

**Selbstreinigungseigenschaften der Haut
des Pilotwales, *Globicephala melas***

Von der Fakultät III –Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Christof Baum
aus Dorum

Berlin 2002

D 83

**Selbstreinigungseigenschaften der Haut
des Pilotwales, *Globicephala melas***

von

Dipl.-Biol. Christof Baum

aus Dorum

Von der Fakultät III –Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. U. Szewzyk, TU Berlin

1. Bericht: Prof. Dr.-Ing. L.-G. Fleischer, TU Berlin

2. Bericht: Prof. Dr. W. Meyer, Tierärztliche Hochschule Hannover

3. Bericht: Prof. Dr. D. Siebers, Stiftung Alfred-Wegener-Institut

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 08.07.2002

Berlin 2002

D 83

Meiner Familie
und meinen Lehrern

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. L.-G. Fleischer im Fachgebiet Prozesstechnische Grundlagen der Lebensmitteltechnologie, Biotechnologie-Zentrum der Technischen Universität Berlin.

Herrn Prof. Dr. Lutz-Günther Fleischer danke ich sehr herzlich für die Zuweisung des Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während der Bearbeitung sowie für seine Betreuung.

Ebenso herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wilfried Meyer und seinen Mitarbeiterinnen, Frau Ines Blume, Frau Marion Gähle und Frau Gudrun Wirth vom Anatomischen Institut, Bereich Histologie und Embryologie, der Tierärztlichen Hochschule Hannover und Herrn Prof. Dr. Dietrich Siebers von der Stiftung Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung Bremerhaven, für deren tatkräftige Unterstützung, Diskussionen und Anregungen, sowie für die Arbeits- und Messmöglichkeiten, die mir zur Verfügung gestellt wurden.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD. Dr. Dorete Bloch vom Naturhistorischen Museum der Farör-Inseln und dem Direktor der Universität der Farör-Inseln, Herrn Dr. Hans-Pauli Joensen, sowie seinen Mitarbeiterinnen Frau Johanna Zachriassen und Frau Marjun Mortensen für die Möglichkeit, Probenmaterial sammeln zu dürfen, und für die Überlassung eines Laborplatzes sowie aller universitären Einrichtungen. Herrn Haugrimur Gasadal und Herrn Edfinnur Stefansson danke ich für die technische Unterstützung bei der Probenentnahme vor Ort.

Mein großer Dank gilt Herrn Dr. Ralf Stelzer vom Institut für Tierökologie und Zellbiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover für die Durchführung der kryorasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen an der Blattoberfläche der kanadischen Wasserpest und den Hautoberflächen des Pilotwales. Bedanken möchte ich bei Herrn Prof. Dr. Johannes Seeger und Herrn Dr. Johannes Kacza vom Institut für Veterinär Anatomie der Universität Leipzig für die Durchführung gleicher Untersuchungen an Hautschnitten.

Ein Teil dieser Arbeit entstand in gedanklicher und technischer Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Frank Simon vom Institut für Polymerforschung Dresden e.V.. Herrn Dr. Frank Simon möchte ich für die Durchführung und Auswertung der photoelektronenspektroskopischen Daten danken.

Ich danke ebenso Herrn Dr. Dierk Roessner und Herrn Jost Wellensiek von Wyatt Technology Deutschland für Ihre Zusammenarbeit bei der Vielwinkel- Streulicht-photometrie.

Bedanken möchte ich mich bei den Herren Dr. Hein von Westerhagen, Dr. Joachim Plötz und Dr. Horst Bornemann von der Stiftung Alfred-Wegener-Institut Bremerhaven für ihre Obhut in der Vorprojektphase und Herrn Dr. Gerhard Kuhn und Frau Ute Bock für die Unterstützung bei den rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung der chemisch getrockneten Hautproben.

Diese Untersuchung wurde gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unter dem Titel „Selbstreinigungsmechanismen der Delfinhaut“ (W. Meyer, L-G. Fleischer, D. Siebers: ME 1755 1-1/1-2).

Inhalt

	Seite
Symbolverzeichnis	I
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	8
2.1 Material für morphologische und histochemische Untersuchungen	9
2.2 Material für biochemische und rheologische Untersuchungen	9
2.3 Kryo-rasterelektronenmikroskopische Untersuchung des Stratum corneums und des Gels	10
2.4 Rasterelektronmikroskopische Untersuchung des Stratum corneums	11
2.5 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung des Stratum corneums und des Gels	12
2.6 Histochemische Untersuchung des Stratum corneums	13
2.6.1 Darstellung von sauren Glykokonjugaten	13
2.6.2 Verteilung von Thiol-Gruppen	13
2.7 Photometrische Untersuchung des Gels mittels Vielwinkel-Laserstreulicht-Photometrie	14
2.7.1 Theoretischer Hintergrund der photometrischen Untersuchung	14
2.7.2 Untersuchung der Dispersität des Gels	16
2.7.3 Untersuchung der Aggregationskinetik des Gels	17
2.8 Rheologische Untersuchung des Gels	17
2.8.1 Theoretischer Hintergrund der rheologischen Untersuchung	17
2.8.2 Rheologische Untersuchung des Gels	20
2.9 Photoelektronenspektroskopische Untersuchung der Hautoberfläche und des Gels	21
2.9.1 Theoretischer Hintergrund der photoelektronenspektroskopischen Untersuchung	21
2.9.2 Probenvorbereitung und Meßbedingungen	23

3	Ergebnisse	24
3.1	Elektronenoptische und histochemische Ergebnisse zum Stratum corneum	24
3.1.1	Kyro-rasterelektronenmikroskopische Ergebnisse zum Stratum corneum	24
3.1.2	Rasterelektronenmikroskopische Ergebnisse zum Stratum corneum	34
3.1.3	Transmissionselektronenmikroskopische Ergebnisse zum Stratum corneum	38
3.1.4	Histochemische Ergebnisse zum Stratum corneum	43
3.2	Elektronenoptische Ergebnisse zum Gel	45
3.2.1	Transmissionselektronenmikroskopische Ergebnisse zum Gel	45
3.2.2	Kyro-rasterelektronenmikroskopische Ergebnisse zum Gel	45
3.3	Vielwinkel-Laserstreulicht-photometrische Ergebnisse zum Gel	49
3.3.1	Untersuchung zur Dispersität des Gels	49
3.3.2	Untersuchungen zur Aggregationskinetik des Gels	52
3.4	Rheologische Ergebnisse zum Gel	55
3.5	Photoelektronenspektroskopische Ergebnisse zum Stratum corneum und zum Gel	65
4	Diskussion	73
4.1	Elektronenoptische und histochemische Eigenschaften des Stratum corneums und des Gels	73
4.1.1	Bewuchskontrolle	73
4.1.2	Enzymatische Kontrolle der Desquamation	74
4.1.3	Enzymatische Bewuchskontrolle	79
4.1.4	Gelbildung im Stratum corneum	80
4.1.5	Topologische Bewuchskontrolle	83
4.1.6	Axiom der Kontaktflächenverringering	88
4.1.7	Glykokonjugate im Stratum corneum	89
4.1.8	Thiol-Gruppen im Stratum corneum	90
4.2	Vielwinkel-Laserstreulicht-photometrische Untersuchung des Gels	91
4.2.1	Dispersität des Gels	91
4.2.2	Aggregationskinetik des Gels	92

4.3	Rheologische Eigenschaften des Gels	94
4.3.1	Reproduzierbarkeit rheologischer Messungen	95
4.3.2	Gelbildung und Strukturaufbau des Gels	97
4.3.3	Rheologisch-biochemische Eigenschaften des Gels	99
4.3.4	Mechanische Belastbarkeit des Gels	101
4.3.5	Biologische Bedeutung des Gels	102
4.4	Oberflächenchemische Eigenschaften der Hautoberfläche und des Gels	104
4.5	Resumée	110
4.6	Ableitung bioanaloger Kennzeichen der Delfinhaut	113
5	Literaturverzeichnis	116
6	Anhang	127
	Zusammenfassung	130
	Abstract	131

Symbolverzeichnis

Formelzeichen	Einheit	Größe
A_2		Zweiter Virialkoeffizient
a, b, ..	-	Konstanten und Variablen
c	$\text{m}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$	Massenkonzentration
f	-	Strukturfaktor
1-f	-	Dissipationsfaktor
G'	Pa	Speichermodul
G''	Pa	Verlustmodul
G^*	Pa	komplexer Modul
G_r	nm	Gyrationsradius
-	ml	Volumen
I_θ		Intensität
K		Optische Konstante
M	$\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$	Molmasse
M_n	$\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$	numerische gemittelte Molmasse
M_w	$\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$	gewichtsgemittelte Molmasse
M_z	$\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$	z-Mittel der Molmasse
mol	$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	molare Konzentration
n		Refraktionsindex des Lösungsmittels
N_A		Avogadro-Zahl
Pa	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$	Druck
R_θ		Exzess-Rayleigh-Verhältnis
T	K, °C	Temperatur
T	sec, h	Zeit
-	$\text{U} \cdot \text{min}^{-1}$	Umdrehung pro Minute
γ	%	Deformation
η'	Pa·s	dynamische Viskosität
λ	nm	Wellenlänge
τ	Pa	Schubspannung

