funktion eingeführt werden, die das Verhältnis zwischen unmarkierten (U) und markierten (M) MFK im Reaktionsablauf wiedergibt. Der Vorteil dieser Vorgehensweise besteht darin, dass hierdurch die Anzahl der MFK als Funktion  $M/U$  in Abhängigkeit der Zeit beschrieben wird. Somit muss nicht mit den mittels Durchflussscytometrie bestimmten prozentualen Anteilen der MFK gearbeitet werden. Hierdurch wird die Integration des Systems (5.4) ermöglicht.

$$V = \frac{\sum M}{\sum U} \quad (5.5)$$

V = Verhältnis der markierten zu den unmarkierten MFK

Wird nun Gleichung (5.3) durch Gleichung (5.2) geteilt und Gleichung (5.5) eingeführt, kann das Gleichungssystem gelöst werden. Wie sich zeigt, kann die Abnahme der unmarkierten und markierten MFK im Diluting Assay nach dem Ansatz von SMOLUCHOWSKI [1916] theoretisch beschrieben werden, da das Gleichungssystem gültig ist.

$$\frac{(V_t + 1) \frac{V_0}{(V_0 + 1)}}{V_t} = 1 + 0,5 R_M \sum P_0 k t \quad (5.6)$$

$V_t = V$  zum Zeitpunkt  $t$ ;  $V_0 = V$  zum Zeitpunkt  $t = 0$ ;  $R_M = \text{rel. Anteil der markierten Fettkugeln zum Zeitpunkt } t = 0$ ;  $P_0 = \text{Anzahl der MFK zum Zeitpunkt } t = 0$

Einzige Unbekannte in der Gleichung (5.6) ist die Anzahl der MFK zum Zeitpunkt  $t = 0$  ( $P_0$ ), die experimentell kaum bestimmt werden kann.  $P_0$  kann jedoch indirekt ermittelt werden, wenn angenommen wird, dass die Anzahl der MFK zum Zeitpunkt  $t = 0$  dem Fettvolumen in der Emulsion proportional ist. Dieses lässt sich in die Anzahl der MFK umrechnen, weil die Fettkonzentration der MFK-Emulsionen bestimmt werden kann und die Dichte von Milchfett bekannt ist. Dieser Zusammenhang wird durch die Gleichungen (5.7) und (5.8) wiedergegeben.

$$\sum P_0 \sim \frac{\psi_F}{V_{i,eff}} = \frac{FG}{\rho V_{i,eff}} \quad (5.7)$$

$$\sum P_0 = F_k \cdot FG \quad \text{und} \quad F_k \cdot k = k_F \quad (5.8)$$

$P_0$  = Anzahl der MFK;  $\psi_F$  = Volumenanteil des Fettes;  $V_{i,eff}$  = effektives Volumen der MFK;  $FG$  = Fettgehalt;  $\rho$  = Dichte von Fett;  $F_k$  = Umrechnungskoeffizient des Fettgehaltes in die Anzahl der MFK;  $k$  = Aggregationsgeschwindigkeitskonstante;  $k_F$  = konzentrationsabhängige formale Aggregationsgeschwindigkeitskonstante

Werden die Gleichungen (5.7) und (5.8) berücksichtigt, ergibt sich aus Gleichung (5.6) folgender Zusammenhang.

$$\frac{(V_t + 1) \cdot V_0}{V_t \cdot (V_0 + 1)} = 1 + 0,5 R_M \cdot FG \cdot k_F t \quad (5.9)$$

Die formale Aggregationsgeschwindigkeitskonstante ist aus der Steigung der Geraden unter Berücksichtigung von  $R_M$  und dem Fettgehalt der Proben bestimmbar, wenn der linke Term von Gleichung (5.9) gegenüber der Zeit aufgetragen wird und sich ein linearer Zusammenhang ergibt, wie in Abb. 5.4 dargestellt ist. Dabei gibt der linke Term das sog. rel. Verhältnis von markierten zu unmarkierten MFK zu einem Zeitpunkt  $t$  wieder.

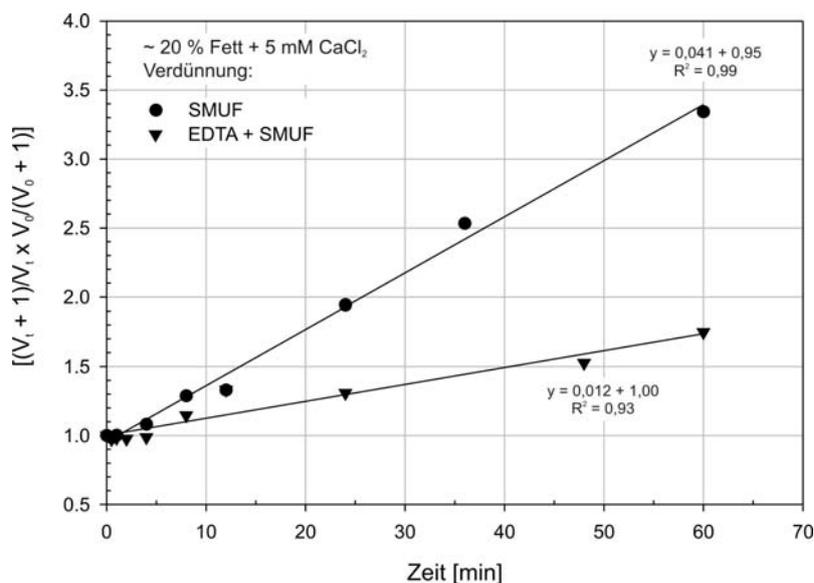


Abb. 5.4: Einfluss der Verdünnung der Emulsionsproben auf das rel. Verhältnis von markierten zu unmarkierten MFK bei Durchführung eines Diluting Assays in Abhängigkeit der Zeit.

Wie in Abb. 5.4 zu erkennen ist, kann das dynamische Verhältnis von unmarkierten zu markierten MFK während des Diluting Assays genutzt werden, um die formalen Aggregationsgeschwindigkeitskonstanten zu ermitteln, weil sich eine lineare Korrelation zwischen dem rel. Verhältnis der markierten und unmarkierten MFK und der Zeit ergibt. Unter Einbezug von  $R_M$  und dem Fettgehalt der Proben kann die Aggregationskonstante ( $k$ ) bestimmt werden. Dabei ist hervorzuheben, dass durch die Berücksichtigung von  $R_M$  und dem ermittelten Fettgehalt der MFK-Emulsionen die jeweilige Geschwindigkeitskonstante einer Messreihe den realen Messbedingungen

angepasst werden kann. Durch diese Vorgehensweise lassen sich mittels des Diluting Assays die Mechanismen und Ursachen der Destabilisierungsvorgänge in MFK-Emulsionen grundlegend untersuchen. Werden für die in Abb. 4.16 mit den Diluting Assay gewonnenen Daten die Aggregationsgeschwindigkeiten ermittelt, so ergibt sich für die Aggregation und/oder Fusion eine Aggregationskonstante von  $1,52 \pm 0,330 \text{ s}^{-1}$  und für die Fusion der MFK von  $0,69 \pm 0,164 \text{ s}^{-1}$ .

Soll ein Vergleich der Aggregationskonstanten des Diluting Assays, die sich aus der Vermischung von FRET-MFK mit unmarkierten MFK ergeben, mit den Ergebnisse des Mixing Assays (Mischen von NBD-MFK mit Rh-MFK) durchgeführt werden, muss für den Mixing Assay ebenfalls ein Reaktionsmodell aufgestellt und gelöst werden. Auf Basis der Theorie von SMOLUCHOWSKI [1916] können die Reaktionen des Mixing Assays ebenfalls in einem Gleichungssystem beschrieben werden (Gleichung (5.10)-(5.12)).

$$\left\{ \begin{array}{l} -\frac{d(\sum R)}{dt} = 0,5k(\sum R)^2 + k\sum R\sum N + k\sum R\sum M \\ -\frac{d(\sum M)}{dt} = 0,5k(\sum M)^2 - k\sum R\sum N \\ -\frac{d(\sum N)}{dt} = 0,5k(\sum N)^2 + k\sum N\sum R + k\sum N\sum M \end{array} \right. \quad (5.10)$$

$$\left. \begin{array}{l} -\frac{d(\sum M)}{dt} = 0,5k(\sum M)^2 - k\sum R\sum N \end{array} \right\} \quad (5.11)$$

$$\left. \begin{array}{l} -\frac{d(\sum N)}{dt} = 0,5k(\sum N)^2 + k\sum N\sum R + k\sum N\sum M \end{array} \right\} \quad (5.12)$$

$$\sum \frac{d(\sum N + \sum R + \sum M)}{dt} = 0,5k(\sum N + \sum R + \sum M)^2 \quad (5.13)$$

R = Anzahl der Rh-MFK; N = Anzahl der NBD-MFK; M = Anzahl der markierten MFK (FRET-MFK)

Wie die Kontrolle durch die Summierung des Gleichungssystems (5.13) zeigt, ist das abgeleitete Reaktionsmodell ebenfalls gültig. Zur Lösung des Systems bedarf es jedoch einer weiteren Integration, die nicht Teil dieser Arbeit sein soll, weil der Mixing Assay für die Untersuchung von Realsystemen, wie es homogenisierte MFK sind, nicht relevant ist. Dies wurde bereits oben dargestellt.

Wie gezeigt wurde, konnte mit Hilfe der FRET-markierten MFK eine Basis für weiterführende kinetische Untersuchungen zu den Mechanismen und Ursachen der Destabilisierung von Emulsionssystemen geschaffen werden. Mit diesen könnte ein grundlegendes Verständnis um die Fettkugeln der Milch erarbeitet werden, so dass sich die Stabilität von Milchprodukten hinsichtlich technologischer Schädigungen der MFK präziser optimieren ließe.

### 5.3 Induzierte Fusion der MFK durch proteolytischen Abbau der MFKM-Proteine

Native MFK sind sehr stabil gegenüber einer Aggregation und Fusion [WALSTRA, 1995]. Für diese Eigenschaft ist die Glykokalyx der MFK verantwortlich, die von den Membranproteinen der MFK gebildet wird. Untersuchungen von SHIMIZU et al. [1980] zeigten, dass durch eine Proteolyse der Membranproteine eine Degradation der Membranproteine induziert werden kann, die wiederum zu einer Destabilisierung des Emulsionssystems führt, da durch den Abbau der Glykokalyx die MFK nicht mehr gegenüber Aggregation und Fusion geschützt sind. Neuere strukturelle und funktionale Untersuchungen konnten den verschiedenen Proteinen der MFK spezifische Funktionen zuordnen [ANDERSON et al., 2000; BANGHART et al., 1998; BANSIL und TURNER, 2006; HARRISON, 2006; HEID et al., 1996; NIELSEN et al., 1999; OGG et al., 2004; PALLESEN et al., 2002; PALLESEN et al., 2007; PATTON et al., 1995; PETERSON et al., 2001; SHI et al., 2004; WILCOX et al., 2002].

Bisher war jedoch nicht bekannt, welche Membranproteine einen sterischen Schutz gegenüber einer Aggregation und Fusion darstellen. SHIMIZU et al. [1980] vermuteten, dass vor allem die glykolisierten Proteine diese Aufgabe übernehmen und schrieben fünf der sieben Hauptproteine diese Schutzfunktion der MFKM zu. Besitzt ein MFKM Protein eine solche Schutzfunktion, muss das entsprechende Protein während des Verdaus komplett oder größtenteils hydrolysiert worden sein, um seine Funktion als Emulsionsstabilisator zu verlieren. Zudem kann ein Protein nur vor Aggregation und Fusion schützen, wenn es an der Außenseite der Phospholipiddoppelschicht in ausreichenden, membranbedeckenden Konzentrationen integriert ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden daher native MFK aus Rohmilch isoliert und die Membran der MFK durch Proteasen hydrolysiert. Die erzielten Ergebnisse (siehe Kapitel 4.4) sollen im Zusammenhang mit dem Effekten der Fusionsinduzierung und der Degradation der Membranproteine durch die verwendeten Proteasen diskutiert werden.

