

Die aliphatische Seitenkette von Cholesterol bestimmt essenzielle Membraneigenschaften**

Holger A. Scheidt, Thomas Meyer, Jörg Nikolaus, Dong Jae Baek, Ivan Haralampiev, Lars Thomas, Robert Bittman, Peter Müller, Andreas Herrmann und Daniel Huster*

Professor Jörg Kärger zum 70. Geburtstag gewidmet

Die biologische Membran ist die wichtigste in der Natur vorkommende Grenzfläche. Die Eigenschaften dieser Barriere werden durch die Zusammensetzung und chemische Struktur der sie bildenden Moleküle bestimmt. Zellmembranen unterliegen einer hierarchischen Domänenstruktur auf der mesoskopischen Längenskala,^[1] die durch präferenzielle Wechselwirkungen zwischen den Hauptkomponenten der Membran, d.h. Phospholipiden, Cholesterol (Chol), Glykolipiden und Membranproteinen, verursacht wird.^[2] Insbesondere anziehende Wechselwirkungen zwischen Chol und Sphingolipiden oder gesättigten Phospholipiden und/oder Membranproteinen wurden als Triebkraft der Domänenbildung identifiziert.^[3] Eine wichtige Ursache für viele Phasentrennungsphänomene in Membranen sind die präferenziellen Wechselwirkungen zwischen Chol und gesättigten Lipidketten.^[4] Über zahlreiche Beispiele für die bevorzugte Wechselwirkung zwischen Chol und gesättigten Phospholipiden oder Sphingomyelin wurde bereits berichtet.^[3b,5] Es wird davon ausgegangen, dass die Wechselwirkung zwischen Chol und gesättigten Lipidketten durch Van-der-Waals-Anziehung zwischen dem flachen Ringsystem von Chol (insbesondere der glatten α -Fläche) und gesättigten Phospholipidketten verursacht wird.^[6] Dies führt zur Versteifung der Lipidketten durch die Vergrößerung ihrer molekularen Ordnung, was als Lipidkondensation bezeichnet wird.^[7] Die dadurch vergrößerte Packungsdichte der Moleküle verringert die Permeabilität der Membran.^[8] Überraschenderweise ist der Einfluss der aliphatischen Seitenkette von Chol auf die Lipidkondensation und Domänenbildung der Membran

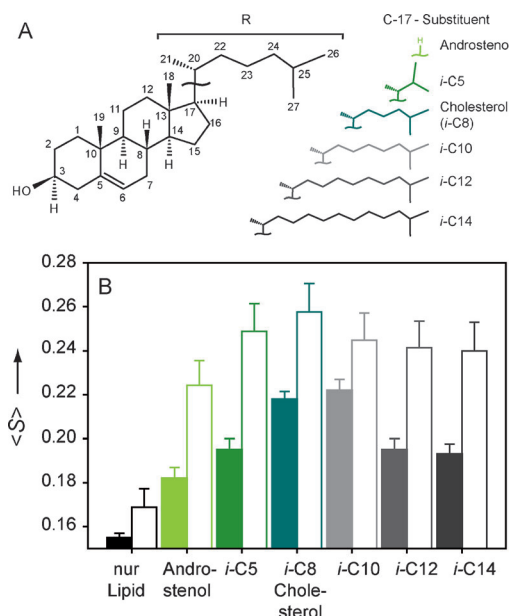


Abbildung 1. A) Strukturen von Chol und den Sterolvarianten mit zunehmender Länge der verzweigten Seitenkette, die in dieser Arbeit untersucht wurden. B) Mittlere Ordnungsparameter ($\langle S \rangle$) von [D₃₁]POPC- (gefüllte Balken) und [D₆₂]DPPC-Membranen (leere Balken) in Gegenwart von 20 Mol-% der genannten Sterolvarianten.

bisher noch nicht vollkommen verstanden. Deshalb haben wir systematisch den Einfluss der methylverzweigten (Isoform-) Seitenkette von Chol mit einer Kettenlänge von 5 bis 14 Kohlenstoffatomen^[9] (Abbildung 1A) auf wichtige Membraneigenschaften untersucht.