II

ω	rad·s ⁻¹	Frequenz
rad	°	Winkel in Grad

Abkürzungen

Abb.	Abbildungen
C-SEM	Cryo-scanning electron microscopy
dpi	data per inch, elektronische Auflösung
engl.	englisch
ESCA	Elektronenspektroskopie für die chemische Analyse
eV	Elektronenvolt
Gl.	Gleichung
kD	Kilodalton
Kryo-REM	Kryo-Rasterelektronenmikroskopie
kV	Spannung in Kilovolt
LM	Lichtmikroskopie/ light microscopy
mA	Milliampere
MALLS	Multi-angle laser-light scattering
pH	pH-Wert
r	Korrelationskoeffizient
r ²	Bestimmtheitsmaß
REM	Rasterelektronenmikroskopie
SEC	Größenausschlußchromatographie
SEM	scanning electron microscopy
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie/ transmission electron microscopy
(v/v)	Volumenprozent
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy

1 Einleitung

Wasserbenetzte biologische Oberflächen unterliegen als Trenn- und Austauschflächen zwischen Organismen und ihrer aquatischen Umwelt einem permanenten Besiedlungsdruck durch Biofouling-Organismen, die Körperoberflächen als Besiedlungssubstrat nutzen. Dabei wirkt sich die Anreicherung von adhäsiven, im Wasser vorhandenen Schleimstoffen sowie Bewuchs als Besiedlung mit beispielsweise Bakterien, Algen, Muscheln oder Krebsen, in den meisten Fällen nachteilig für den betroffenen Wirt aus.

Reinigungsmechanismen schützen Oberflächen vor Funktionsminderung. Im Laufe der Evolution haben sich daher bei marinen Lebewesen eine Reihe solcher kontinuierlich und diskontinuierlich wirksamer Reinigungs- und Verteidigungsmechanismen entwickelt (WAHL 1989, ABARZUA und JAKUBOWSKI 1995). Die Vielfältigkeit dieser physikalischen und chemischen Prozesse verdeutlicht, dass komplexe biochemische und morphologische Anpassungen entsprechend den biologischen Möglichkeiten ausgeschöpft werden mußten, um Biofouling zu unterdrücken. Die physikalischen Mechanismen beruhen beispielsweise auf der Verminderung von Anheftungs- oder Kontaktflächen, Hautabschuppung und mechanischer Körperpflege, wie regelmäßigem Putzen, Kratzen oder Beweiden. Eine stoffliche Barriere für Biofouler wird durch die Abgabe von Schleimen erzielt, wobei Substanzen mit niedriger Oberflächenspannung die Adhäsion von Organismen erschweren. Zu den chemischen Verteidigungen zählen zudem Substanzen wie Toxine und Antibiotika, die Organismen töten, sowie Enzyme, die Adhäsionsmoleküle hydrolysieren können.

In der vorliegenden Untersuchung an Hautoberflächen von Pilotwalen werden mit morphologischen und histochemischen, biochemischen und rheologischen Methoden spezielle Struktur-Funktions-Beziehungen der Epidermis der Delfinhaut beschrieben. Ziel der Arbeit ist die Aufgliederung und Darstellung solcher Beziehungen unter Berücksichtigung der Funktionen der Haut haarloser mariner Säuger als Trenn- und Austauschfläche zwischen Organismus und Umwelt, und im besonderen ihre Funktion als Barriere gegenüber dem permanenten Besiedlungsdruck durch Biofouling-Organismen.

Die untersuchte Spezies, *Globicephala melas* (TRAILL 1809), ist wie folgt zoosystematisch zuzuordnen:

Klasse:	Mammalia (Säugetiere)
Ordnung:	Cetacea (Wale)
Unterordnung:	Odontoceti (Zahnwale)
Familie:	Delphinidae (Delfine)
Gattung:	<i>Globicephala</i> (Pilotwale, Grindwale)
Art:	<i>Globicephala melas</i> (Pilotwal, Gewöhnlicher Grindwal)

Pilotwale sind in den gemäßigten und subpolaren Breiten aller Ozeane (mit Wassertemperaturen zwischen 0 - 25 °C) mit Ausnahme des Nordpazifiks anzutreffen. Die hier untersuchten Tiere sind Mitglieder der nord-östlichen atlantischen Population, deren Häufigkeit 1999 auf etwa 750 000 Individuen geschätzt wurde (ABEND und SMITH 1999, vgl. <http://www.gn.apc.org/whales/dolphin8.shtml>).

Männliche Tiere dieser schwarz pigmentierten Delfinart erreichen eine Körperlänge von 6,3 bis 8 m und weibliche Tiere eine solche von 5,5 bis 6 m (BLOCH et al. 1993). Das durchschnittliche Körpergewicht liegt bei 1000 bis 1750 kg. Pilotwale jagen in 100 bis 500 m Wassertiefe nach Tintenfischen, selten Fischen, deren Aufenthalt sie mit Echolokation ausfindig machen. Häufig schliessen sich 50 bis 100 Individuen in matrilinearen Gruppen zusammen. Zeitweise sind Großgruppen bis zu 1000 Individuen zu beobachten. Pilotwale erreichen ein Alter von 35 bis 60 Jahren. Die durchschnittliche Schwimgeschwindigkeit liegt bei 3,3 km/h, mit Beschleunigungen bis auf 16 km/h. Die durchschnittliche Reisedstrecke beträgt ca. 200 km pro Tag. Die Aktivitätsmuster der Pilotwale sind bestimmt durch nächtliche Jagdphasen, morgendliche Ruhepausen, und Tageswanderungen. An der Wasseroberfläche verhalten sich Pilotwale ruhig bis inaktiv, unterbrochen von Orientierungsblicken (engl., „spy-hopping“), Sprüngen (engl., „breaching“) und „Bauchklatschern“ (engl., „splashing“).



Abb. 1-1: Eine Pilotwal-Gemeinschaft (Färör-Inseln). Man nimmt an, dass sich jeweils etwa ein Drittel aller Mitglieder einer Gruppe an der Wasseroberfläche aufhalten.

Die mit bloßem Auge makellos sauber erscheinende Haut der Delfine hat immer wieder Forscher dazu bewogen, sich mit den Ursachen der hydrodynamischen Effizienz und den Selbstreinigungseigenschaften des Integuments dieser Tiergruppe zu befassen. Hinsichtlich des Biofouling ist aus früheren elektronenoptischen Untersuchungen von HARRISON und THURLEY (1972 und 1974), LING (1974), HALDIMAN et al. (1985), LIU RENJUN et al. (1986), PFEIFFER (1992), PFEIFFER und JONES (1993), PFEIFFER und ROWNTREE (1996) bekannt, dass fixierte Hautproben verschiedener Delfinarten diese Spuren einer derartigen Oberflächenschädigung nur gelegentlich zeigen. Weil die Erhaltung von Anzahl und Lage dieser Spuren wegen des Einsatzes chemischer Fixierungs- und Dehydratisierungsmethoden während der Probenaufbereitung oft nicht gewährleistet ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit frische Hautproben von Pilotwalen verschiedener Sammel-Expeditionen und Delfin-

gruppen einer schonenden, strukturerhaltenden Kryo-Konservierung unterzogen und mit Hilfe kryo-rasterelektronenmikroskopischer Dokumentationstechniken untersucht (vgl. BAUM et al. 2000, BAUM et al. 2002A). Durch diese neuen Techniken und den außergewöhnlich guten Zustand der Gewebe konnten frühere Befunde von geringer epibiontischer Belastung der Epidermis bestätigt und erstmalig die Anwesenheit einer dünnen Gelschicht an der Hautoberfläche als typisches Merkmal dokumentiert werden. Diese Schicht ließ sich nach Gefriertrocknung in wasser- und fetthaltige Bereiche unterteilen. Wegen der geringen epibiontischen Belastung der Haut der Pilotwale wurde außerdem vermutet, dass Reinigungsmechanismen die Haut sauber halten und dem Beginn des Biofouling als Ansiedelung von teils pathogenen Bakterien und Mikroalgen (LING 1974, HOLMES 1985, DUNN 1990, USHAKOWA 1991, GOL'DIN 1994, DENYS 1997, BAUM et al. 2000), Kleinkrebsen und Nematoden (DIERAUF 1990, MARINIELLO et al. 1994) entgegen wirken. In Bezug auf die Reinigungsmechanismen berichteten St. AUBIN et al. (1990) und SMITH et al. (1992), dass eine Verminderung der Selbstreinigungsfähigkeit zugunsten des Biofouling bei solchen Delfinarten besteht, die eine saisonbedingte diskontinuierliche Hautabschuppung zeigen. Ebenso bekannt ist, dass Grauwale (*Escherichtius gibbosus*) unter Bewuchs leiden. Grauwale graben im Sediment nach Nahrung und hinterlassen dabei Kratzspuren auf ihrer Haut, die vermutlich Nischen für die Biofouler bilden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Algenblüten, Öle und Detergentien im Meerwasser zu einer Verminderung der Selbstreinigungsfähigkeit führen. Wie bei allen Delfinen weist die Haut der Pilotwale keine Hautdrüsen auf (SPEARMAN 1972, LING 1974, MEYER et al. 1995). Deshalb wurde vermutet, dass die Selbstreinigungseigenschaften auf den Besonderheiten jeder einzelnen Epidermiszelle und ihrer näheren Umgebung beruhen.