Native MFK zeigten keine Veränderung der Partikelgrößenverteilung (Abb. 4.23), wenn sie ohne Proteasezusatz bei 37 °C 5 h inkubiert wurden. Somit konnten die Aussagen von WALSTRA [1995] bestätigt werden, dass in Abwesenheit einer technologischen Beanspruchung keine Veränderung der Größe der nativen MFK stattfindet. Die Glykokalyx der nativen MFK ist ein guter sterischer Schutz, so dass bei einer Temperatur von 37 °C, wie sie im Kuheuter herrscht, keine Fusion der MFK auftreten kann. Erst wenn die Membranproteine hydrolysiert werden, tritt eine Destabilisierung des Emulsionssystems auf. Die Fusioninduzierungsstärke der Proteasen können in folgende Reihenfolge einordnen werden: Proteinase K Verdaus > Trypsin > Endoproteinase K. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von SHIMIZU et al. [1980] konnte keine Destabilisierung der MFK durch einen Papainverdaus beobachtet werden, weil keine Fusion der MFK durch einen Papainverdaus der Membranproteine induziert wurde. SHIMIZU et al. [1980] fanden heraus, dass die Hydrolyse der MFKM-Proteine mit Papain innerhalb von 3 h Inkubation eine Aggregation, jedoch keine Fusion

induziert. Eine Verdünnung von Emulsionen mit SDS-Lösung vor der Partikelgrößenbestimmung zerstört gebildete Aggregate [HUPPERTZ und KELLY, 2006], so dass vermutlich die gebildeten MFK-Aggregate durch die Verdünnung der Proben mit Detergenz wieder zerfallen. Daher wurde keine Veränderung in der Partikelgrößenverteilung bei einem Papainverdau beobachtet. Überraschend ist jedoch, dass trotz 60%igem Abbau der MFKM-Proteine durch Papain keine Fusion der MFK induziert werden konnte. Wie später gezeigt wird, hängt dies vermutlich mit dem selektiven Proteinabbau durch diese Protease zusammen.

Wird der Proteinabbau der verwendeten Proteasen, wie am Beispiel von Trypsin gezeigt wurde (Kapitel 4.4.2), per SDS-PAGE verfolgt, so zeigt sich, dass Trypsin, wie auch die anderen verwendeten Proteasen, Zugang zu den auf der Membrannenseite liegenden Proteinen wie XDH und ADPH hatte und diese abbauen konnte. Nach gängigen topologischen Vorstellungen liegen diese beiden Proteine auf der Innenseite der nativen MFKM und müssten durch die Phospholipiddoppelschicht vor einer Hydrolyse geschützt sein. Daher kann angenommen werden, dass die MFKM kein wirklich geschlossener Lipidbilayer ist, der den cytosolischen Teil der Membran nach außen abschirmt. Daher konnten die Proteasen in den cytosolischen Raum diffundieren und auf der Membrannenseite liegende Proteine abbauen. Diese Hypothese wird durch die gewonnenen Ergebnisse zur Markierung der MFK mit NBD- und Rh-PE bei 0 °C verstärkt. Obwohl die Membran „gefroren“ ist und somit keine Fettsäureseitenketten von PE in die Phospholipiddoppelschicht insertieren können, werden die Farbstoffvesikel an die MFKM absorbiert, so dass die MFK fluoreszenzmarkiert werden. Somit müssen hydrophobe Bereiche auf der Membran der isolierten MFK existieren, an die die hydrophoben Fettsäureseitenketten binden können. Insofern muss die MFKM eine durchlässige oder „löchrige“ Struktur haben. Untersuchungen von KOBLYKLA und CARRAWAY [1973] und SHIMIZU et al. [1979] an gewaschenen (isolierten) MFK und isolierten Membranfragmenten der MFK zeigten ähnliche Verdauemuster- und geschwindigkeiten, wenn die MFKM-Proteine durch Proteasen abgebaut wurden. Wie unsere Ergebnisse bestätigen, vermuteten auch KOBLYKLA und CARRAWAY [1973] und SHIMIZU et al. [1979], dass die MFKM eher eine gebrochene Membran als eine kontinuierliche intakte „Zellmembran“ ist, da die Proteasen in den cytosolischen Innenraum der MFK diffundieren und XDH und ADPH abbauen konnten. Diese Hypothese widerspricht jedoch der gängigen Vorstellung vom Aufbau der Membran [DANTHINE et al., 2000; EVERS, 2004; HEID und KEENAN, 2005; KEENAN, 2001; KEENAN und DYLEWSKI, 1995; KEENAN und MATHER, 2003, 2006; MATHER und KEENAN, 1998].

Wie jedoch EVERS [2004] hervorhebt, ist die apikale Plasmamembran der Milchdrüsenzellen eine hochgradig dynamische Membran. Die Sekretion der MFK verursacht vermutlich viele biochemische und biophysische Veränderungen der dabei entstehenden MFKM, die jedoch bisher nur unvollständig untersucht worden sind. Morphologische Untersuchungen aus den 70-er und 80-er Jahren des vergangenen Jahrhunderts lassen die Vermutung zu (siehe [EVERS, 2004]), dass eine Umstrukturierung der MFKM nach der Sekretion erfolgt. Wie WALSTRA et al. [1999] hervorheben, ist die Struktur der nativen MFK ein weniger gut entschlüsselter Aspekt der MFK, so dass die bestehenden

Modelle der Struktur der MFKM in Frage gestellt werden können. Unser Ergebnisse, wie auch die von KOBLYKLA und CARRAWAY [1973] und SHIMIZU et al. [1979] lassen vermuten, dass die MFKM ihre plasmamembranartige Struktur nach der Sekretion verliert und keine kompakte Phospholipiddoppelschicht darstellt.

Als Folge der gebrochenen Struktur der MFKM können Proteasen in den cytosolischen Raum zwischen der Membraninnenseite und der den Fettkern umhüllenden Membran diffundieren. Da die lokale Konzentration der Proteine auf der Membraninnenseite der MFKM sehr hoch ist, würden schon wenige in das Cytosol diffundierte Proteasemoleküle ausreichen, um einen signifikanten Abbau der hier lokalisierten Proteine zu bewirken. Das hieße, dass die Verdaubarkeit der MFKM-Proteine durch Proteasen eher von der spezifischen Konformation der Proteine als von ihrer asymmetrischen Anordnung abhängig ist. Wie gezeigt werden konnte, werden die verschiedenen MFKM-Proteine durch die verwendeten Proteasen sehr unterschiedlich hydrolysiert (siehe Kapitel 4.4.5). Dies führt zu einer unterschiedlich starken Destabilisierung der untersuchten MFK-Emulsionen. Dabei kann der Proteinabbau als primäre Reaktion und die Fusion als Folgereaktion im System betrachtet werden.

Um den Zusammenhang zwischen der fusionsinduzierenden Wirkung des Proteinabbaus und der Proteinhydrolyse einzelner Membranproteine besser korrelieren zu können, sollen die beiden parallel laufenden Reaktionen kinetisch beschrieben werden. Hierdurch werden die Geschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse einzelner Membranproteine durch die verschiedenen Proteasen gewonnen. Um diese Daten mit der Fusion der MFK vergleichen zu können, sollten die Aggregations- bzw. Fusionskonstanten für die verschiedenen Proteasen bestimmt werden. Dies kann nach EUSTON et al. [2000] durch die Bestimmung des  $d_{3,0}$  über die Zeit unter der Berücksichtigung von Gleichung (5.15) erfolgen, so dass die Reaktionsordnung und die Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt werden können.

$$\frac{N_t}{N_0} = \left[ \frac{(d_{3,0})_{t=0}}{(d_{3,0})_{t=t}} \right]^3 \quad (5.14)$$

$$\left[ \frac{N_t}{N_0} \right]^{1-n} = 1 + (n-1) \cdot k \cdot t \quad (5.15)$$

$N_0$  = anfängliche Anzahl von Emulsionstropfen zum Zeitpunkt  $t=0$ ,  $N_t$  = Anzahl von Emulsionstropfen bei zum Zeitpunkt  $t$ ,  
 $n$  = Reaktionsordnung der Reaktion,  $k$  = Geschwindigkeitskonstante der Reaktion

Jedoch gilt Gleichung (5.14) nur unter der Voraussetzung, dass die Aggregate und fusionierten Emulsionströpfchen klein genug bleiben, so dass keine Sedimentation oder Aufräumung entstehen kann [EUSTON et al., 2000]. Da bei der Destabilisierung der MFK-Emulsionen innerhalb von 5 h jedoch teilweise eine Aufräumung zu beobachten war, können keine kinetischen Parameter für die Destabilisierung des Emulsionssystems bestimmt werden.

Enzymkatalysierte Reaktionen werden häufig durch die klassische Michaelis-Menten-Theorie beschrieben. Für diese gilt, dass Substrat und Enzym homogen in der Lösung verteilt sein müssen. Wird jedoch berücksichtigt, dass die MFKM-Proteine an die MFK gebunden sind und somit die lokale Proteinkonzentration in der Nähe der Membran gegenüber der Umgebung stark erhöht ist, kann der MFKM Proteinabbau nicht durch die Michaelis-Menten-Theorie beschrieben werden. Die Reaktion ist vermutlich durch verschiedene Faktoren, wie die Absorption und Desorption der Enzyme an die Membrangrenzfläche, die Diffusion der Enzyme in den cytosolischen Bereich der Membran, Strukturveränderungen der MFKM durch die Protolyse der Proteine sowie die Unzugänglichkeit der membranintegrierten Proteinsegmente für die Proteasen beeinflusst.

Wie gezeigt wurde (siehe Kapitel 4.4.5), ist die Hydrolyse der MFKM-Proteine durch einen asymptotischen Verlauf der Proteindegradation gekennzeichnet. Vermutlich sind bestimmte Bereiche der MFKM-Proteine durch andere Membrankomponenten maskiert, so dass diese Abschnitte nicht hydrolysiert werden können. Somit kann der Abbau der Proteine nicht durch einen klassischen formalkinetischen Ansatz beschrieben werden, da die Substratkonzentration nicht den Wert Null annehmen kann.

$$-\frac{dC}{dt} = k_n \cdot C^n \quad (5.16)$$

C = Substratkonzentration, k = Geschwindigkeitskonstant, n = Reaktionsordnung der Reaktion

Solche asymptotisch verlaufenden Reaktionen können nach TOLKACH [2007] durch das Einführen einer Endkonzentration für das Substrat durch eine Modifizierung der formalkinetischen Gleichung (5.16) beschrieben werden. Dabei muss die unendliche Endkonzentration ( $C_\infty$ ) bzw. die Substratkonzentration, unter die der Ausgangsgehalt nicht sinken kann, weil ein weiterer Abbau durch die gegebenen Umgebungsbedingungen nicht möglich ist, berücksichtigt werden. Daher kann die Abbaureaktion durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\left( \frac{C_t - C_\infty}{C_0 - C_\infty} \right)^{1-n} = 1 + (n-1) \cdot k \cdot t \quad n \neq 1 \quad (5.17)$$

$C_0$  = Ausgangskonzentration,  $C_t$  = Konzentration zum Zeitpunkt  $t = 0$ , k = konzentrationsabhängige Geschwindigkeitskonstante

Durch die fehlenden Standards für die einzelnen MFKM-Proteine bei der densitometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration aus SDS-Gelen ist keine korrekte Quantifizierung von  $C_\infty$  für die verschiedenen Membranproteine möglich. Deshalb erfolgt die Bestimmung von  $C_\infty$  durch die rel. unendliche Endkonzentration ( $C_{\infty,rel.}$ ). Diese wird erhalten durch die Teilung des Zählers und Nenners im linken Teil der Gleichung (5.17) durch  $C_0$ . Aus Gleichung (5.17) folgt folgende Beziehung:

$$\left( \frac{C_{rel.} - C_{\infty,rel.}}{1 - C_{\infty,rel.}} \right)^{1-n} = 1 + (n-1) \cdot k \cdot t \quad n \neq 1 \quad (5.18)$$

Die richtige Reaktionsordnung  $n$  ist getroffen, wenn der linke Term aus Gleichung (5.18) gegen die Zeit aufgetragen wird und sich ein linearer Zusammenhang ergibt. Aus der Steigung der Geraden lässt sich die konzentrationsabhängige Geschwindigkeitskonstante bestimmen. In Abb. 5.5 ist dieser Zusammenhang mittels der Abnahme der rel. Gesamtproteinkonzentration durch die verschiedenen Proteasen dargestellt.