Um den Einfluss der Seitenkette von Chol auf die Lipidkondensation zu untersuchen, wurden ²H-NMR-Ordnungsparameter^[4] für Membranmischungen aus vollständig gesättigten [D₆₂]DPPC- oder einfach ungesättigten [D₃₁]POPC-Lipiden in Gegenwart von 20 Mol-% des entsprechenden Sterolanalogons aufgenommen. ²H-NMR-Spektren und Ordnungsparameterplots sind in den Abbildungen S1–S4 gezeigt. Lipidmembranen in Abwesenheit des Sterolanalogons dienten als Referenz und zeigten die niedrigsten Kettenordnungsparameter. Membranen aus gesättigtem DPPC zeigten höhere Ordnungsparameter als Doppelschichten aus ungesättigtem POPC. Alle hier untersuchten Sterole erhöhten die Kettenordnung der Membran, d.h., sie induzierten die Lipidkondensation. Die Stärke des Kondensationseffektes war hierbei von der Länge der verzweigten

[*] Dr. H. A. Scheidt, T. Meyer, Dr. L. Thomas, Prof. Dr. D. Huster
Institut für Medizinische Physik und Biophysik
Universität Leipzig
Härtelstraße 16–18, 04107 Leipzig (Deutschland)
E-Mail: daniel.huster@medizin.uni-leipzig.de

Dr. J. Nikolaus, I. Haralampiev, Dr. P. Müller, Prof. Dr. A. Herrmann
Institute für Biologie/Biophysik
Humboldt-Universität zu Berlin
Invalidenstraße 42, 10115 Berlin (Deutschland)

Dr. D. J. Baek, Prof. Dr. R. Bittman
Department of Chemistry and Biochemistry
Queens College of CUNY
Flushing, NY 11367-1597 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde durch die NIH (Grant HL-083187 für R.B.) und die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; SFB 1052, B6 für D.H.) unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201306753> zu finden.

Seitenkette des Sterols abhängig. Diese Unterschiede lassen sich am besten als mittlerer Ordnungsparameter $\langle S \rangle$ der Phospholipidkette in Gegenwart des Sterols mit variierender Seitenkettenlänge darstellen. Abbildung 1B zeigt einen Anstieg des POPC-Ordnungsparameters in Gegenwart von Androst-5-en-3- β -ol (Androstenol), das keine Seitenkette trägt, über *i*-C5-Sterol und natives Cholesterol hin zum *i*-C10-Sterol. Sterole mit längeren Seitenketten wie *i*-C12 und *i*-C14 induzieren dagegen eine abgeschwächte Lipidkondensation. Besonders interessant ist die Beobachtung, dass das Ringsystem von Chol nur etwa 40 % der Lipidkondensation verursacht, während die *i*-C8-Seitenkette von Chol für etwa 60 % der Kondensation verantwortlich ist. Darüber hinaus ist es bemerkenswert, dass natives Chol eine um 6 % geringere Lipidkondensation induziert als das *i*-C10-Sterol.

Für DPPC-Membranen wurden höchste Ordnungsparameter in Gegenwart von nativem Chol beobachtet. Im Unterschied zu den einfach ungesättigten Membranen ist die *i*-C8-Seitenkette von Chol für etwa 40 % Lipidkondensation in DPPC-Membranen verantwortlich.

Die Lipidkettenordnung der Membran ist hauptsächlich im oberen Kettenabschnitt beeinflusst. Hier kommt es in Gegenwart von Cholesterol zu einem Ordnungszuwachs von 40 % für POPC und 50 % für DPPC. Dies ist insbesondere in den Differenzordnungsparameterplots in Abbildungen S2 und S4 ersichtlich. Der Zuwachs an Ordnung im unteren Kettenabschnitt der Membran hängt stark von der Seitenkettenlänge der untersuchten Sterolanaloge ab und ist optimal für natives Chol. Die durch die Sterolanaloge induzierte Zunahme an molekularer Ordnung im Kettenbereich der Membran führt zur Vergrößerung der mittleren Kettenlänge der Phospholipide, wie in Tabelle S1 dargestellt.

Darauffolgend untersuchten wir den Einfluss der Sterolmoleküle auf grundlegende Membraneigenschaften. Zu Beginn wurde die Temperatur des Hauptphasenübergangs der Membran in Gegenwart der entsprechenden Sterolanaloge mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) bestimmt (Abbildungen S5 und S6). In Gegenwart von 20 Mol-% Chol erhöht sich die Phasenübergangstemperatur der Membran von 40.9 °C auf 41.5 °C. In Gegenwart der einzelnen Sterolanaloge reduziert sich die Phasenübergangstemperatur dagegen auf Werte deutlich unter 40 °C, der niedrigste Wert von 30.5 °C wird für Androstenol gemessen (Abbildung S6).