Neben den deskriptiven Arbeiten finden sich in der Literatur zwei Ansätze, die sich mit den Grundlagen der Selbstreinigungsmechanismen der Delfinhaut auseinandersetzen. BROWN et al. (1983) und HICKS et al. (1985) berichteten über eine sehr hohe Abschuppungsrate der Epidermis, wobei die Abschuppung Biofouler in der Größe der Schuppen entfernt. Alternativ basiert die Selbstreinigungsfähigkeit der Delfinhaut nach GUCINSKI et al. (1984) und GUCINSKI (1986) auf ihrer niedrigen Oberflächenspannung. Niedrige Oberflächenspannungen erschweren die Anheftung von Orga-

nismen (GUCINSKI 1986) und erleichtern zudem die Ablösung von Organismen von Oberflächen unter Scherstress (BOS et al. 2000). Eine kritische Analyse der oben genannten hohen Abschuppungsrate (siehe auch BAUM et al. 2001B) und die Ableitung von kritischen Oberflächenspannungen aus Benetzungsexperimenten an der Delfinhaut außerhalb des Wassers werden in der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen dieser Untersuchungen vergleichend behandelt.

Kontrovers diskutiert wurde bisher die stoffliche Basis für die niedrige Oberflächenspannung der Delfinhaut. GUCINSKI et al. (1984) und GUCINSKI (1986) befundeten aus den von ihnen durchgeführten Infrarot-spektroskopischen Untersuchungen an Abklatschpräparaten der Delfinhautoberfläche die Anwesenheit von Glykokonjugaten. Die Anwesenheit von mehr oder weniger hydrophilen Glykokonjugaten steht meiner Meinung nach im Kontrast zu den gemessenen niedrigen Oberflächenspannungen, die nur hydrophobe Moleküle erzeugen können (siehe Silikon-Antifouling, deren Entwicklung auf die Untersuchungen von GUCINSKI et al. (1984) zurückgeht). GERACI et al. (1986) beschrieben ein makromolekulares Coating im Bereich des Interzellularraumes der epidermalen Corneocyten, das in Form elektronendichter, osmiophiler Deposite sichtbar wurde. Diese Deposite wurden als hydrophile Glykokonjugate gedeutet. Demgegenüber befundeten MENON et al. (1986), ELIAS et al. (1987) und PFEIFFER und JONES (1993) mit biochemischen und histochemischen Methoden sowie elektronenoptischen Untersuchungen am Stratum corneum verschiedener Delfinarten die Anwesenheit von Lipoiden. Im besonderen auffällig war die Anwesenheit von unpolaren Acylglucosyl-Ceramiden, deren amphiphiler bis hydrophober Charakter mit der Ausprägung von niedrigen Oberflächenspannung an der Hautoberfläche im Einklang steht.

In Erwartung eines verbesserten Verständnisses über die Herkunft, Zusammensetzung und die physikalischen Eigenschaften des makromolekularen Coatings wurde zum einen der Beginn der stofflichen Deposition innerhalb der Interzellularräume des Stratum corneums der Epidermis kryo-rasterelektronenmikroskopisch und transmissionselektronenmikroskopisch bestimmt. Zum anderen wurden rheologische Methoden in Verbindung mit einem neuen mathematisch-physikalischen Modell eingesetzt, um erstens das Fließverhalten des makromolekularen Coatings zu charakterisieren und zweitens eine Kompartimentanalyse gelbildender Subsysteme durchzuführen

(FLEISCHER unveröffentlicht, BAUM et al., 2002B). Die Kompartimentanalyse diente der Beschreibung von Reaktionsmechanismen. Die gewonnenen rheologischen Ergebnisse wurden mit den aus der Literatur bekannten Fließeigenschaften von Biofilmen verglichen. Um weitere Informationen über die oberflächenchemischen Merkmale der Epidermis der Delfinhaut zu erhalten, bestand eine weitere Aufgabe darin, die Hautoberfläche und die Substanzen des Interzellularraumes mittels Photoelektronenspektroskopie chemisch zu analysieren. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden chemisch wirksame Verteidigungsmechanismen in Form von Gel-integrierten, hydrolytischen Enzymen beschrieben (BAUM et al. 2001B). Diese Enzyme sind zur Abschuppung von Hautzellen notwendig und können die langkettigen polymeren Adhäsionsmoleküle von Biofoulern zerstören, deren mukoide Schutzhülle in Folge dieser enzymatischen Hydrolyse fließfähiger wird (BAUM et al. 2001B).

Aus den bisher gewonnenen Ergebnissen wurde ein Modell abgeleitet, das die Selbstreinigung auf der Basis der morphologischen, chemischen und rheologischen Befunde beschreibt.

Von der derzeitigen Diskussion über den Einsatz giftiger Bewuchsschutzfarben an Schiffen, Küstenschutz- und Hafenanlagen motiviert, wurde in diesen Untersuchungen auch ein bionischer Ansatz verfolgt, der sich die Haut der Delfine zum Vorbild für die Entwicklung umweltneutraler Bewuchsschutzfarben nimmt. Dieser Ansatz basiert auf der Annahme, dass Schiffe und Delfine umweltähnlichen Bedingungen ausgesetzt sind. Zudem besteht die attraktive Aussicht auf eine zukünftige Produktoptimierung aktueller Bewuchsschutzfarben in Form eines bionischen Re-Designs, dessen Grundlagen die durch Selektion geprüfte, evolutiv erfolgreiche Delfinhaut als alternativen Lösungsansatz zum Schutz vor Bewuchs in sich birgt. Vergleichbare Konditionen mit hoher Fouling-Gefahr ergeben sich beispielsweise für Schiffe wie auch für Delfine während ihrer „Wanderungen“ durch den Kontakt mit diversen Biofouling-Organismen, die in unterschiedlichen Dichten und verschiedenen Lebensstadien auftreten. Zum anderen bewegen sich Delfine mit einer Geschwindigkeit fort, die kleineren Schiffen ähnlich ist. Desweiteren bestehen bei der Untersuchung von Delfinen Vergleichsmöglichkeiten mit größeren Walen. Dieser Vergleich von Delfinen, die meist frei von Bewuchs sind, mit den größeren Bartenwalen, die oft unter Bewuchs leiden, offenbart Unterschiede in den Reinigungssystemen, so dass hierdurch physi-

kalische und biochemische Merkmale in ihrer Bedeutung als Reinigungskomponente bewertet werden können. Schließlich scheint die Abgabe von Antibiotika oder Toxinen, wie von Fischen bekannt (ABDULL-HAQQ und SHIER 1991, MOORE et al. 1993, SOLTANI 1998), über die drüsenlose Haut der haarlosen marinen Säuger nicht gegeben. Im Sinne analogisierbarer Merkmale der Delfinhaut wurden aus den Befunden, die eine wesentliche Bedeutung des enzymhaltigen makromolekularen Coatings der Corneocyten für die Selbstreinigung in Verbindung mit nanotopologischen Kennzeichen hervorheben, bionische Kennzeichen extrahiert, die für technische Entwicklungen von Bedeutung sein können.

2 Material und Methoden

2.1 Material für morphologische und histochemische Untersuchungen

Das für diese Untersuchung verwendete frische Hautmaterial wurde 1997 und 1999 von den Behörden der Färör-Inseln (Dänemark) aus staatlich kontrollierten Fängen von Pilotwalen, *Globicephala melas*, zur Verfügung gestellt.

Unabhängig vom Alter und Geschlecht der Tiere wurden von neun Individuen aus jeweils acht Fängen 10x10x1 cm große Hautpartien vom Kopf- und Rückenbereich entnommen. Von diesen Partien wurden vorsichtig unter steriltfiltriertem Seewasser mit Rasierklingen 5x5x5 mm große Blöckchen abgetragen, ohne dabei die Hautoberfläche zu beschädigen.

Diese Blöckchen wurden entweder mit Tissue TEC O.C.T. Compound (Miles Inc., USA) auf Kupfer-Trägern oder Kork-Plättchen befestigt oder direkt in Flüssigstickstoff bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Alternativ erfolgte eine chemische Fixierung der Proben in 4 % igem Formol in Phosphat-Puffer (pH 7,4) nach Sörensen oder Fixierlösung nach Bouin oder in Phosphat-gepufferter Fixierlösung (pH 7,4) nach Karnowsky. Von den chemisch fixierten Proben wurden wiederum einige nach mehreren Spülschritten in Phosphat-Puffer vor dem Einfrieren in Flüssigstickstoff mit Tissue TEC auf Kupfer-Träger oder Kork-Plättchen befestigt oder vor dem Einfrieren für 2, 6 und 12 Stunden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 0,25 % iger Trypsin-Lösung (10 000 units, Sigma) in Phosphat-gepufferter Salzlösung (pH 7,4) hydrolytisch aufgeschlossen. Alternativ wurden enzymatisch behandelte und chemisch fixierte Proben über eine alkoholische Reihe (30 – 100 %) entwässert und mit Tetramethylsilan nach der Methode von DEY et al. (1989) chemisch getrocknet.