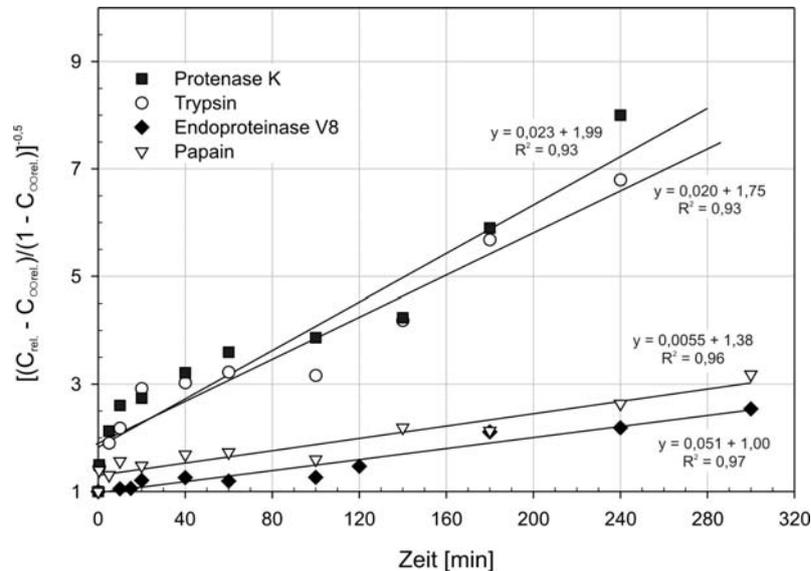


Abb. 5.5: Einfluss der verwendeten Proteasen auf den Abbau der rel. Gesamtmembranproteinkonzentration während der Hydrolyse der MFKM-Proteine.

Wie zu erkennen ist, kann die Proteolyse der MFKM-Proteine sehr gut kinetisch durch Gleichung (5.18) beschrieben werden, wenn als Reaktionsordnung 1,5 verwendet wird. Weiterhin wird deutlich, dass sich sowohl die Geschwindigkeitskonstanten der MFKM Proteinhydrolyse durch Protease K und Trypsin als auch die durch Papain und Endoprotease V8 gleichen, sich somit nicht signifikant unterscheiden und daher nicht zur Erklärung der unterschiedlichen Destabilisierungskinetiken herangezogen werden können. Demzufolge musste die Proteindegradation einzelner MFKM-Proteine betrachtet werden.

Die MFKM-Proteine MUC1, XDH, BTN, MUC15 und CD36 können nicht mit einer fusionshemmenden Wirkung in Zusammenhang gebracht werden. XDH befindet sich auf der cytosolischen Seite der MFKM, so dass XDH aus diesem Grund ausgeschlossen werden konnte. BTN ist nur in geringen Anteilen in die Außenseite der Phospholipiddoppelmembran integriert [ROBENEK et al., 2006]. Weiterhin wurde keine Korrelation zwischen dem Abbau des Proteins und der Destabilisierung der MFK gefunden. Die Proteine MUC1, MUC15 und CD36 besitzen membranspannende Transmembransegmente und bilden mit ihren stark glykolysierten, exoplasmatischen N-Termini und den Glykolipiden die Glykokalyx der MFKM. MUC1 wird eine sterische Schutzwirkung zugeschrieben [KEENAN und MATHER, 2006; MATHER, 2000; PATTON et al., 1995], während die Funktion von MUC15 und CD36 zurzeit unbekannt ist. Durch die hohe Glykolysierung dieser Proteine wäre ebenfalls eine stabilisierende Funktion zu vermuten. Die addierte Proteinkonzentration der Proteine MUC1, MUC15 und CD36 beträgt jedoch  $\leq 10\%$  des Gesamtproteoms der MFKM [KEENAN und MATHER, 2006; MATHER,

2000; PALLESEN et al., 2007; YE et al., 2002]. Daher ist vermutlich keine komplette Membranbedeckung der MFK gewährleistet. Weiterhin konnte keine Korrelation zwischen dem Abbau dieser Membranproteine und der Destabilisierung gefunden werden. Obwohl Papain innerhalb von 120 Minuten über 60 % dieser Proteine hydrolysierte, trat keine Fusion während der weiteren dreistündigen Inkubation ein. Deswegen können diese Proteine keine wesentliche Schutzfunktion gegenüber einer Aggregation und Fusion der MFK haben. Weitere in rel. hohen Konzentrationen an die Membran assoziierte Hauptproteine der MFKM sind ADPH und PAS 6/7 (ca. 25 % des gesamten MFKM-Proteoms). Daher wurden die konzentrationsabhängigen Geschwindigkeitskonstanten des Abbaus dieser Proteine ermittelt.

Wie die Verifizierung der MFKM-Proteinbanden in den SDS-Gelen zeigte, konnte nicht zwischen den MFKM-Proteinen ADPH und PAS 6/7 mittels SDS-PAGE unterschieden werden, weil beide Proteine in ähnlichen Molekülmassenbereichen migrieren. Daher wurden die gemessenen rel. Proteinkonzentrationen der Banden addiert und die Geschwindigkeitskonstanten hierfür bestimmt. Da hierdurch jedoch keine Geschwindigkeitskonstante für den Papainverdau ermittelt werden konnte ( $R^2 \leq 55$ ), wurde die Abbaukinetik der separaten Banden (ADPH/obere Bande PAS 6/7 und der unteren Bande PAS 6/7) ebenfalls berechnet. In Abb. 5.6 sind die konzentrationsabhängigen Geschwindigkeitskonstanten zum Vergleich graphisch dargestellt.

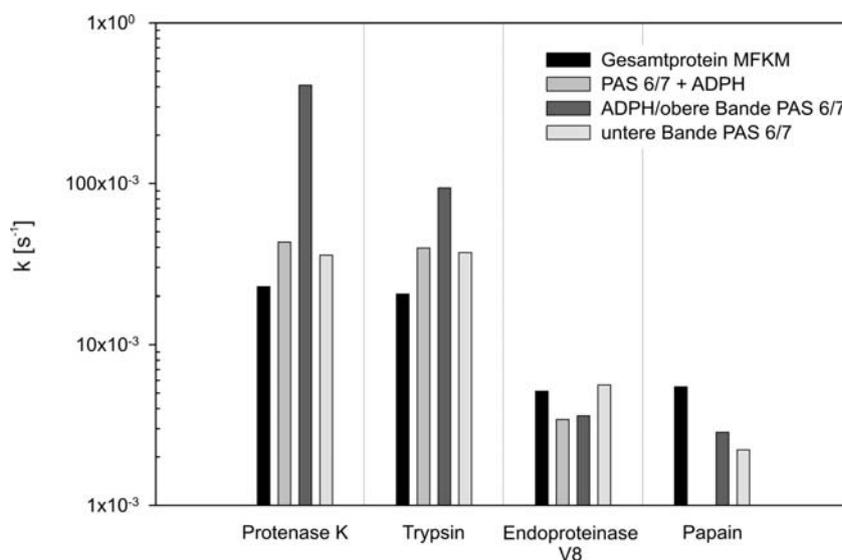


Abb. 5.6: Konzentrationsabhängige Geschwindigkeitskonstante der Proteinhydrolyse der MFKM-Proteine ( $R^2 \geq 93$ ).

Wie in Abb. 5.6 zu erkennen ist, können anhand der konzentrationsabhängigen Geschwindigkeitskonstanten die unterschiedlichen induzierten sekundären Reaktionen der Fusion erklärt werden. Dabei ist der Abbau von ADPH/obere Bande PAS 6/7 vermutlich entscheidend für die Geschwindigkeit der Fusion, weil Proteinase K diese Proteinbande 4.4-fach schneller abbaut als Trypsin, während kein signifikanter Unterschied in den anderen Abbaugeschwindigkeiten gefunden wurde. Die langsamere Fusionsinduzierung durch Endoprotease V8 als durch Trypsin kann offensichtlich durch den 11-fach langsameren Abbau von PAS 6/7 und ADPH erklärt werden. Interessant ist, dass

Papain im Vergleich zu Endoproteinase V8 ADPH/obere Bande PAS 6/7 ähnlich schnell hydrolysiert, die untere Bande PAS 6/7 dagegen um den Faktor 2,5 langsamer. Die nicht eintretende Destabilisierung bei einem Papainverdau kann somit durch diesen Unterschied erklärt werden, da Papain das Gesamtprotein der MFK ebenfalls nicht signifikant langsamer abbaut als Endoproteinase V8.

Die Destabilisierung der MFK scheint durch diese selektive Proteolyse von ADPH/obere Bande PAS 6/7 und der unteren Bande PAS 6/7 induziert zu werden. Da der Abbau von ADPH und PAS 6/7 nicht getrennt betrachtet werden kann, kann aufgrund von theoretischen Überlegungen eines der beiden Proteine dasjenige identifiziert werden, welches die MFK vor der Aggregation und Fusion nach der Sekretion der MFK schützt. ADPH ist nach gängigen Erkenntnissen in der Phospholipideinzelschicht zu finden, die direkt an den Fettkern grenzt [KEENAN und MATHER, 2006; MATHER und KEENAN, 1998]. Nach Untersuchungen von ROBENEK et al. [2006] befindet sich eine hohe Konzentration von ADPH in der inneren Phospholipidmembran des Lipidbilayers der MFK. Die Funktion des Proteins an dieser Stelle der Membran bleibt jedoch unklar. Dass ADPH auf der inneren Seite der Phospholipiddoppelschicht die MFK vor einer Aggregation und Fusion schützt, ist sehr unwahrscheinlich, weil das Protein keinen direkten Kontakt zum Milchplasma hat. Die beobachteten Effekte müssen anhand des Protein PAS 6/7 erklärt werden. Bisher durchgeführte Untersuchungen hatten PAS 6/7 keine direkte Funktion in der MFK zuordnen können. Jedoch ist bekannt, dass dieses Protein durch eine amphipatische  $\alpha$ -Helix am C-Terminus des Proteins an Phospholipidmembranen bindet [ANDERSON et al., 2000; MATHER, 2000; SHI et al., 2004], somit ein adhäsives Membranprotein ist und sich daher auf der Außenseite der MFKM befindet. Dieses Protein hat folglich direkten Kontakt mit dem Milchplasma und wäre deshalb prinzipiell in der Lage, die MFK vor einer Aggregation und Fusion zu schützen.

## 5.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Wie in Kapitel 4.1 gezeigt wurde, können die lipidkonjugierten Fluoreszenzfarbstoffe NBD und Rh mittels einer erfolgreich entwickelten Markierungsmethode in die Membran von aus Rohmilch isolierten MFK integriert werden. Die Fluoreszenz von MFK-Emulsionssystemen kann schnell und genau durch die Durchflusszytometrie quantifiziert werden. Hierdurch konnten auftretende Probleme der Fluoreszenzbestimmung von kolloidalen Systemen (z. B. Lichtstreuung, Absorption und die dynamische Veränderung der Partikelanzahl bei der Destabilisierung des Emulsionssystems) eliminiert werden, so dass die NBD-Fluoreszenz der MFK für die Charakterisierung des Einbaus der Fluoreszenzfarbstoffe in die MFKM eingesetzt werden kann. Wie bei anderen biologischen Membranen findet ein strahlungsloser Energietransfer zwischen NBD und Rh statt, wenn NBD mit Licht in der MFKM angeregt wird. Hierdurch konnte der Einbau der Markerlipide genauer erfasst werden, wobei im Gegensatz zu synthetischen Membransystemen der Energietransfer von NBD zu Rhodamin durch die Membrankomponenten der MFKM beeinflusst wird. Dies beeinträchtigt jedoch die Anwendbarkeit der Fluoreszenzfarbstoffe für die Bestimmung der Aggregation und Fusion von MFK kaum.