Als nächstes wurden die lateralen Diffusionskoeffizienten von DPPC und den entsprechenden Sterolen mit ^1H -MAS-PFG-NMR-Spektroskopie (MAS = „magic angle spinning“, Probenrotation im magischen Winkel, PFG = „pulsed field gradient“, gepulste Feldgradienten) untersucht (Abbildung S7).^[10] Während die Lipiddiffusion auch mit Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie^[11] gemessen werden kann, bietet die NMR-Technik den Vorteil, dass der Diffusionskoeffizient sowohl für das Phospholipid wie auch für das Sterolanalogon bestimmt werden kann, ohne dass Fluoreszenzsonden eingeführt werden müssen, die die Lipiddiffusionsgeschwindigkeiten beeinflussen könnten. Diffusionskoeffizienten für DPPC und die Sterolanaloge sind in Abbildung 2 dargestellt. Im Rahmen des experimentellen Fehlers zeigen die Phospholipide (gefüllte Balken) und die Sterolanaloge (leere Balken) etwa die gleichen Diffusionskoeffizienten. Die

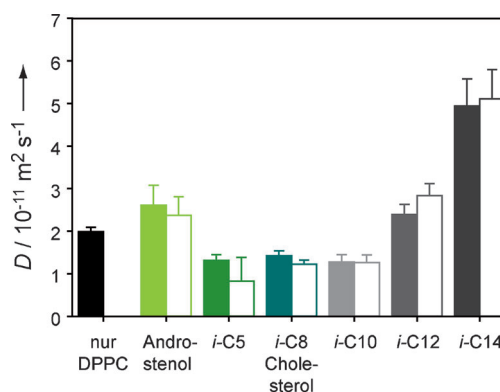


Abbildung 2. Laterale Diffusionskoeffizienten D von DPPC-Membranen in Mischung mit den untersuchten Sterolanaloge. Es sind die Diffusionskoeffizienten für DPPC (gefüllte Balken) und die entsprechenden Sterolanaloge (leere Balken) in äquimolarer Mischung bei einer Temperatur von 45 °C dargestellt.

Diffusionskoeffizienten der *i*-C5-, *i*-C8- und *i*-C10-Sterolanaloge sind recht ähnlich, wie auch die von DPPC in der entsprechenden Mischung. Allerdings zeigen Androstenol sowie die *i*-C12- und *i*-C14-Sterolanaloge deutlich höhere Diffusionskoeffizienten, die sogar größer sind als für DPPC in Abwesenheit von Chol.

Wir bestimmten auch die Diffusionskoeffizienten von POPC in Mischung mit den untersuchten Sterolanaloge. Da POPC nicht in vollständig kettendeutierter Form verfügbar ist, führt die Signalüberlappung im aliphatischen Bereich des ^1H -MAS-NMR-Spektrums dazu, dass keine Diffusionskoeffizienten für die Sterolanaloge in POPC-Membranen gemessen werden konnten, so dass nur die POPC-Diffusionskoeffizienten in Abbildung S8 dargestellt sind. Pures POPC zeigt die höchsten Diffusionskoeffizienten. In Gegenwart von Androstenol sowie den *i*-C5- und *i*-C8-Sterolanaloge ist die POPC-Diffusion deutlich langsamer und für *i*-C10-, *i*-C12- und *i*-C14-Sterolanaloge verringert sich die Diffusionsgeschwindigkeit weiter.

Weiterhin untersuchten wir die Membranpermeabilität von POPC- und DPPC-Membranen in Gegenwart der jeweiligen Sterolanaloge. Ein einfacher Fluoreszenzassay wurde verwendet, bei dem die Permeation von Dithionit durch die Membran anhand der Reduktion der NBD-PE-Lipide analysiert wird.^[12] Die beobachteten Reduktionskinetik zeigte zwei Komponenten, eine sehr schnelle, die die Reduktion von NBD-PE in der äußeren Membranschicht widerspiegelt, und ein langsamer Fluoreszenzabfall, der die Reduktion der NBD-PE-Moleküle in der inneren Membranschicht nach Dithionit-Permeation beschreibt (Abbildung S9). Abbildung S10 zeigt die Permeationsraten für POPC- und DPPC-Membranen, die durch biexponentielle Anpassung an die experimentellen Fluoreszenzintensitäten bestimmt wurden. DPPC zeigt die höchste Permeabilität für Dithionit aufgrund der generell höheren Permeabilität der Membran in der Nähe des Phasenüberganges.^[13] In Gegenwart aller untersuchter Sterolanaloge ist die Permeabilität der Membran geringer, in Gegenwart von Chol werden die niedrigsten Permeationsraten gemessen, was darauf hinweist, dass diese Struktur optimal für die Erhöhung der Barriere-

funktion der Membran ist. In Gegenwart von Sterolanaloga mit längerer oder kürzerer Seitenkette oder von Androstenol ist die Permeabilität der Membran deutlich höher.