Von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen blieben solche Präparate, die auf mehr als 10 % ihrer Ausgangsgröße geschrumpft waren. Alle tiefgefrorenen Präparate wurden nach den unten beschriebenen Methoden für kryo-rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen weiterverarbeitet. Chemisch getrocknete Präparate kamen für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Anwendung.

2.2 Probenmaterial für biochemische und rheologische Untersuchungen

Für die Untersuchung von Gelbildungsvorgängen im Stratum corneum des Pilotwales *Globicephala melas* wurde weiteres Hautmaterial zwischen einer und fünf Stunden nach Eintritt des Todes entnommen. Die zeitliche Verzögerung kam dadurch zustande, dass die Tiere nach dem Fang von den Fangbuchten in den nächstgelegenen Hafen geschleppt, im Hafen mit Meerwasser abgespült und von den örtlichen Behörden registriert worden waren. Das Probenmaterial bestand aus mechanisch abgeriebenen Hautschuppen vom Kopf- und Flankenbereich beider Geschlechter aller Altersstufen.

Von etwa 100 Tieren aus vier unterschiedlichen Fängen wurde mit Hilfe feiner Bürsten aus rostfreiem Stahl das Stratum corneum der Haut entfernt (ungefähr 120 m² Hautfläche mit einer Ausbeute von ungefähr 5g·m⁻²). Durch leichte Rotationsbewegungen mit geringem Druck wurde erreicht, dass die Trennung der Hautschuppen vom Körper zwischen dem elastisch-ledrigen Stratum corneum und dem auf dem Körper verbleibenden, darunterliegenden wasserhaltigen Stratum spinosum der Epidermis erfolgte.

Während der Probenentnahme wurden Teilproben bei ungefähr 4 °C in Eis gekühlte, evakuierbare Probenbehälter überführt und unter Vakuum versiegelt oder alternativ in Flüssigstickstoff (-196 °C) eingefroren. Das Zwischenlagern von Probenmaterial (bei 4 °C) ohne den Einsatz von Vakuum führte zum Verkleben der Hautschuppen (i.e., zur Gelbildung als Kriterium für die „Frische“ des Probenmaterials, siehe Diskussion 4.3.1).

Die abgeriebenen frischen oder tiefgefrorenen Proben wurden auf 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße, deren Boden mit einer Nadel durchbohrt worden war, verteilt und diese in Plastikröhrchen gesteckt. Diese Einheiten wurden anschließend bei einer Umdrehung von 1500 U·min⁻¹, 3000 U·min⁻¹ oder 4000 U·min⁻¹ zentrifugiert (Labofuge mit Festwinkelrotor, Hettich). Die Proben erreichten dabei nach einer Zentrifugationszeit von 10 Minuten Raumtemperatur. Bei der Zentrifugation wurde das feste Material in dem Reaktionsgefäß festgehalten, während sich das fluide Untersuchungsmaterial in dem Plastikröhrchen sammelte. Durch die Zentrifugation wurde aus 1 g Stratum corneum ungefähr 0,1 ml Fluid erhalten, so dass für alle der hier be-

schriebenen Untersuchungen des Gels (bei 120 m² entfernter Hautfläche, einer Ausbeute von ungefähr 5g·m⁻²) etwa 60 ml unverdünnte Probe zur Verfügung stand. Zur Verdünnungen der Proben wurde isotonische Natriumchlorid-Lösung (0,9 % NaCl) verwendet. Der Proteingehalt der Proben wurde mit dem Bradford-Protein-Assay (Sigma) unter Verwendung von Ovalbumin als Kalibrierungsstandard bestimmt. Zusätzlich wurden die Konzentrationsangaben des Refraktionsindex-Detektors Optilab 903 verwendet (siehe unten).

Um die Bildung von Aggregaten in stark verdünnten Proben (1:500) zu beeinflussen, wurde die an freie Thiol-Gruppen bindende Aminosäure L-Cystein (Sigma) in isotonischer NaCl-Lösung in einer Konzentration von 0,1 und 0,01 mol·l⁻¹ als Verdünnungsmittel eingesetzt.

2.3 Kryo-rasterelektronenmikroskopische Untersuchung des Stratum corneums und des Gels

Für die kryo-rasterelektronenmikroskopische Untersuchung (Kryo-REM) der tiefgefrorenen Oberflächen der Haut und des Gels, vom dem jeweils 100 µl als unverdünntes Zentrifugat auf Objektträgern für 4 Stunden an der Luft bei 20 °C polymerisiert und anschließend in Flüssigstickstoff tiefgefroren worden war, wurden die Proben in die vorgekühlte Kryo-Schleuse (-196 °C) des Kryo-Rasterelektronenmikroskops ETEC Autoscan überführt. Wahlweise wurden einige Proben in dieser Schleuse zur Entfernung der sublimierten Eisschicht mit Flüssigstickstoff geduscht. Es ist zu beachten, dass durch diese Behandlung auch Partikel oder Biofouler entfernt werden können. In den Fällen, in denen die Anwesenheit von Biofouling-Organismen, Schmutzpartikeln oder Salzkristallen kontrolliert werden sollte, wurde auf diese Vorbehandlung verzichtet.

Betrachtet wurden die Proben unter Hochvakuum ($1,3 \times 10^{-3}$ Pa) bei einer Beschleunigungsspannung des Elektronenstrahls von 10 kV und einem Kathodenstrom von 175 µA. Um Eiskristalle von der Oberfläche zu entfernen, wurde unter elektronenoptischer Kontrolle die Temperatur des Probenstisches bei einem Vakuum von $1,3 \times 10^{-3}$ Pa wiederholt für 20 Sekunden auf -100 °C erhöht. Die morphologischen Veränderungen der Proben während dieser Gefrierätzung wurden fotodokumentiert. Um

Störladungen auf den Probenoberflächen zu beseitigen, wurden die Oberflächen in der Vorvakuumkammer des Kryo-Rasterelektronenmikroskops unter Argon (bei 8 - 10 Pa) mit Hilfe eines Dioden-Besputterungssystems mit einem Aluminium-Kohlenstoff-Gemisch beschichtet. Alternativ wurden Proben, die für 12 Stunden in der Vorvakuumkammer gefriergetrocknet worden waren, unter Argon-Atmosphäre in dem Sputter-Coater Hummer V (Technics) für 300 Sekunden mit Gold bedampft.

Für die kryo-rasterelektronenmikroskopische Untersuchung interzellulärer Strukturen des Stratum corneums wurden in Flüssigstickstoff gekühlte Hautproben mit einer Mischung aus Carboxymethylcellulose (Tissue TEC, Miles Inc., USA) und Leitsilber (Plano) im Verhältnis 1:1 auf einem Probenhalter befestigt, der innerhalb von 10 Sekunden auf -196 °C gekühlt wurde. Dieser Probentisch wurde über ein vorgekühltes Kryo-Shuttle BalTec VCT 100 (-196 °C) in die Vakuumkammer des Kryo-Schlittenmikrotoms BalTec MCS 010 gebracht und unterhalb des Messers befestigt. Die Schnittrichtung des Messers verlief entweder transversal zur Hautoberfläche oder leicht gekippt zur Oberfläche mit Schnittrichtung von den tieferen Hautschichten zur Oberfläche hin, um die Proben nicht zu stauchen. Nach dem Schneiden wurden alternativ Eiskristalle (6 Minuten, -139 °C , bei einem Vakuum von $1,7 \times 10^{-3}\text{ Pa}$) von der Probenoberfläche entfernt und anschließend ein Sputter-Coating mit Gold (für zweimal 40 Sekunden, bei 40 mA, unter Argon-Atmosphäre bei 4 - 5 Pa) aus zwei verschiedenen Winkeln vorgenommen, bevor die Proben mit Hilfe des Kryo-Shuttles an ein Kryorasterelektronenmikroskop LEO 1430 VP (LEO Electron Microscopy Ltd, UK) angedockt wurden. Die Proben wurden bei einem Vakuum von $5 \times 10^{-5}\text{ Pa}$ und einer Beschleunigungsspannung von 10 kV betrachtet.

2.4 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung des Stratum corneums

Die chemisch getrockneten Präparate wurden mit Leit-C (Conductive Carbon Cement nach Göcke, Neubauer) auf Aluminium-Trägern befestigt und anschließend mit Kohlenstoff in einer Bedampfungsanlage E 306 A (Edwards) bei 80 kV mit fünf Impulsen von 0,5 Sekunden, sowie für 90 Sekunden bei 60 kV mit Gold bedampft. Betrachtet wurden die Proben bei 10 kV in dem Rasterelektronenmikroskop Philips REM 515.