Wie durch die Diffusion der Fluoreszenzlipide mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen gezeigt werden konnte (Kapitel 4.2), ist die MFKM keine starres Membransystem, d.h. bei entsprechenden Temperaturen ist die MFKM zum Fettkern beweglich, so dass eine Vermischung der Membrankomponenten innerhalb der Membran möglich ist. Aufbauend auf diesen neuen Erkenntnissen konnten Aggregation und Fusion mittels fluoreszenzmarkierter MFK erfolgreich quantifiziert werden. Hierdurch konnte ein Messsystem entwickelt werden, das auf Basis der Membranebene die Aggregation und Fusion von MFK erfassen kann. Als besonders universal einsetzbar erwies sich der Diluting Assay, da bei diesem FRET-MFK mit jedem beliebigen Emulsionssystem gemischt werden können. Dieses System erweitert damit die bisherigen Möglichkeiten zur Untersuchung der durch technologische Prozesse hervorgerufenen Wechselwirkungen in MFK-Emulsionen. Durch kinetische Beschreibung der Reaktionsabläufe des Diluting Assays mit einem mathematischen Reaktionsmodell können Geschwindigkeitskonstanten der Destabilisierungsreaktion für detaillierte Reaktionsanalysen gewonnen werden. Die entwickelte Methode kann daher erfolgreich angewendet werden, um die Ursachen und Mechanismen einer Interaktion von technologisch prozessierten MFK zu untersuchen.

Eine weitergehende Fragestellung wäre in diesem Zusammenhang, welchen Einfluss unterschiedliche Membranaufbauarten auf die Stabilität von MFK haben. Bekanntlich führt eine Homogenisierung zu einer starken Veränderung der Membranstruktur der Fettkugeln. Die neu entstandene Membranstruktur (SFKM) hängt sowohl von den Homogenisierungsbedingungen als auch von der Zusammensetzung des Milchserums ab. Die Sekundärmembran ist im Allgemeinen relativ stabil gegenüber einer Fusion. Jedoch können auch Wechselwirkungen zwischen der Sekundärmembran und den Serumproteinen auftreten, die wiederum zu einer Destabilisierung des

Emulsionssysteme führen können. Diese kollektiven Wechselwirkungen zwischen den einzelnen MFK hängen sehr stark vom Membranaufbau ab. Daher wäre es interessant, unterschiedliche Membranarten (wie z.B. reine Casein-, Caseinat-, Molkenprotein- oder rekonstituierte MFK Membranen) hinsichtlich ihrer Stabilitätseigenschaften zu charakterisieren, d.h. ihr Aggregations- und Koaleszenzverhalten mittels FRET-MFK zu bestimmen. Mit den gewonnenen Erkenntnissen könnten Milch- und Rahmprodukte entwickelt werden, welche die von den Verbrauchern erwünschte lange Haltbarkeit aufweisen, ohne dass unerwünschte Destabilisierungsercheinungen in den Produkten auftreten.

Wie durch die proteolytischen Verdauung im Kapitel 4.4 und die Markierungsversuche der MFK gezeigt werden konnte, hatten die verwendeten MFK eine „gebrochene“ Membranstruktur. Möglicherweise verändert sich die MFKM nach der Sekretion der MFK, so dass die Phospholipiddoppelschicht nicht mehr als eine geschlossene Membran angesehen werden kann. Diese Veränderungen beeinflussen im Wesentlichen jedoch nicht die Stabilität der nativen MFK, da diese ohne eine proteolytische Membranschädigung stabil gegenüber einer Aggregation und Fusion sind. Wie durch die Proteolyse der Glykokalyx der MFKM gezeigt werden konnte, weisen die MFKM-Proteine eine emulsionsstabilisierende Funktion für die MFK auf. Dabei hat das Membranprotein PAS 6/7, wie durch die Ermittlung der konzentrationsabhängigen Geschwindigkeitskonstanten gezeigt werden konnte, als ein extrinsisches Membranprotein vermutlich eine herausragende Funktion als Emulsionsstabilisator. Jedoch sind weitere funktionelle Studien zur Unterstützung der Hypothese, dass PAS 6/7 ein unmittelbarer sterischer Schutz der MFK gegenüber einer Destabilisierung des Emulsionssystems der Milch ist, notwendig. Im Rahmen solcher Untersuchungen könnte ermittelt werden, inwieweit die unterschiedlichen Verarbeitungsprozesse der MFK, wie z. B. ein Labkäsereiprozess, diese Schutzfunktion von PAS 6/7 und hierdurch spezifische Produkteigenschaften beeinflusst.

## 6 Literatur

AGBOOLA, S. O. und DALGLEISH, D. G. [1996a]: Effects of pH and Ethanol on the Kinetics of Destabilisation of Oil-in-Water Emulsions Containing Milk Proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **72** (4): 448-454.

AGBOOLA, S. O. und DALGLEISH, D. G. [1996b]: Kinetics of the Calcium-Induced Instability of Oil-in-Water Emulsions: Studies Under Quiescent and Shearing Conditions. *Lebensmittel - Wissenschaft und - Technologie* **29** (5-6): 425-432.

ANDERSON, M. H.; GRAVERSEN, H.; FEDOSOV, S. N.; PETERSEN, T. E. und RASMUSSEN, J. T. [2000]: "Functional Analyses of Two Cellular Binding Domains of Bovine Lactadherin." *Biochemistry* **39**: 6200-6206.

ANZAR, M.; KAKUDA, N.; HE, L.; PAULS, K. P. und BUHR, M. M. [2002]: Optimizing and quantifying fusion of liposomes to mammalian sperm using resonance energy transfer and flow cytometric methods. *Cytometry* **49** (1): 22-27.

APPELL, K. C.; KEENAN, T. W. und LOW, P. S. [1982]: Differential scanning calorimetry of milk fat globule membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **690** (2): 243-250.

BANGHART, L. R.; CHAMBERLAIN, C. W.; VELARDE, J.; KOROBKO, I. V.; OGG, S. L.; JACK, L. J. W.; VAKHARIA, V. N. und MATHER, I. H. [1998]: Butyrophilin Is Expressed in Mammary Epithelial Cells from a Single-sized Messenger RNA as a Type I Membrane Glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry* **273** (7): 4171-4179.

BANSIL, R. und TURNER, B. S. [2006]: Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **11** (2-3): 164-170.

BITMAN, J. und WOOD, D. L. [1990]: Changes in Milk Fat Phospholipids during Lactation. *Journal of Dairy Science* **73** (5): 1208-1216.

BLIGH, E. G. und DYER, W. J. [1959]: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J. Biochem Physiol* **37**: 911-917.

BOODE, K.; BISPERINK, C. und WALSTRA, P. [1991]: Destabilization of O/W emulsions containing fat crystals by temperature cycling. *Colloids and Surfaces* **61**: 55-74.

BOODE, K. und WALSTRA, P. [1993]: Partial Coalescence in Oil-in-Water Emulsions 1. Nature of the Aggregation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **81**: 121-137.

BOODE, K.; WALSTRA, P. und DE GROOT-MOSTERT, A. E. A. [1993]: Partial Coalescence in Oil-in-Water Emulsions 2. Influence of the Properties of fat. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **81**: 193-151.

BRUNNER, J. R. [1974]: Physical equilibria in milk: The lipid phase. *Fundamentals of Dairy Chemistry*. WEBB, B. H., JOHNSON, A. H. und ALFORD, J. A., Westport, Verlag AVI Publ. Comp..

CANO-RUIZ, M. E. und RICHTER, R. L. [1997]: Effect of Homogenization Pressure on the Milk Fat Globule Membrane Proteins. *Journal of Dairy Science* **80** (11): 2732-2739.

CHANAMAI, R. und McCLEMENTS, D. J. [2000]: Dependence of creaming and rheology of monodisperse oil-in-water emulsions on droplet size and concentration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **172**: 79-86.

CHATTOPADHYAY, A. [1990]: Chemistry and biology of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labeled lipids: fluorescent probes of biological and model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* **53** (1): 1-15.

CONNOR, J. und SCHROIT, A. J. [1987]: Determination of lipid asymmetry in human red cells by resonance energy transfer. *Biochemistry* **26** (16): 5099-5105.

CORREDIG, M. und DALGLEISH, D. G. [1996]: Effect of different heat treatments on the strong binding interactions between whey proteins and milk fat globule in whole milk. *Journal of Dairy Research* **63**: 441-449.

DALGLEISH, D. G. [1984]: Measurement of electrophoretic mobilities and zeta-potentials of particles from milk using laser Doppler electrophoresis. *Journal of Dairy Research* **51**: 425-438.

DALGLEISH, D. G. und BANKS, J. M. [1991]: The formation of complexes between serum proteins and fat globule during heating of whole milk. *Milchwissenschaft* **46** (2): 75-78.

DANNER, T.; HEUBEL, C.; SCHUBERT, H.; POLKE, R. und STANG, M. [2000]: Messen der stabilisierenden Eigenschaften von Emulgatoren in Emulsionen. *Lebensmittel- und Verpackungstechnik* **45** (1): 29-31.

DANTHINE, S.; BLECKER, C.; PAQUOT, M.; INNOCENTE, N. und DEROANNE, C. [2000]: Évolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait : synthèse bibliographique. *Lait* **80**: 209-222.

DAS, K. P. und CHATTORAJ, D. K. [1982]: Kinetics of coalescence of polar oil/water emulsion stabilised by ionic detergents and proteins. *Colloids and Surfaces* **5** (1): 75-78.

DE FEIJTER, J. A.; BENJAMINS, J. und TAMBOER, M. [1987]: Adsorption Displacement of Proteins by Surfactants in Oil-in-Water Emulsions. *Colloids and Surfaces* **27**: 243-266.

DEETH, H. C. [1997]: The role of phospholipids in the stability of milk fat globules. *The Australian Journal of Dairy Technology* **52**: 44-46.

DOWNNEY, M. C.; MA, C. H.; TRINH, T. K.; MCCARTHY, O. J.; FEE, C.; WEEKS, M. und PRANKERD, B. [2002]: The use of particle size distribution data in the assessment of milk fat globule membrane damage. Ninth Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering (APCChe) Congress and CHEMECA 2002, Christchurch, New Zealand.

DUFOUR, E.; SUBIRADE, M.; LOUPIL, F. und RIAUBLANC, A. [1999]: Whey proteins modify the phase transition of milk fat globule phospholipids. *Lait* **79**: 217-228.

DÜZGÜNES, N.; ALLEN, T. M.; FEDOR, J. und PAPAHAJDOPOULOS, D. [1987]: Lipid Mixing during Membrane Aggregation and Fusion: Whey Fusion Assay Disagree. *Biochemistry* **26**: 8435-8442.

DÜZGÜNES, N.; BAGATOLLI, L. A.; MEERS, P. R.; OH, Y.-K. und STRAUBINGER, R. M. [2003]: Fluorescence methods in liposome research. *Liposomes*. Second Edition. TORCHILIN, V. P. und WEISSIG, V., Oxford, New York, Oxford University Press. **264**.

DYE, B. T. [2005]: Flow cytometric analysis of CFP-YFP FRET as a marker for in vivo protein-protein interaction. *Clinical and Applied Immunology Reviews* **5** (5): 307-324.

EUSTON, S. R.; FINNIGAN, S. R. und HIRST, R. L. [2000]: Aggregation kinetics of heated whey protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloids* **14** (2): 155-161.

EUSTON, S. R.; FINNIGAN, S. R. und HIRST, R. L. [2002]: Kinetics of droplet aggregation in heated whey protein-stabilized emulsions: effect of polysaccharides. *Food Hydrocolloids* **16** (5): 499-505.