Schließlich untersuchten wir das Potenzial der Sterolanaloga, in Mischungen aus DOPC, N-Stearoylsphingomyelin (SSM) und dem entsprechenden Sterolanalogen eine Phasentrennung in flüssig-ungeordnete (l_o) und flüssig-geordnete (l_d) Domänen zu induzieren. In Abbildung S11 sind konfokale Fluoreszenzmikroskopiebilder^[14] von einschichtigen Riesenvesikeln (GUV) aus DOPC, SSM und dem Sterolanalogen in einem molaren Verhältnis von 1:1:1 dargestellt. Alle Lipidmischungen bilden große Lipiddomänen aus, unabhängig von der Länge der Seitenkette der Sterolanaloga. Als Marker für die l_d -Phase diente N-Rh-DOPE, das sich bevorzugt in die l_o -Phase einlagert, sodass sie in Rot erscheint, während die l_o -Phase, in der der Farbstoff nur zu einem geringen Anteil vorliegt, dunkel bleibt.^[15]

Ungeachtet der Tatsache, dass alle untersuchten Sterolanaloga eine Phasentrennung induzieren, variiert der Anteil des Fluorophors in die l_d -Phase in Abhängigkeit von der Seitenkettenlänge des Sterolanalogs. Um dieses Verteilungsgleichgewicht zu quantifizieren, berechneten wir das Intensitätsverhältnis von N-Rh-DOPE in den l_o - und l_d -Phasen^[16] (Abbildung 3, gefüllte Balken). Nahezu vollständige

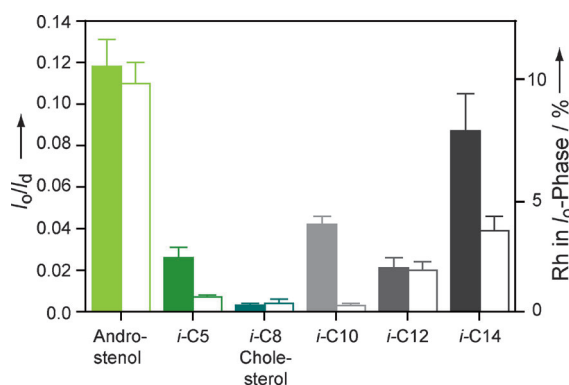


Abbildung 3. Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität von N-Rh-DOPE (gefüllte Balken) und des Rh-markierten Transmembranpeptids (leere Balken) in der l_o -Domäne und der l_d -Domäne in kanonischen Raft-Mischungen aus DOPC/SSM/Chol oder den entsprechenden Sterolvarianten bei einem Molverhältnis von 1:1:1.

dige Einlagerung von N-Rh-DOPE in die l_d -Phase wurde für Raft-Mischungen in Gegenwart von nativem Chol gemessen (0.2% des Farbstoffes in l_o -Phase), während für *i*-C5- und *i*-C12-Sterolanaloga etwas größere Anteile der Sonde in der l_o -Phase gefunden wurden (2.5% bzw. 2.1%). Für das *i*-C10-Sterolanalogen wurden 4% und für das *i*-C14-Sterolanalogen 8% der Sonde in der l_o -Phase gefunden. Für Androstenol stieg dieser Wert sogar auf 10.6% an. Während bei allen Sterolanaloga eine etwa gleiche Verteilung von l_o - und l_d -Phase vorlag, zeigten GUVs, die mit Androstenol präpariert wurden, lediglich 20% l_o -Domänen. In der Literatur wurden bisher nur *i*-C4- und *i*-C10-Sterolanaloga beschrieben, wobei für ersteres keine Domänenbildung beobachtet werden konnte.^[17]