Für die Bestimmung von morphometrischen Kennzeichen der Hautzelloberflächen wurden die Photodokumente von chemisch getrockneten Hautoberflächen mit einem Photoscanner (UMAX Astra 1220P) in einer Auflösung von 600 dpi in elektronische TIFF-Bildformate umgewandelt und mit Hilfe des morphometrischen Programms Analysis 2.1 (Soft Imaging System) über Erosions- und Kontrastverfahren in maßstabsgetreue, monochrome Abbilder der Originale transformiert. Das Programm berechnete die Porengrößen, die in Klassen von $0,1 \mu\text{m}^2$ sortiert wurden. Aufgrund der Tatsache, dass alle Präparate, die in irgendeiner Form gefriergetrocknet oder chemisch behandelt worden waren, Schrumpfungen gegenüber den unbehandelten Proben von bis zu 10 % aufwiesen, wurden die berechneten Porengrößen zur Maßstabskorrektur in ihrem Wert um 10 % erweitert. Die Verteilung der Daten wurde statistisch analysiert (SigmaStat).

2.5 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung des Stratum corneums und des Gels

Für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung (TEM) des Stratum corneums des Pilotwales wurden die oben beschriebenen in Karnovsky-Lösung fixierten Proben auf 1 mm^3 große Fragmente verkleinert. Nach mehreren Spülschritten in Pufferlösung wurden die Proben über eine alkoholische Reihe (30 - 100 %) und Aceton bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ entfettet und dehydratisiert. Der Austausch von Aceton gegen das Einbettmittel Unicryl erfolgte stufenweise (Aceton, 3:1, 1:1, Unicryl (v/v)); die UV-Polymerisation wurde bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Ultradünnschnitte, die mit dem Ultramikrotom Ultracut (Reichert) hergestellt worden waren, wurden mit Bleicitrat und Uranylacetat kontrastiert und bei 80 kV in dem Transmissionselektronenmikroskop CEM 902 (Zeiss) betrachtet.

Für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung des Gels wurden Tropfen des unverdünnten Zentrifugates für 4 Stunden an der Luft bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ polymerisiert und in 1 mm^3 große Blöcke geteilt, die anschließend in 2 % iger Glutaraldehyd (v/v) in $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (pH 7) PIPES-Puffer (Piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulfonic acid]) für 45 Minuten fixiert wurden. Der Überschuss an Fixierungsmittel wurde durch Spülen mit Puffer entfernt. Das fixierte Gel wurde mit 2 % iger (w/v) Osmiumsäure

nachfixiert und nach wiederholten Spülschritten in Puffer über Alkohol (70 - 100 %) und Propylenoxid entwässert und in Epon 815 eingebettet. Ultradünnschnitte wurden mit Bleicitrat kontrastiert und in dem Transmissionselektronenmikroskop CEM 902 (Zeiss) bei 80 kV betrachtet.

2.6 Histochemische Untersuchung des Stratum corneums

Für die histochemische Untersuchung interzellulärer Substanzen wurden unfixierte Proben als uneingebettete Gefrierschnitte verwendet oder bei 4 °C in 70 % igem Alkohol entwässert und in dem Kunststoffmedium Technovit 7100 (Heraeus Kulzer) eingebettet. Zusätzlich wurden Proben untersucht, die chemisch fixiert worden waren. Von den gefrorenen Geweben wurden bei –20 °C etwa 10 - 15 µm dicke Schnitte in einem Kryo-Mikrotom (Bright 5030) angefertigt. Von den eingebetteten Geweben wurden Semidünnschnitte (1 – 3 µm) mit einem Rotationsmikrotom Ultracut (Reichert) abgetragen.

2.6.1 Darstellung von sauren Glykokonjugaten mit Alcianblau (pH 2.5)

Die Gefrierschnitte wurden mit 3 % iger Essigsäure gespült und mit 1 % iger Alcianblau-Lösung (GX8, Sigma) in 3 % iger Essigsäure (pH 2,5) für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt (PEARSE 1968). Die Befunde wurden mit einem Photomikroskop mit Photometer-Funktion MPM 01K (Zeiss) erhoben. Alcianblaue Färbungen wurden im Durchlicht und am Absorptionsmaximum von Alcianblau bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm sichtbar gemacht.

2.6.2 Verteilung von Thiol-Gruppen in der oberen Epidermis des Pilotwales

Unfixierte Gefrierschnitte und unfixierte Gewebeblöcke wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Eosin-5-maleimid (2 % ig, w/v) in isotonischer NaCl-Lösung (Molecular

Probes) für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert (MAMMOTO et al. 1997). Der Fluoreszenzfarbstoff, der vor allem selektiv an Thiole bindet, kann unter Umständen auch mit Lysin (Aminosäure mit einer freien Aminogruppe, siehe Abschnitt 3.6) reagieren (vgl. COBB und BETH 1990). Zur Kontrolle wurde das Färbeprotokoll variiert, indem vor der Inkubation mit Eosin-5-maleimid die freien Thiol-Gruppen mit dem nicht fluoreszierenden Ethyl-maleimid (2 % ig in isotonischer NaCl-Lösung, Sigma) geblockt wurden. Die grünen Färbungen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop Axioskop (Zeiss) bei Blaulichtanregung sichtbar gemacht.

2.7 Photometrische Untersuchung des Gels mittels Vielwinkel-Laserstreuung-Photometrie

2.7.1 Theoretischer Hintergrund der photometrischen Untersuchung

Die Vielwinkel-Laserstreuung-Photometrie (engl., multi-angle laser light scattering, MALLS) ist eine Methode mittels der sich die absoluten Molmassen und Geometrien von gelösten Polymeren bestimmen lassen (WYATT 1993). Die Messwerte der absoluten Molmassen und der korrespondierenden Molekülgeometrien, ausgedrückt in Form der Gyrationradien (auch Trägheitradius, engl., mean square radius, $\langle R_G^2 \rangle^{1/2}$) [nm] als Entfernung vom Molekülschwerpunkt, sind aus den Gleichungen zur Beschreibung der Lichtstreuung an festen Körpern abgeleitet (WYATT 1993):

$$\frac{K \cdot c}{R_{\vartheta}} = \frac{1}{M_w \cdot P_{(\vartheta)}} + 2A_2 \cdot c \quad [2.1]$$

mit

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{N_A \lambda_0^4} \cdot \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \quad [2.2]$$

$$R_{\vartheta} = \frac{r^2 \cdot I_{\vartheta}}{I_0 \cdot V} \quad [2.3]$$

$$P^{-1}(\vartheta) = 1 + \frac{\langle R_G^2 \rangle_z \cdot q^2}{3} + \dots \quad [2.4]$$

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \cdot \sin\left(\frac{\vartheta}{2}\right) \quad [2.5]$$

Die Proportionalität der Lichtstreuung zu den absoluten gewichtsmittelerten Molmassen (M_w) (engl., weight-average molar mass) lichtstreuender Moleküle steht im Zusammenhang erstens mit dem Lichtstrefaktor der Moleküle (angegeben durch den zweiten Virialkoeffizienten A_2), der aber bei niedrigen Probenkonzentrationen vernachlässigbar klein ist, sowie zweitens einem vom Streuwinkel des einfallenden Lichtes abhängigen, theoretisch hergeleiteten Form-Faktor (P_ϑ) [Gl. 2.1, 2.4 und 2.5]. Dieser Faktor ist abzuleiten aus der Funktion des vertikal einfallenden polarisierten Licht K (optische Konstante, Gl. 2.2) sowie der Konzentration c der lichtstreuenden Moleküle im Verhältnis zum geometrie- und massenspezifisch beeinflussten Intensitätsverhältnis des Lichtes (Exzeß-Rayleigh-Verhältnis R_ϑ , Gl. 2.3). Das Intensitätsverhältnis ergibt sich als messbarer Unterschied zwischen der Ein- und Ausgangsintensität. Die Probenkonzentration wird mit Hilfe eines Refraktionindex-Detektors als Änderung des Refraktionsindex der gelösten Probe c im Verhältnis zum Refraktionsindex des Lösungsmittel n bei konstantem Substanz-spezifischen Refraktionsindex-Inkrementes dn/dc (für Proteine ungefähr $0,19 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$) bestimmt. Für die Berechnung der absoluten Molmassen und der Molekülgröße wird ausgenutzt, dass im Fall kleiner Steuichtwinkel (Extrapolation auf den Streulichtwinkel 0°) die angulare Abhängigkeit des detektierten gestreuten Lichtes (P_ϑ) nicht mit der molekularen Konformation oder dem Grad an Verzweigungen variiert. Zur Beurteilung der Dispersität der Proben werden die Zahlenmittel (M_n), Gewichtsmittel (M_w) und z-Mittelwerte verwendet, die in dieser Untersuchung aus den Meßdaten des MALLS- und RI-Detektors (Refraktionsindex-Detektor) von der Software Astra (Wyatt Technology) berechnet wurden. Für monodisperse Proben gilt, dass $M_n = M_w = M_z$ ist, während sich bei polydispersen Proben die Abfolge $M_n < M_w < M_z$ entwickelt. Ursächlich hierfür ist, dass M_n von den kleineren Teilchen der Probe beeinflusst wird und M_w und M_z von den größeren (WYATT TECHNOLOGY DEUTSCHLAND 1994).