EVERS, J. M. J. M. [2004]: The milkfat globule membrane--compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell. *International Dairy Journal* **14** (8): 661-674.

ExpASY [2007]: ExpASY Proteomics Server. <http://www.expasy.org/>

FINK, A. [1984]: Charakterisierung technologisch bedingter Veränderungen der Emulsionsstabilität von Rahm. Technische Universität München, Freising-Weihenstephan.

FONG, B. Y.; NORRIS, C. S. und MACGIBBON, A. K. H. [2007]: Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane. *International Dairy Journal* **17** (4): 275-288.

HARDHAM, J. F. [1998]: Effect of protein standardisation of milk by addition of UF milk permeate on the composition and storage stability of processed milk. *The Australian Journal of Dairy Technology* **56** (1): 22-27.

HARDHAM, J. F. [1999]: Effect of increased beta-lactoglobulin and whey protein concentration on the storage stability of UHT processed milk. *The Australian Journal of Dairy Technology* **54** (October): 77-83.

HARDHAM, J. F.; B.W., I. und FRENCH, H. M. [2000]: Effect of homogenisation and microfluidisation on the extent of fat separation during storage of UHT milk. *The Australian Journal of Dairy Technology* **55** (April): 16-22.

HARRISON, R. [2006]: Milk Xanthine Oxidase: Properties and physiological roles. *International Dairy Journal* **16** (6): 546-554.

HEID, H. W. und KEENAN, T. W. [2005]: Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *European Journal of Cell Biology* **84** (2-3): 245-258.

HEID, H. W.; SCHNÖLZER, M. und KEENAN, T. W. [1996]: Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane. *Biochemistry* **320**: 1025-1030.

HILLBRICK, G. C.; MCMAHON, D. J. und DEETH, H. C. [1998]: Electrical impedance particle size method (Coulter Counter) detects the large fat globules in poorly homogenised UHT processed milk. *Australian Journal of Dairy Technology* **53**: 17-21.

HILLBRICK, G. C.; MCMAHON, D. J. und McMANUS, W. R. [1999]: Microstructure of Indirectly and Directly Heated Ultra-high-temperature (UHT) Processed Milk Examined using Transmission Electron Microscopy and Immunogold Labelling. *Lebensmittel - Wissenschaft und - Technologie* **32** (8): 486-494.

HINRICHS, J. [1994]: Die mechanische Stabilität von Fettkugeln mit kristalinem Fettanteil im Strömungsfeld - Verfahrenstechnische Einflußgrößen und technologische Veränderungen. Technische Universität München, Freising-Weihenstephan.

HOEKSTRA, D. [1982]: Fluorescence method for measuring the kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced phase separations in phosphatidylserine-containing lipid vesicles. *Biochemistry* **21** (5): 1055-1061.

HOEKSTRA, D. und DÜZGÜNES, N. [1993]: Lipid Mixing Assays to Determine Fusion in Liposome Systems. *Methods in Enzymology*. Düzgünes, N. San Diego, Academic Press, Inc. **220**: 15-32.

HOFMANN, M. [2005]: Design und funktionelle Charakterisierung neuartiger membranfusogener Peptidsequenzen. Technische Universität München, Freising-Weihenstephan.

HOFMANN, M. W.; WEISE, K.; OLLESCH, J.; AGRAWAL, P.; STALZ, H.; STELZER, W.; HULSBERGEN, F.; DE GROOT, H.; GERWERT, K.; REED, J. und LANGOSCH, D. [2004]: De novo design of conformationally flexible transmembrane peptides driving membrane fusion. *PNAS* **101** (41): 14776-14781.

HUERTA, L.; LOPEZ-BALDERAS, N.; LARRALDE, C. und LAMOYI, E. [2006]: Discriminating in vitro cell fusion from cell aggregation by flow cytometry combined with fluorescence resonance energy transfer. *Journal of Virological Methods* **138** (1-2): 17-23.

HUPPERTZ, T. und KELLY, A. L. [2006]: Physical Chemistry of Milk Fat Globules. *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids*, 3rd edition. FOX, P. F. und MCSWEENEY, P. L. New York, Springer.

JENNESS, R. und KOOPS, J. [1962]: Preparation and properties of a salt solution which simulates milk ultrafiltrate. *Neth. Milk & Dairy J.* **16** (3): 153-164.

JENSEN, O. N.; WILM, M.; SHEVCHENKO, A. und MANN, M. [1999]: Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2-DE gels. *Methods Mol Biol.* **112**: 513-530.

JENSEN, R. G. und NEWBURG, D. S. [1995]: Bovine milk lipids. *Handbook of Milk Compositio*. JENSEN, R. G. San Diego, CA, Academic Press.

KAISER, R. [2005]: Mündliche Mitteilung - 1. Workshop muva/TUM. Kempten.

KANNO, C. und KIM, D.-H. [1990]: A Simple Procedure for the Preparation of Bovine Milk Fat Globule Membrane and a Comparison of Its Composition, Enzymatic Activities, and Electrophoretic Properties with Those Prepared by Other Methods. *Agricultural and Biological Chemistry* **54** (11): 2845-2854.

KEENAN, T. [2001]: Historical Perspective: Milk Lipid Globules and Their Surrounding Membrane: A Brief History and Perspectives for Future Research. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **6** (3): 365-371.

KEENAN, T. und DYLEWSKI, D. P. [1995]: Intracellular origin of milk lipid globules and the nature and structure of the milk lipid globule membrane. *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids*. Fox, P. F. London, Chapman & Hall.

KEENAN, T.; MOON, T.-W. und DYLEWSKI, D. P. [1983]: Lipid Globules Retain Membrane Material After Homogenization. *Journal of Dairy Science* **66**: 196-203.

KEENAN, T. W. und MATHER, I. H. [2003]: Milk Fat Globule Membrane. *Encyclopedia of Dairy Science*. ROGINSKI, H., FUQUAY, J. W. und FOX, P. F. London Academic Press. **3**: 1568-1576.

KEENAN, T. W. und MATHER, I. H. [2006]: Intracellular Origin of Milk Fat Globules and the Nature of the Milk Fat Globule Membrane. *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids, 3rd edition*. Fox, P. F. und MCSWEENEY, P. L. New York, Springer. **2**: 137-171.

KESSLER, H. G. [1996]: *Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik - Molkereitechnologie*. München, Verlag A. Kessler.

KIRST, E. [1996]: Untersuchungen zu lipolytischen Veränderungen des Milchfettes und deren Auswirkungen auf die Qualität von Milch und Milcherzeugnisse. *Deutsche Molkerei Zeitung* **4** (168-181).

KOBYLKA, D. und CARRAWAY, K. L. [1973]: Proteolytic digestion of proteins of the milk fat globule membrane." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **307** (1): 133-140.

LAEMMLI, U. K. [1970]: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

LEI, G. und MACDONALD, R. C. [2003]: Lipid Bilayer Vesicle Fusion: Intermediates Captured by High-Speed Microfluorescence Spectroscopy. *Biophysical Journal* **85**: 1585-1599.

HE, L.; BRADRICK, T. D.; KARPOVA, T. S.; WU, X.; FOX, M. H.; FISCHER, R.; McNALLY, J. G.; KNUTSON, J. R.; GRAMMER, M. A. und LIPSKY, P. E. [2003]: Flow cytometric measurement of fluorescence (Förster) resonance energy transfer from cyan fluorescent protein to yellow fluorescent protein using single-laser excitation at 458 nm. *Cytometry Part A* **53A** (1): 39-54.

LOPEZ, C. [2005]: Focus on the supramolecular structure of milk fat in dairy products. *Reproduction Nutrition Development* **45**: 497-511.

LOPEZ, C.; BRIARD-BION, V.; CAMIER, B. und GASSI, J. Y. [2006a]: Milk Fat Thermal Properties and Solid Fat Content in Emmental Cheese: A Differential Scanning Calorimetry Study. *Journal of Dairy Science* **89** (8): 2894-2910.

LOPEZ, C.; CAMIER, B. und GASSI, J.-Y. [2007]: Development of the milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy. *International Dairy Journal* **17** (3): 235-247.

LOPEZ, C. und DUFOUR, E. [2001]: The Composition of the Milk Fat Globule Surface Alters the Structural Characteristics of the Coagulum. *Journal of Colloid and Interface Science* **233** (2): 241-249.

LOPEZ, C.; MAILLARD, M. B.; BRIARD-BION, V.; CAMIER, B. und HANNON, J. A. [2006b]: Lipolysis during Ripening of Emmental Cheese Considering Organization of Fat and Preferential Localization of Bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **54** (16): 5855-5867.

LOWRY, O. H.; ROSBROUGH, N. J.; FARR, A. L. und RANDALL, R. J. [1951]: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal Biological Chemistry* **193**: 265.

MALININ, V. S.; HAQUE, M. E. und LENTZ, B. R. [2001]: The Rate of Lipid Transfer during Fusion Depends on the Structure of Fluorescent Lipid Probes: A New Chain-Labeled Lipid Transfer Probe Pair. *Biochemistry* **40** (28): 8292-8299.

MATHER, I. H. [1978]: Separation of the proteins of bovine milkfat globule membrane by electrofocusing. *Biochimica et Biophysica Acta* **514**: 25-36.

MATHER, I. H. [2000]: "A Review and Proposed Nomenclature for Major Proteins of the Milk-Fat Globule Membrane." *Journal of Dairy Science* **83** (2): 203-247.

MATHER, I. H. und Keenan, T. [1998]: Origin and Secretion of Milk Lipids. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **3** (3): 259-273.

MATHER, I. H. und KEENAN, T. W. [1975]. Studies on the Structure of Milk Fat Globule Membrane. *Journal of Membrane Biology*. **21**: 65-85.

MCCRAE, C. H. und LEPOETRE, A. [1996]: Characterization of dairy emulsions by forward lobe laser light scattering - Application to milk and cream. *International Dairy Journal* **6** (3): 247-256.

McPHERSON, A. V. und KITCHEN, B. J. [1983]: Reviews of the progress of dairy science: the bovine milk fat globule membrane - its formation, composition, structure and behaviour in milk and dairy products. *Journal Dairy Research* **51**: 113-121.

MELSEN, J. P. und WALSTRA, P. [1989]: Stability of recombined milk fat globules. *Neth. Milk & Dairy J.* **43**: 54-69.

MICHALSKI, M.-C.; CAMIER, B.; GASSI, J.-Y.; BRIARD-BION, V.; LECONTE, N.; FAMELART, M.-H. und LOPEZ, C. [2007]: Functionality of smaller vs control native milk fat globules in Emmental cheeses manufactured with adapted technologies. *Food Research International* **40** (1): 191-202.

MICHALSKI, M.-C.; MICHEL, F.; SAINMONT, D. und BRIARD, V. [2002a]: Apparent [zeta]-potential as a tool to assess mechanical damages to the milk fat globule membrane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **23** (1): 23-30.

MICHALSKI, M. C.; BRIARD, V. und MICHEL, F. [2001]: Optical parameters of milk fat globules for laser light scattering measurements. *Lait* **81**: 787-796.

MICHALSKI, M. C.; MICHEL, F. und GENESTE, C. [2002b]: Appearance submicronic particles in the milk fat globule size distribution upon mechanical treatments. *Lait* **82**: 193-208.

MORRIS, S. J.; GIBSON, C. C.; SMITH, P. D.; GREIF, P. C.; STIRK, C. W.; BRADLEY, D.; HAYNES, D. H. und BLUMENTHAL, R. [1985]: Rapid kinetics of Ca<sup>2+</sup>-induced fusion of phosphatidylserine/phosphatidylethanolamine vesicles. The effect of bilayer curvature on leakage. *Journal Biological Chemistry* **260** (7): 4122-4127.

MULDER, H. und WALSTRA, P. [1974]: *The milk fat globule*. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen.

NEVILLE, M. C.; ZHANG, P. und ALLEN, J. [1995]: Minerals, Ions, and Trace Elements in Milk A. Ionic Interactions in Milk. *Handbook of Milk Composition*. JENSEN, R. G. San Diego, CA, Academic Press.