Abschließend wurde das Verteilungsverhalten eines Rhodamin-markierten Peptids (Rh-TMD), welches die Transmembrandomäne des Hämagglutinins des Influenza-A-Virus darstellt und mit einer Konzentration von 1 Mol-% in GUV der gleichen Lipidmischung rekonstituiert wurde.^[18] Die l_o/l_d -Verteilung des Peptids ist ebenfalls in Abbildung 3 wiedergegeben (leere Balken). In der ternären Mischung mit nativem Chol, *i*-C5- oder *i*-C10-Sterolanaloga liegt Rh-TMD nahezu ausschließlich in den l_d -Domänen vor. Es werden hier jeweils nur 0.4%, 0.7% bzw. 0.3% des Peptids in der l_o -Phase gefunden. Dagegen liegt ein größerer Anteil von 2.6% bzw. 3.7% des Peptids in der l_d -Phase vor, wenn die Raft-Mischung das *i*-C12- oder *i*-C14-Sterolanalogen enthält. Das Verteilungsgleichgewicht des Peptids wird deutlich gestört, wenn Androstenol die gesamte Sterolkomponente der Raft-Mischung darstellt, hier werden 10% des Peptids in der l_o -Domäne lokalisiert, was einer relativen Erhöhung um einen Faktor von 25 im Vergleich zu Chol entspricht.

Sterole sind typische Lipide eukaryotischer Zellen. Während Chol in der Plasmamembran aller tierischen Zellen vorkommt, existieren im Pflanzenreich eine Reihe von Phytosterolen. Ergosterol ist das Sterol in Pilzen und Hefen. All diese Moleküle tragen eine Seitenkette an Kohlenstoffposition 17, die aus den Kohlenstoffatomen 20 bis 27 besteht (Abbildung 1 A). Phytosterole weisen oft eine weitere Verzweigung an Kohlenstoffposition 24 sowie eine variierende Zahl an Doppelbindungen auf. Nichtsdestotrotz ist die Länge der verzweigten Seitenkette in allen Sterolen identisch. Dagegen ist die Fettsäurezusammensetzung der Membranlipide in Pflanzen, Pilzen, Hefen und Tieren recht ähnlich. Die Lipide dieser Zellen (hauptsächlich Phospho- und Sphingolipide, aber auch Glycolipide) bestehen zu 80–90% aus Fettsäureresten mit 16 oder 18 Kohlenstoffatomen, die entweder gesättigt sind oder bis zu drei *cis*-Doppelbindungen enthalten.^[19] Daher hat der größte Teil aller Zellmembranen eine Dicke, die ideal mit der Dimension eines Sterols mit einer verzweigten Seitenkette aus 8 Kohlenstoffatomen übereinstimmt.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass bereits kleinste Veränderungen im tetracyclischen Ringsystem von Chol zu einer signifikanten Verschlechterung der Lipidkondensation^[6b,20] und veränderter Domänenstruktur führen.^[17,21] Jedoch relativieren unsere Ergebnisse die ursprüngliche Annahme, dass die Wechselwirkung von Chol mit den Membranlipiden auf der Wechselwirkung von Lipidketten mit der Ringstruktur von Chol beruhen. Ein großer Teil der Lipidkondensation und der lateralen Organisation der Lipide in Raft-Mischungen muss der aliphatischen Seitenkette von Chol zugeschrieben werden. Diese Seitenkette trägt ca. 60% zur Lipidkondensation in einfach ungesättigten POPC- und ca. 40% in gesättigten DPPC-Membranen bei. Dies legt nahe, dass die Seitenkette von Chol essenziell für die Wechselwirkung mit ungesättigten Phospholipiden ist, die die Mehrheit der Lipide in biologischen Membranen bilden. Auch die laterale Diffusion und Membranpermeabilität sind für die *i*-C8-Seitenkette von Chol optimiert. Unsere biophysikalischen Daten stützen die Vermutung, dass die Länge der Seitenkette von Chol evolutionär für die Wechselwirkung mit den Phospholipiden der Membran optimiert wurde.