2.7.2 Untersuchung der Dispersität des Gels

Die Vielwinkel-Laserstreulicht-Photometrie wurde zur Untersuchung der absoluten Molmassen des gelbildenden Stratum corneums des Pilotwales eingesetzt (vgl. BAUM et al. 2001B und BAUM et al. 2002B). Dabei wurde das photometrische Verfahren zum einen zur Untersuchung bei Probenverdünnungen von 1:10 mit einer Gelpermeationschromatografie (engl., size exclusion chromatography, SEC) kombiniert und zum anderen die Bildung von Aggregaten bei Verdünnungen von 1:500 ohne Säulentrennung direkt aus den Streulicht-Signalen bestimmt (Batch-Messung). Zur Untersuchung der Molmassenveränderungen mit der Zeit wurden aus jeweils 20 µl zentrifugiertem Stratum corneum von fünf unterschiedlichen Zentrifugaten (3000 U·min⁻¹) mit isotonischer NaCl-Lösung Verdünnungen von 1:10 hergestellt. Die Proben liefen mit isotonischer NaCl-Lösung über eine Säule BIOSIL-250 (Biorad) bei einer Flußrate von 0,1 ml·min⁻¹. Die getrennten Fraktionen passierten die Photozelle des Spektrophotometers SpectroMonitor D (280 nm, Milton Roy). Anschließend durchliefen die Proben zur Bestimmung der absoluten Molmassen den Vielwinkel-Laserstreulicht-Detektor DAWN DSP (633 nm, Wyatt Technology) und den Refraktionsindex-Detektor Optilab 903 (633 nm, Wyatt Technology) zur Bestimmung der Konzentration der Fraktionen. Streulichtwinkel zwischen 34,8° and 110,7° wurden verwendet, um auf den Streulichtwinkel 0° zu extrapolieren. Zur Extrapolation wurde der Zimm-Berry Plot, $(K \cdot c \cdot R^{-1})^{0.5}$ (erster oder zweiter Ordnung unter der Option der bekannten Gesamtkonzentration) verwendet, der für nicht-lineare Moleküle Gültigkeit besitzt (Software Astra, Wyatt Technology). Die Zimm-Berry-Gleichung enthält die Streulichtkonstante des vertikal polarisierten Lichtes K (Messwerte DAWN), die Konzentration c (Messwerte des Refraktionsindex-Detektors) und das Rayleigh-Verhältnis R_{ϑ} im Streulichtwinkel ϑ (Messwert DAWN). Zur Untersuchung zeitlicher Veränderungen in der Verteilung absoluter Molmassen wurden Aliquots der Ausgangsproben alle zwei Stunden über einen Zeitraum von 12 Stunden in die Meßanordnung injiziert.

2.7.3 Untersuchung der Aggregationskinetik des Gels

Zur Untersuchung der zeitlichen Molmassenveränderungen hochverdünnter Lösungen wurden Verdünnungen aus 10 verschiedenen Zentrifugaten mit isotonomischer NaCl (jeweils 100 ml, etwa 1:500 (v/v), entsprechen etwa einer Konzentration von $c = 1,25 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$) hergestellt und mit einem Magnetrührer bei 23 °C für mehr als 12 Stunden gerührt. Aliquots dieser Verdünnung von jeweils 2 ml wurden in einem zeitlichen Abstand von etwa 45 Minuten bei einer Flußrate von $0,15 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ isotonomischer NaCl-Lösung (HPLC Pumpe, Knauer) in die Meßanordnung injiziert, die wie oben beschrieben aus einem Spektrophotometer, Vielwinkel-Laserstreulicht-Photometer DAWN DSP und dem Refraktionsindex-Detektor Optilab 903 aufgebaut war. Bei diesem Versuch wurden die absoluten Molmassen aus dem Plateau-Bereich der Signale unter Verwendung der Streuwinkel zwischen $38,8^\circ$ and $110,7^\circ$ auf den Streuwinkel 0° extrapoliert.

2.8 Rheologische Untersuchung des Gels

2.8.1 Theoretischer Hintergrund der rheologischen Messungen

In der vorliegenden Arbeit wurden mechanisch harmonisch-periodische Belastungen in dynamischen rheologischen Schwingungsexperimenten mit axial angeordneten oszillierenden Geometrien zur Untersuchung des strukturbildenden zentrifugierten Fluids aus dem Stratum corneum des Pilotwales verwendet.

Die axial aufgeprägte Oszillation erzeugt zwischen einer feststehenden Geometrie und einer sich drehenden Geometrie eine Deformation in einem Fluid. Die Deformation ist abhängig von der Beanspruchung, der Schubspannung τ , die durch die Oszillation tangential auf die sich drehende Fläche wirkt, sowie dem durch innerere Reibung erzeugten Widerstand gegen die Deformation und dem sich daraus ergebenden senkrecht zur Geometrie verlaufenden Geschwindigkeitsgradienten der Deformation zwischen bewegter und unbewegter Geometrie. Die Zeitabhängigkeit des elastischen Verhalten liefert wertvolle Informationen über den inneren Aufbau des

Fluids. Bei einer Schwingungsmessung mit vorgegebener oszillierender sinusoidaler Kreisbewegung, einer Schubspannung $\tau^*(t) = \tau_0^* e^{i\omega t}$ mit der Kreisfrequenz $\omega = 2\pi\nu$, folgt bei einem viskoelastischen Fluid phasenverschoben eine sinusoidale Scherung $\gamma^*(t) = \gamma_0^* e^{i\omega t}$ mit derselben Frequenz. Da viskoelastische Fluide im Gegensatz zu ideal elastischen Festkörpern einer aufgeprägten Deformation nicht sofort mit Bewegung folgen, ergibt sich ein Phasenverschiebungswinkel δ ($0^\circ \leq \delta \leq 90^\circ$) zwischen Schubspannung und Scherung. Sind die Beanspruchungen in Phase ($\delta = 0^\circ$), so liegt ein rein elastisches Verhalten des Fluides vor (Feder). Beträgt der Phasenverschiebungswinkel δ dagegen 90° , handelt es sich um ein viskoses Fließverhalten (Dämpfer), wobei die Phasenverschiebung δ bei viskoelastischen Fluiden zwischen den Extremwerten liegt. In Analogie zum Hookschen Gesetz für ideal elastische Festkörper ergibt sich aus dem Quotienten der komplexen Amplituden der Schubspannung τ_0^* und der Scherung γ_0^* der komplexe Schubmodul G^* [Gl. 2.6].

$$\frac{\tau_0^*(i\omega)}{\gamma_0^*(i\omega)} = G^*(i\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega) \quad [2.6]$$

Aus dem komplexen Schubmodul G^* eines Fluids lassen sich die rheologischen Kenngrößen für viskoses Verhalten (Verlustmodul G'') und das elastische Verhalten (Speichermodul G') ableiten (FERRY 1980). Werden die Deformationen harmonisch-periodisch oszillierend aufgeprägt, kann im Fall viskoelastischer Fluide ein Teil der eingetragenen Energie elastisch reversibel gespeichert und beim Zurückschwingen wieder abgegeben werden. Nach MAC FARLANE (1967) ist ein Speicher ein Objekt, das Energie temporär in Arbeit umwandelt, bei der Abgabe der Arbeit wieder Energie gleicher Qualität und Quantität freisetzt. Der verbleibende nicht elastisch gespeicherte Anteil der eingetragenen Energie wird durch viskoses Fließen irreversibel in Scherwärme umgewandelt (dissipiert).

In dieser Untersuchung wurde eine Kompartimentanalyse durchgeführt. Die Analyse des dynamisch-biophysikalischen Sol-Gel-Systems wurde von den Geleigenschaften abgeleitet, die rheologisch-mathematisch auf der Beschreibung des Speichermoduls, $G'(\omega) = |G^*(i\omega)| \cdot \cos \delta(\omega)$, dem korrespondierenden Strukturfaktor f [Gl. 2.7], dem