NIELSEN, R. L.; ANDERSEN, M. H.; MABHOUT, P.; BERGLUND, L.; PETERSEN, T. E. und RASMUSSEN, J. T. [1999]: Isolation of Adipophilin and Butyrophilin from Bovine Milk and Characterization of a cDNA Encoding Adipophilin. *Journal of Dairy Science* **82** (12): 2543-2549.

OGG, S. L.; WELDON, A. K.; DOBBIE, L.; SMITH, A. J. H. und MATHER, I. H. [2004]: Expression of butyrophilin (Btn1a1) in lactating mammary gland is essential for the regulated secretion of milk-lipid droplets. *PNAS* **101** (27): 10084-10089.

OHKI, S. und ARNOLD, K. [2000]: A mechanism for ion-induced lipid vesicle fusion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **18** (2): 83-97.

ORMEROD, M. G. [1994]: *Flow cytometry - a practical approach* Oxford, IRL Press.

PALLESEN, L. T.; BERGLUND, L.; RASMUSSEN, L. K.; PETERSEN, T. E. und RASMUSSEN, J. T. [2002]: Isolation and characterization of MUC15, a novel cell membrane-associated mucin. *European Journal of Biochemistry* **269** (11): 2755-2763.

PALLESEN, L. T.; PEDERSEN, L. R. L.; PETERSEN, T. E. und RASMUSSEN, J. T. [2007]: Characterization of Carbohydrate Structures of Bovine MUC15 and Distribution of the Mucin in Bovine Milk. *Journal of Dairy Science* **90** (7): 3143-3152.

PAPAHADJOPOULOS, D.; MEERS, P. R.; HONG, K.; ERNST, J. D.; GOLDSTEIN, I. M. und DÜZGÜNES, N. [1988]: Calcium-induced Membrane Fusion: From Liposomes to cellular Membranes. *Molecular Mechanisms of Membrane Fusion*. OHKI, S., DOLYE, D., FLANAGAN, T. D., HUI, S. W. und MAYHEW, E. New York and London, Plenum Press.

PATTON, S.; GENDLER, S. J. und SPICER, A. P. [1995]: The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues. *Biochimica et Biophysica Acta* **1241**: 407-424.

PATTON, S. und HUSTON, G. E. [1986]: A Method for Isolation of Milk Fat Globules. *Lipids* **21** (2): 170-174.

PATTON, S. und KEENAN, T. [1975]: The Milk Fat Globule Membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* **415**: 273-309.

PATTON, S.; LONG, C. und SOKKA, T. [1980]: Effect of Storing Milk on the Cholesterol and Phospholipid of Skim Milk. *Journal of Dairy Science* **63**: 697-700.

PETERSON, J. A.; SCALLAN, C. D.; CERIANI, R. L. und HAMOSH, M. [2001]: Structural and functional aspects of the three major glycoproteins of the human milk fat globule membrane. *Bioactive components of human milk*. NEWBURG, D. S. New York [u.a.], Kluwer Acad./Plenum Publ.

RÄTY, J. A. und PEIPONEN, K.-E. [1999]: Reflectance Study of Milk in the UV-Visible Range. *Applied Spectroscopy* **53** (9): 1123-1227.

REINHARDT, T. A. und LIPPOLIS, J. D. [2006]: Bovine Milk Fat Globule Membrane Proteom. *Journal of Dairy Research* **73**: 406-416.

ROBENEK, H.; HOFNAGEL, O.; BUERS, I.; LORKOWSKI, S.; SCHNOOR, M.; ROBENEK, M. J.; HEID, H.; TROYER, D. und SEVERS, N. J. [2006]: Butyrophilin controls milk fat globule secretion. *PNAS*: 0600795103.

SCHLIMME, E. und BUCHHEIM, E. [1999]: Milch und ihre Inhaltstoffe. Chemische und physikalische Eigenschaften. Gelsenkirchen, Verlag Th. Mann.

SCHOMACKER, M. [2001]: Beobachtungen zur Lagerstabilität von UHT-Sahne. Milchkonferenz 2001. Berlin, Deutsche Gesellschaft für Milchwissenschaft.

SHAPIRO, H. M. [2005]: Practical flow cytometry. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, Wiley-Liss, Inc..

SHI, J.; HEEGAARD, C. W.; RASMUSSEN, J. T. und GILBERT, G. E. [2004]: Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-L-serine and increased curvature. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1667** (1): 82-90.

SHIMIZU, M.; YAMAUCHI, K. und KANNO, C. [1979]: Proteolytic digestion of milk fat globule membrane proteins. *Milchwissenschaft* **34** (11): 666-668.

SHIMIZU, M.; YAMAUCHI, K. und KANNO, C. [1980]: Effect of proteolysis of milk fat globule membrane proteins on stability of the globules. *Milchwissenschaft* **35** (1): 9-12.

SINGH, H. [2006]: The milk fat globule membrane--A biophysical system for food applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **11** (2-3): 154-163.

SMITH, A. K.; GOFF, H. D. und KAKUDA, Y. [2000]: Microstructure and rheological properties of whipped cream as affected by heat treatment and addition of stabilizer. *International Dairy Journal* **10** (4): 295-301.

SMOLUCHOWSKI, M. v. [1916]: Versuch einer mathematischen Theorie der Koagulationskinetik kolloidaler Lösungen. *Zeitschrift für physik. Chemie* **XCII**: 129-168.

SONG, X.; SHI, J. und SWANSON, B. [2000]: Flow Cytometry-Based Biosensor for Detection of Multivalent Proteins. *Analytical Biochemistry* **284** (1): 35-41.

SOUCI, S. W.; FACHMANN, W. und KRAUT, H. [1986]: Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Nährwert-Tabellen 1986/1987. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.

STRAWBRIDGE, K. B.; RAY, E.; HALLETT, F. R.; TOSH, S. M. und DALGLEISH, D. G. [1995]: Measurement of Particle Size Distributions in Milk Homogenized by a Microfluidizer: Estimation of Populations of Particles with Radii Less Than 100 nm. *Journal of Colloid and Interface Science* **171** (2): 392-398.

STRUCK, D. K.; HOEKSTRA, D. und PAGANO, R. E. [1981]: Use of Resonance Energy Transfer to Monitor Membrane Fusion. *Biochemistry* **20**: 4093-4099.

STRYER, L. und HAUGLAND, R. P. [1967]: Energy transfer: a spectroscopic ruler. *PNAS* **58**: 719-729.

TAKAM MANGOVA, B. X. [2002]: Determination of the local viscosity inside polymerizing particles in emulsion via polarized fluorescence spectroscopy. Clausthal University of Technology, Clausthal.

TOLKACH, A. [2007]: Thermisches Denaturierungsverhalten von Molkenproteinfraktionen: Selektive Denaturierung – Fraktionierung mit Membranen – Reaktions-, Auffaltungs- und Aggregationskinetik Technische Universität München, Freising-Weihenstephan.

UNIPROT: UniProt sequence database. <http://www.ebi.uniprot.org>

USTER, P. S. und PAGANO, R. E. [1986]: Resonance Energy Transfer Microscopy: Observations of Membrane-bound Fluorescent Probes in Model Membranes and in Living Cells. *J. of Cell. Biolog.* **103**: 1221-1234.

VALIVULLAH, H. M.; BEVAN, D. R.; PEAT, A. und KEENAN, T. [1988]: Milk lipid globules: Control of their size distribution. *PNAS* **85**: 8775-8779.

VAN BOEKEL, M. A. J. S. [1980]: Influence of fat crystals in the oil phase on stability of oil-in-water emulsions. Wageningen, Centre of Agricultural Publishing and Dokumentation.

VAN BOEKEL, M. A. J. S. und FOLKERTS, F. [1991]: Effect of heat treatment on the stability of milk fat globules. *Milchwissenschaft* **46**: 758-765.

VDLUFA – Methodenbuch Band VI, C. [1996]: Handbuch der landwirtschaftlichen Versuchs- und Untersuchungsmethodik (Methodenbuch). Darmstadt, VDLUFA-Verlag.

VENTUROLI, M.; MADDALENA SPEROTTO, M.; KRANENBURG, M. und SMIT, B. [2006]: Mesoscopic models of biological membranes. *Physics Reports* **437** (1-2): 1-54.

VORBACH, C.; SCRIVEN, A. und CAPECCHI, M. R. [2002]: The housekeeping gene xanthine oxidoreductase is necessary for milk fat droplet enveloping and secretion: gene sharing in the lactating mammary gland. *Genes Dev.* **16** (24): 3223-3235.

WALSTRA, P. [1969]: Studies on milk fat dispersion II: The globule-size distribution of cow's milk. *Neth. Milk & Dairy J.* **23**: 99-110.

WALSTRA, P. [1995]: Physical Chemistry of Milk Fat Globules. *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids.* FOX, P. F. London, Chapman & Hall. **2**.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A. und VAN BOEKEL, M. A. J. S. [1999]: *Dairy Technology.* New York, Basel, Dekker.

WALSTRA, P. und JENNESS, R. [1984]: *Dairy Chemistry and Physics.* New York, John Wiley & Sons.

WANINGE, R.; NYLANDER, T.; PAULSSON, M. und BERGENSTAHL, B. [2003]: Phase equilibria of model milk membrane lipid systems. *Chemistry and Physics of Lipids* **125** (1): 59-68.

WIKING, L.; BERTRAM, H. C.; BJÖRCK, L. und NIELSEN, J. H. [2005]: Evaluation of cooling strategies for pumping of milk - Impact of fatty acid composition on free fatty acid levels. *Journal of Dairy Research* **72** (04): 476-481.

WIKING, L.; BJÖRCK, L. und NIELSEN, J. H. [2003]: Influence of feed composition on stability of fat globules during pumping of raw milk. *International Dairy Journal* **13** (10): 797-803.

WILCOX, C. P.; JANOLINO, V. G. und SWAISGOOD, H. E. [2002]: Isolation and Partial Characterization of CD36 from Skim Milk. *Journal of Dairy Science* **85** (8): 1903-1908.

WILSCHUT, J.; SCHOLMA, J.; BENTAL, M.; HOEKSTRA, D. und NIR, S. [1985]: Ca<sup>2+</sup>-induced fusion of phosphatidylserine vesicles: mass action kinetic analysis of membrane lipid mixing and aqueous contents mixing. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **821** (1): 45-55.

YAMAUCHI, K.; SHIMIZU, M. und ANDO, T. [1982]: Milk fat globule membrane proteins in aseptically packed ultra-heat-treated milk: changes during storage. *Agricultural and Biological Chemistry* **46** (3): 823-825.

YE, A.; ANEMA, S. G. und SINGH, H. [2004a]: High-Pressure-Induced Interactions Between Milk Fat Globule Membrane Proteins and Skim Milk Proteins in Whole Milk. *Journal of Dairy Science* **87** (12): 4013-4022.

YE, A.; SINGH, H.; OLDFIELD, J. D. und ANEMA, S. [2004b]: Kinetics of heat-induced association of [beta]-lactoglobulin and [alpha]-lactalbumin with milk fat globule membrane in whole milk. *International Dairy Journal* **14** (5): 389-398.

YE, A.; SINGH, H.; TAYLOR, M. W. und ANEMA, S. [2002]: Characterization of protein components of natural and heat-treated milk fat globule membranes. *International Dairy Journal* **12** (4): 393-402.

YE, A.; SINGH, H.; TAYLOR, M. W. und ANEMA, S. G. [2004c]: Interactions of whey proteins with milk fat globule membrane proteins during heat treatment of whole milk. *Lait*: 269-283.

YU-LI, W. [2004]: Yu-li Wang's Lab: Laboratory Protocols. <http://ylwang.umassmed.edu/protocol/index.htm>.