Während der Evolution wurden Sterole relativ spät entwickelt, da der molekulare Sauerstoff für die Biosynthese fehlte.^[8a] Der evolutionäre Vorteil der Gegenwart von Chol in eukaryotischen Membranen liegt in den optimierten Membraneigenschaften. Insbesondere die Barrierefunktion der Membran konnte so deutlich verbessert werden.^[22] In dieser Hinsicht war es nicht ausreichend, ein Sterol ohne Seitenkette wie Androstenol zu entwickeln. Wie unsere Studie zeigt, wird nur ein Teil der Erhöhung der Kettenordnung und damit der Vergrößerung der Packungsdichte der Moleküle durch das starke tetracyclische Ringsystem des Chol-Gerüsts verursacht, der bedeutendere Beitrag kommt von der verzweigten Seitenkette. Die zusätzliche Van-der-Waals-Anziehung zwischen der Seitenkette von Chol und den unteren Kettensegmenten der Phospholipidketten sorgt für einen optimalen Anstieg der Packungsdichte der Lipide, wodurch die verbesserte Barrierefunktion der Membran erreicht wird. Die Membranpermeabilität ist für natives Chol am geringsten und bereits kleine Modifikationen in der Seitenkettenlänge führen zu einer verschlechterten Barrierefunktion. Obwohl das *i*-C12-Sterolanalogon eine höhere Lipidkondensation in POPC-Membranen induziert, ist die Permeabilität für Dithionit bereits größer als für Chol.

Die Länge der Seitenkette von Chol ergibt sich aus der Biosynthese des Moleküls.^[23] Squalen ist die Vorstufe für Chol und alle Phytosterole, wodurch die generelle Ähnlichkeit dieser Moleküle und insbesondere ihrer Seitenketten verständlich wird. Aus Squalen wird Lanosterol abgeleitet, welches durch die Gegenwart von drei zusätzlichen Methylgruppen (4- α -CH₃, 4- β -CH₃ und 14-CH₃) am tetracyclischen Ringsystem, die nicht im Chol vorliegen, eine rauere Oberfläche aufweist. Dies legt nahe, dass in der Evolution die glatte α -Oberfläche von Chol optimiert wurde, um die Lipidkondensation durch Chol zu verbessern. In Gegenwart von 20 Mol-% Lanosterol liegt der mittlere Ordnungsparameter von POPC-Membranen bei 0.202, während er sich in Gegenwart von Chol auf 0.206 erhöht.^[24] Der finale evolutionäre Schritt bedeutete also eine Vergrößerung der Lipidkondensation um ca. 2%. Jedoch besteht der wichtigere Evolutionsschritt in der Entwicklung der generellen Architektur des Sterols mit der verzweigten Seitenkette des Moleküls.

Zusammengefasst unterstreicht unsere Arbeit die Bedeutung der Seitenkette von Chol für eine Reihe essenzieller Membraneigenschaften sowie die laterale Organisation von Membranlipiden und Proteinen. Durch eine systematische Untersuchung der Länge der verzweigten Seitenketten von Sterolanaloga wurde gezeigt, dass die Seitenkette von Chol einen bedeutenden Anteil an dem Zustandekommen dieser Eigenschaften hat. Die charakteristischen Eigenschaften von Chol können nicht durch Moleküle reproduziert werden, die über längere oder kürzere Seitenketten verfügen. Dies unterstreicht die Bedeutung der Chol-Seitenkette für die intermolekularen Wechselwirkungen der Moleküle in der Doppelschicht und die Membraneigenschaften im Allgemeinen.