Verlustfaktor $\tan \delta(\omega)$ sowie der dynamischen Viskosität, $\eta' = G''(\omega)$, beruhen. Der Zusammenhang basiert auf der Tatsache, dass Gele als real und formal kompartimentierte Mikroumgebungen makroskopisch kleine interagierende Multikompartimente darstellen. So lässt sich die Gelkinetik als diskrete Zeitreihe der Interaktionen beschreiben, die auf sequentiellen und parallelen Reaktionen ihrer Subsystems beruhen. Um Reaktionsmechanismen zu beschreiben, wurden die rheologischen Parameter in dimensionslose Größen umgewandelt (FLEISCHER, unveröffentlicht). Mit Hilfe dieser normalisierten Parameter war es möglich, die Gelkinetiken von Proben unterschiedlicher Chargen zu vergleichen und Unterschiede zu Gelkinetiken anderer Sol-Gel-Systeme herauszuarbeiten. Die Normalisierung erwies sich als vorteilhaft bei der Analyse der Zeitabhängigkeit der Gelbildungsprozesse sowie bei der Extrapolation der Gelbildung auf ihren Beginn. Die Bildung normalisierter Funktionswerte unterstützte die Findung einer adequaten mathematischen Reaktionsbeschreibung. Hierfür wurden dimensionslose Zeitvariablen und Verweilzeiten verwendet, $t^+ = \frac{t}{\langle t \rangle}$. Normalisiert wurden der komplexe Modul der mechanischen Energie im Verhältnis zur aktiven und reaktiven Energie [Gl. 2.7 und Gl. 2.8]:

$$f^*(\omega) = \left(\frac{G'(\omega)}{G^*(i\omega)} \right)^2 = |f| e^{-i2\delta} \quad \text{und} \quad f_*^*(\omega) = \left(\frac{G''(\omega)}{G^*(i\omega)} \right)^2 = |f_*| e^{-i2\delta} \quad [2.7]$$

mit den komplementären Modulen

$$|f| = \cos^2 \delta = \frac{1}{1 + \tan^2 \delta} \quad \text{und} \quad |f_*| = \sin^2 \delta = \frac{\tan^2 \delta}{1 + \tan^2 \delta} \quad [2.8]$$

Es ist zu beachten, dass in dieser Darstellung die elastischen von den viskosen Eigenschaften getrennt dargestellt werden können. Die normalisierte Eigenschaft beschreibt in Form des integralen Strukturfaktors $|f|$ ($0 \leq |f| \leq 1$) das Vermögen, freie Energie zu speichern. Dieses Vermögen ist eine Geleigenschaft und spiegelt die Evolution von elastisch-strukturierenden Elementen während der Gelbildung wieder

(FLEISCHER, unveröffentlicht). In dieser Untersuchung wurde neben dem Strukturfaktor f der Dissipationsfaktor $|f_*| = 1 - |f|, f_*$ ($0 \leq |f_*| \leq 1$) zur Datenanalyse verwendet. Diese Faktoren sind miteinander verbunden. Zum Beispiel ist bei einem Phasenverschiebungswinkel $\delta = 0$ (bei einer reversiblen Transformation des Hookschen Körpers) $|f|$ im Maximum 1 während $|f_*|$ im Minimum 0 liegt. In dieser Schreibweise gilt für den Cross-over point ($G' = G''$) – der als „Gelpunkt“ $-|f| = |f_*| = \frac{1}{2}$ beschrieben wird, dass viskose und elastische Eigenschaften mit gleicher Wahrscheinlichkeit auftreten.

Mit den dimensionslosen Funktionen von f und t^+ , die Lebensdauerverteilungsfunktionen oder reaktionsbedingte Ausfallwahrscheinlichkeiten repräsentieren, wurden der Transformationsgrad der Sol-Gel-Umwandlung und die Gelkinetik mit mittleren Reaktionszeiten als Erwartungswerte $\langle t \rangle$ quantifiziert und auf rein evolutive Parameter bezogen. In dieser Untersuchung wurde getestet, ob die Gelbildung Ähnlichkeiten mit der Evolution von Verschlaufungsnetzwerken, Aggregations- oder Vernetzungsreaktionen hatte. Zu diesem Zweck wurden die kinetischen Daten an mathematische Funktionen angepaßt, die zur Beschreibung von beispielsweise Enzym-katalysierten Reaktionen (Michaelis-Menten-Korrelation), exponentiellem Wachstum oder Treffermodellen (Gamma-Verteilungsfunktionen) verwendet werden. Diesen Funktionen ist gemeinsam, dass sie die bioenergetischen Prozesse von Multikompartiment-Reaktions-Systemen kennzeichnen. Zum Beispiel eignen sich 3-Treffermodelle zur Beschreibung von Strukturierungen, die sich bei der Bildung von tripel-helikalen, thermo-reversiblen Gelatine-Gelen ergeben (FLEISCHER, persönliche Mitteilung).

2.8.2 Rheologische Untersuchungen des Gels

Für die rheologische Untersuchung des zentrifugierten Stratum corneums wurden oszillatorische Messungen mit einem Rheometer (RheoStress RS 150, Haake) durchgeführt, das alternativ mit einer Kegel-Platte Geometrie (Durchmesser = 35 mm, Öffnungswinkel 1° , Probenvolumen 0,3 ml) oder einer Platte-Platte Geometrie

(Durchmesser = 60 mm, Probenvolumen 3 ml) ausgerüstet war. Die Deformationen wurden unter Vorgabe der Schubspannung oder der Scherrate durchgeführt. Während der Messungen waren die Geometrien von einem Plastikgehäuse umgeben, in dem angefeuchter Zellstoff für etwa 7 bis 9 Stunden für eine konstante Luftfeuchtigkeit sorgte. Diese Vorsichtsmaßnahme reduzierte das Austrocknen der Proben am Rand der Geometrie. Daten, die nach Ablauf von 9 Stunden erhoben worden waren, blieben bei der Auswertung unberücksichtigt. Vor der Aufnahme von mechanischen Spektren wurden die Gelbildungsprozesse mindestens so lange beobachtet, bis der Speichermodul G' oder der Strukturfaktor f einen Plateauwert erreichte (nach etwa 5 Stunden).

2.9 Photoelektronenspektroskopische Untersuchung der Hautoberfläche und des Gels

2.9.1 Theoretischer Hintergrund der photoelektronenspektroskopischen Untersuchung

Bei der Elektronenspektroskopie für die chemische Analyse, ESCA, auch Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (engl., X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) genannt, wird die element- und bindungsspezifische Abgabe von Photoelektronen nach Röntgenbestrahlung gemessen. Dabei trifft eine in einer Röntgenröhre erzeugte charakteristische Röntgenstrahlung ($Mg\ K\alpha$ bzw. $Al\ K\alpha$) mit bekannter Energie $h\cdot\nu$ auf die Probenoberfläche und dringt tief in die Probe ein. Neben verschiedenen Prozessen, die in Konkurrenz zueinander stehen, findet auch der photoelektrische Effekt statt, d.h. Elektronen werden aus kernnahen Orbitalen und aus Valenzorbitalen herausgeschlagen. Die hohe Primärenergie der Röntgenstrahlung verleiht den Photoelektronen eine kinetische Energie E_{kin} , die es ihnen ermöglicht, den Atomverband und gegebenenfalls die Probenoberfläche zu verlassen. Das Spektrometer gestattet das Bestimmen von kinetischer Energie und Anzahl der austretenden Photoelektronen.

Die Differenz zwischen bekannter Primärenergie, $h\cdot\nu$, und der gemessenen kinetischen Energie E_{kin} ergibt die Bindungsenergie E_B der jeweiligen Elektronen [Gl. 2.9]:

$$E_B = h \cdot \nu - E_{\text{kin}}$$

[2.9]

Da die Bindungsenergie der Elektronen für jedes Orbital eines jeden Elementes charakteristisch ist, kann auf die Herkunft bezüglich der Atomart und der Elektronenorbitale der Elektronen geschlossen werden. Das gilt jedoch nur für Photoelektronen von Atomen, die sich nahe der Oberfläche befinden. Photoelektronen, die von Atomen aus der Bulkphase der Probe stammen, dissipieren ihre kinetische Energie an den Elektronenhüllen anderer Atome und tragen zum kontinuierlichen Untergrund des Spektrums bei. Damit wird die Röntgen-Photoelektronenspektroskopie zu einer oberflächensensitiven analytischen Methode. Die Informationstiefe beträgt bei diesem Verfahren für Kohlenstoff ca. 8 nm und ist damit spezifisch für oberflächenbestimmende chemische Merkmale. Die Anzahl der von einer Atomsorte emittierten Photoelektronen steht in einem funktionellen Zusammenhang mit der Anzahl der Atome auf der Probenoberfläche bzw. im oberflächennahen Bereich.

Das Auszählen der Photoelektronen durch die Detektoren des Spektrometers erlaubt, bei Berücksichtigung der experimentell ermittelbaren Spektrometertransmissionsfunktion und den elementspezifischen relativen Empfindlichkeitsfaktoren, neben der qualitativen Aussage auch eine quantitative Aussage über die elementare chemische Zusammensetzung der Probenoberfläche bzw. oberflächennaher Bereiche. Die chemische Umgebung eines Atoms beeinflusst die energetische Lage der Elektronen. Elektronenziehende (elektronegative) Elemente in der Umgebung ziehen Elektronendichte vom Atom ab und verursachen damit positive Partialladungen am Atom. Für das Entfernen von Photoelektronen aus partiell positivierten Atomen wird mehr Energie benötigt, d.h. der Anteil der kinetischen Energie, die ein Photoelektron vom primären Röntgenquant verliehen bekommt, wird im Gegensatz zu partiell nicht positivierten Atomen kleiner. Analog dazu führt eine erhöhte Elektronendichte am Atom zu einer energetischen Absenkung des photoelektrischen Effekts. Die sich ergebenden Verschiebungen der Peaklage im Spektrum läßt Schlußfolgerungen über die chemische Umgebung einer Atomsorte zu. So lassen sich beispielsweise bei energetisch hochauflösenden Spektrometern ($\Delta E < 0,1 \text{ eV}$) verschiedene Bindungszustände von C-Atomen als Carboxyl-, Carbonyl-, Hydroxylgruppe usw. nachweisen.