## 7 Anhang

### 7.1 Fettbestimmungen

Der Fettgehalt der MFK-Emulsionen nach Isolation der MFK aus Rohmilch wurde durch Verdünnen der Proben mit Puffer eingestellt. Je nach verwendetem Verdünnungsfaktor konnte dabei eine andere Fettkonzentration eingestellt werden (siehe Abb. 7.1).

Die Fettbestimmung wurde entweder mittels Gerber oder durch die gravimetrische Bestimmung der extrahierten Lipide durch Bligh & Dyer durchgeführt. Wie in Abb. 7.1 zu erkennen ist, wird durch die gravimetrische Bestimmung gegenüber der üblichen Fettbestimmung mittels Gerber ein leicht erhöhter Fettgehalt bestimmt, jedoch ist diese erhöhte Fettkonzentration nicht signifikant verschieden von der Fettkonzentration der Proben, die mittels Gerber bestimmt worden sind.

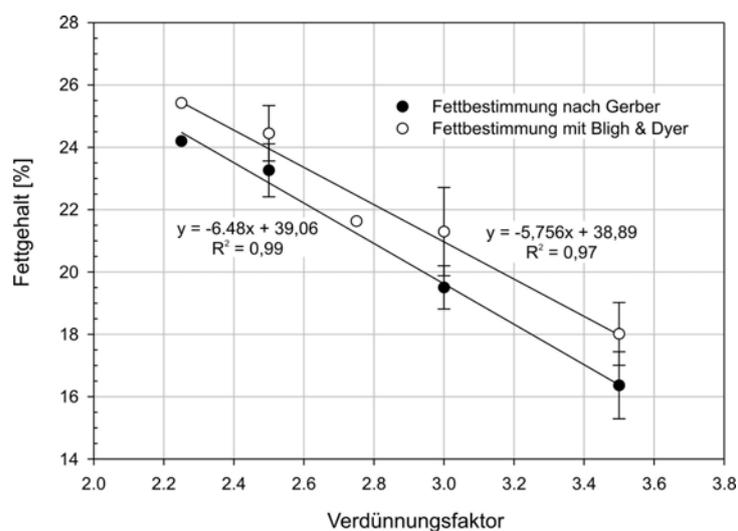


Abb. 7.1: Abhängigkeit des Fettgehaltes der MFK-Emulsionen von dem Verdünnungsfaktor der Proben nach der Isolation der MFK aus Rohmilch bzw. nach der Reinigung der markierten MFK. Der Fettgehalt der Proben wurde entweder mittels Gerber oder gravimetrisch nach der Extraktion der Lipide mit Bligh & Dyer ermittelt. Messpunkte stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dar ( $n = 3$ ).

### 7.2 Extinktionskoeffizienten von NBD-PE und Rh-PE in n-Butanol

Für die Konzentrationsbestimmung von NBD-PE und Rh-PE in Butanol wurden die Extinktionskoeffizienten der Farbstoffe in diesem Lösungsmittel bestimmt. Bekannte Konzentrationen von NBD-PE und Rh-PE wurden in Butanol gelöst und die Extinktion bei 465 nm (NBD-PE) und 560 nm (Rh-PE) mit einem Spektralphotometer bestimmt und gegenüber der Konzentration der Fluoreszenzfarbstoffe aufgetragen (siehe Abb. 7.2). Die Extinktionskoeffizienten wurden aus den Geradensteigungen ermittelt.

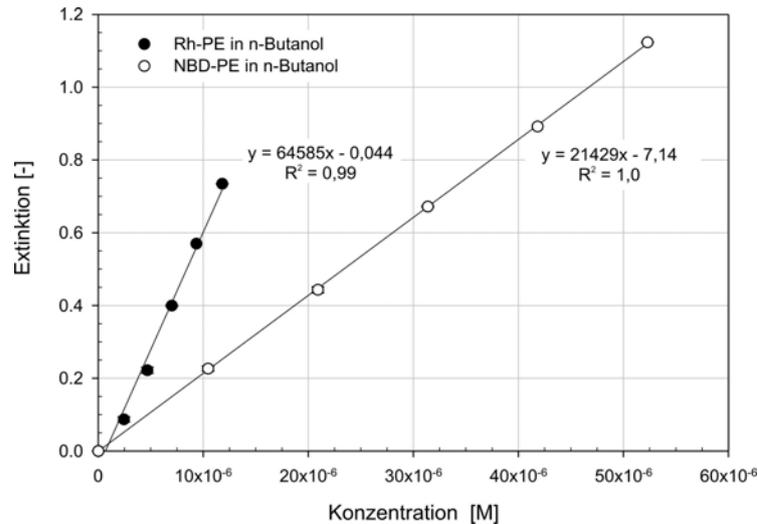


Abb. 7.2: Extinktion von NBD- und Rh-PE in Abhängigkeit der Konzentration der Fluoreszenzfarbstoffe bei 465 nm (NBD-PE) und 560 nm (Rh-PE). Messpunkte stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dar ( $n = 2$ ).

### 7.3 Kontrolle der Fluoreszenzfarbstoffkonzentration

Zur Kontrolle der Fluoreszenzfarbstoffkonzentration wurden Aliquots der MFK-Emulsionen vor und nach der Abtrennung der nicht in die Membran integrierten Fluoreszenzfarbstoffe genommen. Die Lipidfraktionen dieser Proben wurden durch Bligh & Dyer extrahiert, die Fettkonzentration durch Wiegen bestimmt, danach wurden die Proben in Butanol gelöst, und anschließend die Fluoreszenzfarbstoffkonzentration durch Absorptionsmessungen am Spektralphotometer bestimmt.

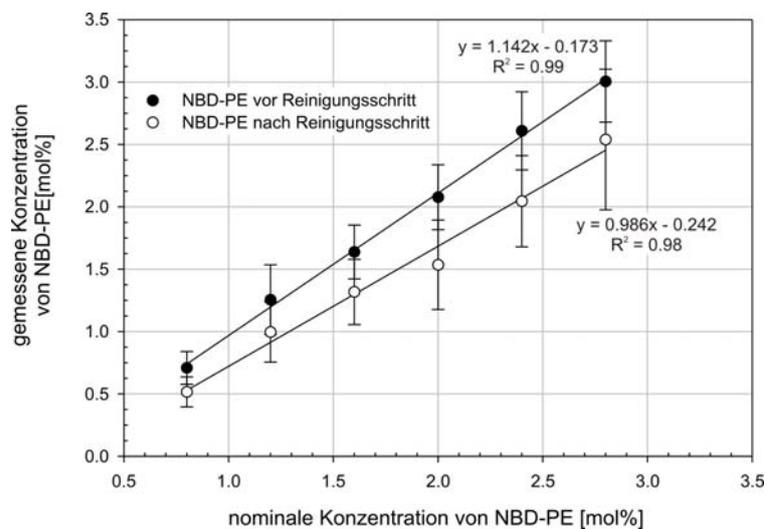


Abb. 7.3: Korrelation der gemessenen Konzentration von NBD-PE nach Extraktion der MFKM mit Bligh & Dyer in den Membranen der MFKM mit der nominalen eingesetzten Konzentration von NBD-PE. Aliquots der MFKM-Emulsionen wurden vor der Abtrennung (gefüllte Kreise) der nicht eingebauten NBD-PE-Moleküle und nach dem Reinigungsschritt (leere Kreise) genommen. Messpunkte stellen Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dar ( $n = 6-8$  unabhängige Messungen).

Abb. 7.3 zeigt beispielhaft die Korrelation zwischen der eingesetzten (nominalen) NBD-PE-Konzentration und die vor und nach der Reinigung bestimmte NBD-PE-Konzentration der MFK-Emulsionen. Die Steigung der Regressionsgerade der NBD-PE-Konzentration nach dem Reinigungsschritt ist eins, so dass die nominale Konzentration der Proben verwendet wurde. Die zum Teil großen Standardfehler werden verursacht durch die sich addierenden Fehler bei der Bestimmung der Fluoreszenzfarbstoffkonzentration der MFK-Emulsionen.

## 7.4 Anfärbungseffizienz der Markierungsmethode

Die Anfärbungseffizienz der Markierungsmethode konnte durch die Bestimmung der Fluoreszenz der MFK mittels der Durchflusszytometrie ermittelt werden. Wie Abb. 7.4 zeigt, kann mit einem Durchflusszytometer sehr gut zwischen unmarkierten MFK und den mit NBD-PE bzw. Rh-PE

markierten MFK unterschieden werden, wenn die Ereigniszahl (ein Ereignis entspricht einer gemessenen MFK bei 10.000 vermessenen Ereignissen) gegen die rel. NBD-Fluoreszenz bzw. die rel. Rh-Fluoreszenz aufgetragen wird.

Durch Festlegung von Gates, in denen die unmarkierten bzw. markierten MFK erwartet werden (z.B. entspricht P2 allen unmarkierten MFK bei der rel. NBD-Fluoreszenz), kann berechnet werden, wie

hoch die Anfärbungseffizienz innerhalb einer MFK-Population ist. Die in Abb. 7.4 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass mit der

entwickelten Markierungsmethode 98-99% der MFK mit NBD-PE bzw. Rh-PE markiert werden konnten.

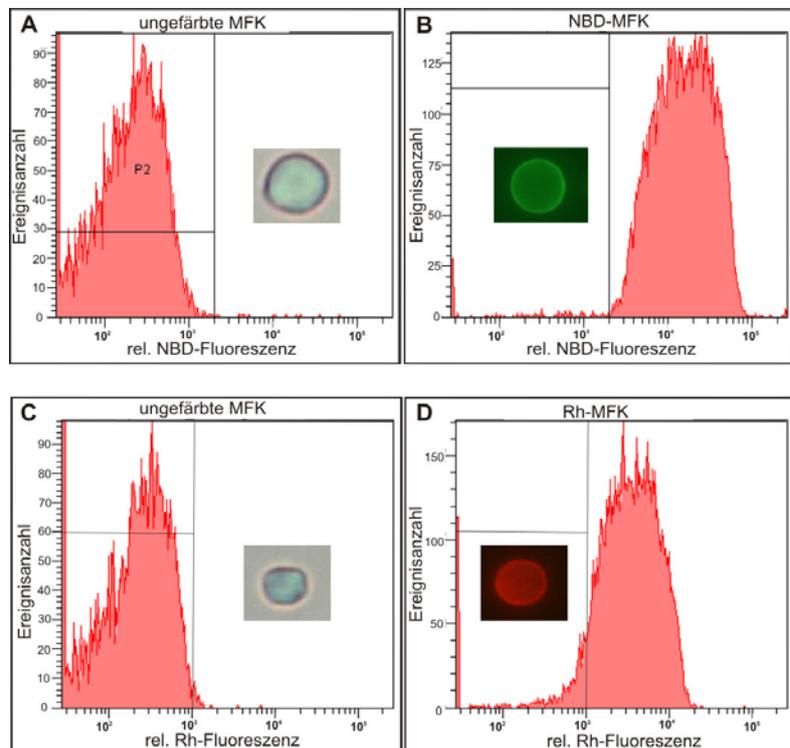


Abb. 7.4: Ereigniszahl im Durchflusszytometer ungefärbten {A und C}, mit NBD- {B} bzw. Rh- {D} von markierten MFK in Abhängigkeit der rel. NBD- bzw. Rh-Fluoreszenz. Die NBD-PE- und Rh-PE-Konzentration war jeweils 1.0 mol%.

## 7.5 Schnittstellen der verwendeten Enzyme in der Aminosäuresequenz von Protein

- Proteinase K: Baut viele Proteine sogar im nativen Zustand ab und spaltet predominant die Peptidbindungen, wenn an den Carboxylgruppen fetthaltige Aminosäuren anstoßen.
- Trypsin: Spaltet Peptide an der C-terminalen Seite von Aminosäureresten, die Lysin und Arginin enthalten. Dabei wird die Quote der Hydrolyse langsamer, wenn sich an beiden Enden der zu spaltenden Seiten ein Säurerest befindet. Prolinreste an diesen Stellen verursachen eine Inhibierung der Spaltung.
- Papain: Ist eine Protease mit Esterase-Aktivität. Das Spezifische der Spaltung durch Papain ist die Variabilität. Bei der X-Y Verbindung, bei der das X eine nicht spezifische AS ist, wird Arginin und Lysin bevorzugt. Steht eine Phenylalanin-X-Y Verbindung zu Verfügung, wird Phenylalanin begünstigt. Dabei ist das Y ein nichtspezifischer Aminosäurerest.
- Endoproteinase V8: Hydrolysiert Peptidverbindungen an der Carboxylgruppe von Glutamin- und Asparaginresten.