Eingegangen am 1. August 2013

Stichwörter: Diffusion · Domänenbildung · Lipide · Membran · Permeabilität

- [1] a) K. Simons, D. Toomre, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2000**, *1*, 31–39; b) D. A. Brown, E. London, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1998**, *14*, 111–136; c) S. Munro, *Cell* **2003**, *115*, 377–388.
- [2] K. Jacobson, O. G. Mouritsen, R. G. W. Anderson, *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 7–14.
- [3] a) M. L. Frazier, J. R. Wright, A. Pokorny, P. F. Almeida, *Biophys. J.* **2007**, *92*, 2422–2433; b) A. Tsamaloukas, H. Szadkowska, H. Heerklotz, *J. Phys. Condens. Matter* **2006**, *18*, S1125–S1138.
- [4] a) D. Huster, K. Arnold, K. Gawrisch, *Biochemistry* **1998**, *37*, 17299–17308; b) P. F. Almeida, A. Pokorny, A. Hinderliter, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2005**, *1720*, 1–13.
- [5] a) S. L. Veatch, O. Soubias, S. L. Keller, K. Gawrisch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17650–17655; b) A. Bunge, P. Müller, M. Stöckl, A. Herrmann, D. Huster, *Biophys. J.* **2008**, *94*, 2680–2690; c) T. Bartels, R. S. Lankalapalli, R. Bittman, K. Beyer, M. F. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14521–14532; d) R. Ziblat, L. Leiserowitz, L. Addadi, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 3700–3710; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3620–3629.
- [6] a) M. A. Davies, H. F. Schuster, J. W. Brauner, R. Mendelsohn, *Biochemistry* **1990**, *29*, 4368–4373; b) G. Orädd, V. Shahedi, G. Lindblom, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2009**, *1788*, 1762–1771; c) C. H. Huang, *Lipids* **1977**, *12*, 348–356.
- [7] E. Oldfield, M. Meadows, D. Rice, R. Jacobs, *Biochemistry* **1978**, *17*, 2727–2740.
- [8] a) O. G. Mouritsen, M. J. Zuckermann, *Lipids* **2004**, *39*, 1101–1113; b) D. Huster, A. J. Jin, K. Arnold, K. Gawrisch, *Biophys. J.* **1997**, *73*, 855–864.
- [9] D. J. Baek, R. Bittman, *Chem. Phys. Lipids* **2013**, *175*–176, 99–104.
- [10] a) H. A. Scheidt, D. Huster, K. Gawrisch, *Biophys. J.* **2005**, *89*, 2504–2512; b) H. C. Gaede, K. Gawrisch, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 1734–1740.
- [11] a) N. P. Damayanti, L. L. Parker, J. M. K. Irudayaraj, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 4023–4026; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3931–3934; b) J. Ries, P. Schwille, *Bioessays* **2012**, *34*, 361–368.
- [12] J. C. McIntyre, R. G. Sleight, *Biochemistry* **1991**, *30*, 11819–11827.
- [13] E. Corvera, O. G. Mouritsen, M. A. Singer, M. J. Zuckermann, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1992**, *1107*, 261–270.
- [14] a) S. Arumugam, G. Chwastek, E. Fischer-Friedrich, C. Ehrig, I. Mönch, P. Schwille, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 12028–12032; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11858–11862; b) E. Sezgin, H. J. Kaiser, T. Baumgart, P. Schwille, K. Simons, I. Levental, *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 1042–1051.
- [15] T. Baumgart, G. Hunt, E. R. Farkas, W. W. Webb, G. W. Feigenelson, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2007**, *1768*, 2182–2194.
- [16] S. A. Johnson, B. M. Stinson, M. S. Go, L. M. Carmona, J. I. Reminick, X. Fang, T. Baumgart, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2010**, *1798*, 1427–1435.
- [17] X. Xu, R. Bittman, G. Duportail, D. Heissler, C. Vilcheze, E. London, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 33540–33546.
- [18] J. Nikolaus, S. Scolari, E. Bayraktarov, N. Jungnick, S. Engel, P. A. Pia, M. Stöckl, R. Volkmer, M. Veit, A. Herrmann, *Biophys. J.* **2010**, *99*, 489–498.
- [19] F. D. Gunstone, J. L. Harwood, A. J. Dijkstra, *The Lipid Handbook*, 3. Aufl., CRC, Boca Raton, **2007**.
- [20] a) H. A. Scheidt, P. Müller, A. Herrmann, D. Huster, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 45563–45569; b) E. Endress, S. Bayerl, K. Prechtel, C. Maier, R. Merkel, T. M. Bayerl, *Langmuir* **2002**, *18*, 3293–3299; c) E. J. Dufourc, *J. Chem. Biol.* **2008**, *1*, 63–77; d) S. Milles, T. Meyer, H. A. Scheidt, R. Schwarzer, L. Thomas, M.

- Marek, L. Szente, R. Bittman, A. Herrmann, T. G. Pomorski, D. Huster, P. Müller, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2013**, 1828, 1822–1828.
- [21] a) J. Wang, Megha, E. London, *Biochemistry* **2004**, 43, 1010–1018; b) J. J. Wenz, F. J. Barrantes, *Biochemistry* **2003**, 42, 14267–14276.
- [22] T. H. Haines, *Prog. Lipid Res.* **2001**, 40, 299–324.
- [23] a) K. Bloch, *CRC Crit. Rev.* **1983**, 14, 47–92; b) K. Bloch, *Science* **1965**, 150, 19–28.
- [24] D. Huster, H. A. Scheidt, K. Arnold, A. Herrmann, P. Müller, *Biophys. J.* **2005**, 88, 1838–1844.
-