## 7.6 Erstellung von synthetischem Milchultrafiltrat (SMUF)

Die Erstellung von SMUF erfolgte nach einer Vorschrift von JENNES und KOOPS [1962].

Lösung 1:            15,80 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
                         12,00 g  $\text{K}_3\text{Citrat} \times \text{H}_2\text{O}$   
                         17,91 g  $\text{Na}_3\text{Citrat} \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
                         1,80 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$   
                         6,00 g KCL                            auf 200 ml mit  $\text{H}_2\text{O}$  (MilliQ-Wasser) auffüllen.

Lösung 2:            13,19 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
                         6,51 g  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$             auf 200 ml mit  $\text{H}_2\text{O}$  (MilliQ-Wasser) auffüllen.

SMUF-Lösung:

20 ml Lösung 1 in 800 ml dest.  $\text{H}_2\text{O}$  vorgelegt, 20 ml Lösung 2 und 0,30 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$  dazugegeben. Den pH-Wert wurde mit 0,1 N KOH auf den gewünschten pH-Wert von 6,5 eingestellt und anschließend auf 1000 ml aufgefüllen.

ESMUF-Lösung:

20 ml Lösung 1 in 800 ml dest.  $\text{H}_2\text{O}$  vorgelegt, 20 ml Lösung 2 und 0,30 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$  sowie 3,722 g EDTA dazugegeben. Die pH-Wert Einstellung erfolgt wie für die SMUF-Lösungen.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	A: Schematischer Aufbau der MFK, B: Proteintopologie und vorgeschlagene Struktur der MFKM.....	17
Abb. 1.2:	MFKM einer mechanisch beschädigten (homogenisierten) MFK.....	19
Abb. 1.3:	Liposomenfusion mit dem sog. Diluting Assay durch FRET zwischen NBD-PE und Rh-PE. ....	23
Abb. 1.4:	Liposomenaggregation und -fusion mit dem sog. Mixing Assay.....	24
Abb. 3.1:	Messprinzip eines Durchflusscytometers.....	30
Abb. 3.2:	Schematische Darstellung der vier unterschiedlichen MFK-Populationen im Fluoreszenzdiagramm.....	31
Abb. 3.3:	Versuchsvarianten der Rahmbehandlung.....	34
Abb. 4.1:	Schematische Darstellung des Markierungsprozesses der MFKM mit Fluoreszenzfarbstoffen. ....	40
Abb. 4.3:	Mit NBD-PE und Rh-PE markierte MFK bei Anregungswellenlängen von 450-490 nm für NBD-PE bzw. von 530-585 nm für Rh-PE.....	42
Abb. 4.4:	Fluoreszenzspektren von unmarkierten MFK, FRET-MFK und NBD-MFK und Liposomen nach Anregung bei 460 nm. ....	42
Abb. 4.5:	Graphische Darstellung der rel. Rhodamin-Fluoreszenz in Abhängigkeit der rel. NBD-Fluoreszenz für vier unterschiedliche MFK-Populationen.....	44
Abb. 4.6:	Abhängigkeit der Effizienz des Energietransfers von NBD-PE zu Rh-PE in Abhängigkeit der nominalen Farbstoffkonzentration.....	46
Abb. 4.7:	Fluoreszenzdiagramm von FRET-MFK mit unterschiedlichen nominalen Konzentrationen von sowohl NBD-PE als auch Rh-PE.....	48
Abb. 4.8:	Graphische Darstellung der Abhängigkeit der Steigung der linearen Regressionsgeraden im Fluoreszenzdiagramm von der Effizienz des Energieübertrags.....	48
Abb. 4.9:	Phasenkontrastbilder und Fluoreszenzbilder mit NBD- bzw. Rhodaminanregung von MFK im Mixing Assay.....	51
Abb. 4.10:	Fluoreszenzdiagramme von MFK zu verschiedenen Aggregations- und Fusionszeitpunkten des Mixing Assays.....	53
Abb. 4.11:	Fluoreszenzdiagramme von MFK zu verschiedenen Fusionszeitpunkten des Mixing Assays. ....	53
Abb. 4.13:	Aggregation und Fusion von MFK, bestimmt durch den Mixing Assay.....	55
Abb. 4.14:	Fluoreszenzdiagramm von MFK zu verschiedenen Aggregations- und Fusionszeitpunkten des Diluting Assays.....	57
Abb. 4.15:	Fluoreszenzdiagramm von MFK zu verschiedenen Fusionszeitpunkten des Diluting Assays.. ....	57

---

Abb. 4.16	Aggregation und Fusion von MFK, bestimmt durch den Diluting Assay. ....	58
Abb. 4.17:	Reduzierung der FRET-Effizienz durch Fusionsereignisse von FRET-MFK mit unmarkierten MFK.....	59
Abb. 4.18:	Vergleich der gemessenen Interaktion der MFK im Mixing Assay und im Diluting Assay .....	60
Abb. 4.19:	Temperaturabhängige Aggregation und/oder Fusion der MFK. ....	62
Abb. 4.20:	Temperaturabhängige Messung der Fusion der MFK.....	63
Abb. 4.21:	Bestimmung der Fusion von unterschiedlich homogenisierten MFK durch den Diluting Assay.....	64
Abb. 4.22:	Bestimmung der Aggregation und/oder Fusion bzw. der Fusion von homogenisierten MFK durch den Diluting Assay. ....	66
Abb. 4.23:	Zunahme des mittleren Durchmessers der Partikelgrößenverteilung bei Proteolyse der Membranproteine mit verschiedenen Proteasen. ....	68
Abb. 4.24:	SDS-Gel der MFKM-Proteine in isolierten MFK nach dem Verdau der Membranproteine mit Trypsin. ....	70
Abb. 4.25:	Abnahme der rel. Gesamtmembranproteinkonzentration von MFK .....	72
Abb. 4.26:	Abbau von CD36, MUC15, ADPH/obere Bande PAS 6/7 und untere Bande PAS 6/7 in der MFKM durch Proteinase K, Trypsin, Endoproteinase V8 und Papain.....	74
Abb. 5.1:	Theoretische Effizienz des Energieübertrags von NDB auf Rhodamin in Abhängigkeit des molekularen Abstandes der Fluoreszenzfarbstoffe. ....	78
Abb. 5.2:	Oberflächenbeladung von unterschiedlich homogenisierten Rahmproben .....	86
Abb. 5.4:	Einfluss der Verdünnung der Emulsionsproben auf das rel. Verhältnis von markierten zu unmarkierten MFK in Abhängigkeit der Zeit. ....	90
Abb. 5.5:	Einfluss der verwendeten Proteasen auf den Abbau der rel. Gesamtmembranprotein- konzentration während der Hydrolyse der MFKM-Proteine.....	96
Abb. 5.6:	Konzentrationsabhängige Geschwindigkeitskonstante der Proteinhydrolyse der MFKM- Proteine. ....	97
Abb. 7.1:	Abhängigkeit des Fettgehaltes der MFK-Emulsionen von dem Verdünnungsfaktor der Proben nach der Isolation der MFK aus Rohmilch bzw. nach der Reinigung der markierten MFK. ....	111
Abb. 7.2:	Extinktion von NBD- und Rh-PE in Abhängigkeit der Konzentration der Fluoreszenzfarbstoffe .....	112
Abb. 7.3:	Korrelation der gemessenen Konzentration von NDB-PE nach Extraktion der MFKM mit Bligh & Dyer in den Membranen der MFK mit der nominalen eingesetzten Konzentration von NDB-PE.....	112

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Hauptbestandteile der Kuhmilch .....	3
Tab. 1.2:	Aggregationsmechanismen von Fettkugeln in Milch und Rahm .....	6
Tab. 1.3:	Zusammensetzung der MFKM aus Kuhmilch .....	11
Tab. 1.4:	Hauptproteine der MFKM .....	12
Tab. 3.1:	Verwendete Messparameter für die durchflusscytometrischen Messungen .....	31
Tab. 3.2:	Verwendete Enzyminhibitoren für das Abstoppen der Proteolyse der MFKM-Proteine... .....	34
Tab. 3.3:	Brechungsindizes für Wasser und Milchfett bei 20 °C.....	38
Tab. 4.1:	Medianwert der rel. NBD-Fluoreszenz der verschiedenen Gates in Abb. 4.5.....	44
Tab. 4.2:	Identifizierung der MFKM-Proteine durch Peptidfragmente aus dem In-Gel-Verdau .	71
Tab. 4.3:	Zusammenhang zwischen proteolytischem Abbau der MFKM-Proteine einer Fusion der MFK.....	74

## Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Veröffentlichungen aus der Promotion:

Ahrens, M. und Langosch, D. (2007)

*Aggregation und Fusion von Milchfettkugeln – neuartige Möglichkeiten zur Charakterisierung von Emulsionen*

Deutsche Molkerei Zeitung, 22.

Präsentationen aus der Promotion:

Ahrens, M. und Langosch, D.

*Entwicklung eines Aggregations- und Fusionassays für Milchfettkugeln*

1. Workshop TUM / Ziel – muva kempten 2005, 24 November 05, Kempten.

Ahrens, M. und Langosch, D.

*Aggregation und Fusion von Milchfettkugeln – neuartige Möglichkeiten zur Charakterisierung von Emulsionen*

Weihenstephaner Milchwirtschaftliche Herbsttagung 2007, 4.-5. Oktober 07, Freising.

Posterbeiträge aus der Promotion:

Ahrens, M., Schnäbele, K., Gütlich, K. und Langosch, D.

*Fluoreszenzbasierte Bestimmung der Aggregation und Fusion von Milchfettkugeln mittels Durchflusszytometrie*

Milchkonferenz 2007, 17.-18. September 07, Wien.

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Malte Ahrens  
Geburtsdatum/-ort: 22.02.1977/Helmstedt  
Wohnsitz: Erdinger Str. 33, 85356 Freising

### Schulische Ausbildung

08/83 - 06/87 Grundschule Hoiersdorf  
08/87 - 06/89 Orientierungsstufe Eichendorffschule Schöningen  
08/89 - 06/93 Realschule Schöningen  
08/93 - 06/96 Gymnasium am Bötschenberg in Helmstedt, Abitur

### Akademische Ausbildung

11/96 - 09/2002 Studium der Technologie und Biotechnologie der Lebensmittel an der Technischen Universität München, Weihenstephan, Freising.  
04/02 - 09/2002 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TU München, Weihenstephan/Freising  
Arbeitsbereich: Proteintechnologie und Membrantrennverfahren  
03/03 - 01/07 Promotion an der TU München am Lehrstuhl Chemie der Biopolymere bei Prof. Dr. D. Langosch

### Sonstige Tätigkeiten

07/96 - 10/96 Betriebspraktikum in der Woltersbrauerei in Braunschweig,  
Arbeitsbereich: Qualitätssicherung  
11/98 - 02/99 Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, TU München, Weihenstephan/Freising  
Betreuung einer Studentengruppe im Rahmen eines Mikrobiologiepraktikums des Lehrstuhls  
11/00 - 02/01 Praktikum am Forschungszentrum für Milch und Lebensmittel, TU München, Weihenstephan/Freising  
Arbeitsbereich: Molkereitechnologie  
05/01 - 07/01 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Lebensmittelverfahrenstechnik, TU München, Weihenstephan/Freising,  
Arbeitsbereich: Proteintechnologie und Membrantrennverfahren  
11/02 - 12/02 Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik, TU München, Weihenstephan/Freising  
Arbeitsbereich: Caseinomacropetidgewinnung