2.9.2 Probenvorbereitung und Meßbedingungen

Zum Vergleich der chemischen Zusammensetzung der Hautoberfläche und der Oberfläche des auspolymerisierten Gels wurden in Flüssigstickstoff gefrorene Proben der Haut des Pilotwales (ca. 0,25 cm²) und Zentrifugate des Stratum corneums untersucht, die nach vierstündiger Polymerisation bei Raumtemperatur in Flüssigstickstoff eingelagert worden waren. Aufgrund des Aufrechterhaltens des Vakuums (Basisdruck ca. 1 Pa) und zum Vermeiden von Denaturierungsreaktionen erfolgten alle Messungen der tiefgefrorenen Haut und des auspolymerisierten Gels des zentrifugierten Stratum corneums des Pilotwales bei tiefen Temperaturen (ca. -120 °C). Die Untersuchungen erfolgten unter Verwendung monochromatisierter Al K $\alpha_{1,2}$ Röntgenstrahlung mit dem Spektrometer AXIS ULTRA (Kratos Analytical, UK). Die Aufnahmeleistung der Röntgenröhre betrug 300 W bei 20 mA. Die Übersichtsspektren wurden mit einer Analysator-Passenergie von 160 eV aufgezeichnet, die Elementspektren mit 20 eV. Als Ladungskompensation diente eine Niederenergie-Elektronenquelle (Filament) in Verbindung mit einer magnetischen Immersionslinse als Extraktions-Elektronenoptik. Sie sorgte dafür, dass während der Messung eine Überkompensation der Probe mit negativen Ladungsträgern stattfand.

Der Abzug des Spektrenhintergrundes (Basislinienkorrektur) erfolgte nach BEAMSON und BRIGGS (1992) in Form einer Ladungskompensation durch das Setzen des C 1s Peaks der gesättigten Kohlenwasserstoffverbindungen C_xH_y auf eine Bindungsenergie von BE = 285,00 eV.

3 Ergebnisse

3.1 Elektronenoptische und histochemische Ergebnisse zum Stratum corneum

3.1.1 Kryo-rasterelektronenmikroskopische Ergebnisse zum Stratum corneum

Durch eine intensive Absuche der Hautoberfläche nach Spuren epibiontischer Organismen wurde das Selbstreinigungspotential der Haut von Pilotwalen begutachtet. Trotz der Tieftemperatur-Konservierung und der achtsamen Probenbehandlung, sowie des Verzichtes auf Detergentien und Lösungsmittel, die die natürliche Lage und Konzentration dieser Spuren hätten verwischen können, konnten nur in den seltensten Fällen und auch nur sehr vereinzelt Biofouling-Organismen oder Salzkristalle entdeckt werden (Abb. 3-1, 3-2 und 3-3). Eine Ausnahme mit nahezu vollständiger Bedeckung durch nicht näher differenzierte schleimumhüllte Kieselalgen (bestätigt durch die Anwesenheit von Silicium nach einer energie-dispersen Röntgen-Analyse, persönliche Mitteilung Dr. R. Stelzer) bildeten die unbehandelten Proben eines einzigen Individuums. Dieser pathologische Befund stand im starken Kontrast zu den ansonsten „sauberen“ Hautoberflächen verschiedener anderer Tiere, Altersgruppen und Geschlechter aus verschiedenen Fängen und Expeditionsjahren.

Mit Hilfe von kryo-rasterelektronenmikroskopischen Techniken (einschließlich der Kryo-Konservierung und induzierter Gefriertrocknung unter optischer Kontrolle) konnte erstmals ein topologischer Eindruck von der Hautoberfläche gewonnen werden. Die Untersuchung ergab, dass die Hautoberfläche des Pilotwales ein einheitlich glattes Niveau aufweist. Mitunter überragten wasserhaltige Kolloide (vgl. Abb. 3-2, im gefriergetrockneten Zustand, Abb. 3-4, zu fädigen Strukturen zusammengefallen) und Fette (in ihrer Form durch Gefriertrocknung nicht verändert, Abb. 3-4) diese Fläche. Die hügeligen Gebiete variierten unregelmäßig in ihrer Verteilung und in ihrer Ausdehnung mit Durchmessern von 100 bis zu 300 μm . Die Grenzen dieser Hügel zeigten mitunter eine Übereinstimmung mit den Grenzen der darunterliegenden Hautzellen. Bei allen Proben wurden fetthaltige Bereiche in der Ausdehnung von 0,1

bis 5 μm von den umliegenden wasserhaltigen Bereichen durch Gefriertrocknung erodiert (Abb. 3-5, 3-6).

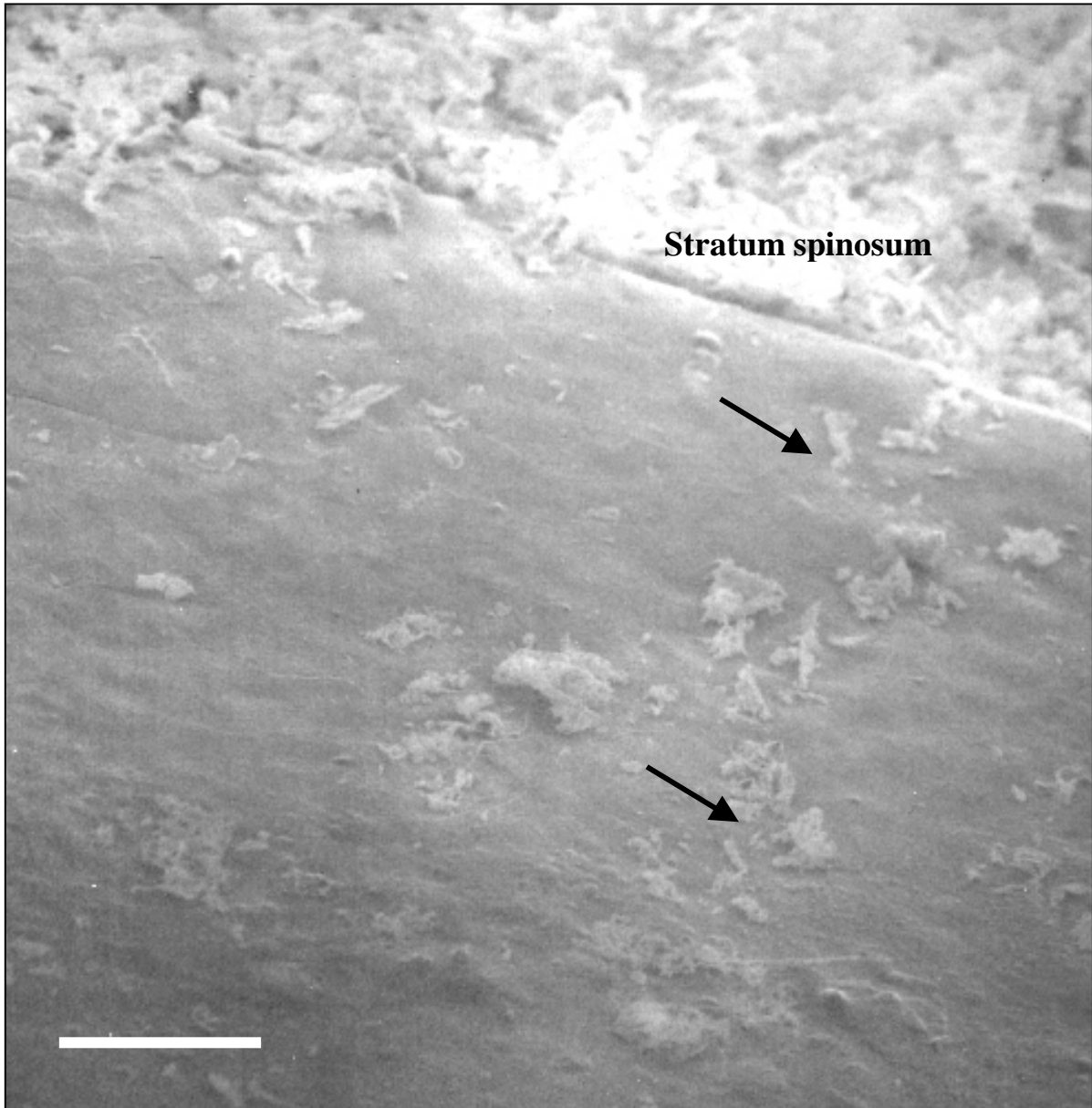


Abb. 3-1: Oberflächenhabitus der Haut des Pilotwales (*Globicephala melas*). Auf der glatten Oberfläche liegen Bruchstücke (Pfeile) des aufgebrochenen Stratum spinosums (Hintergrund). Kryo-rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der unfixierten und nicht dehydratisierten Haut. Maßstab 100 μm .

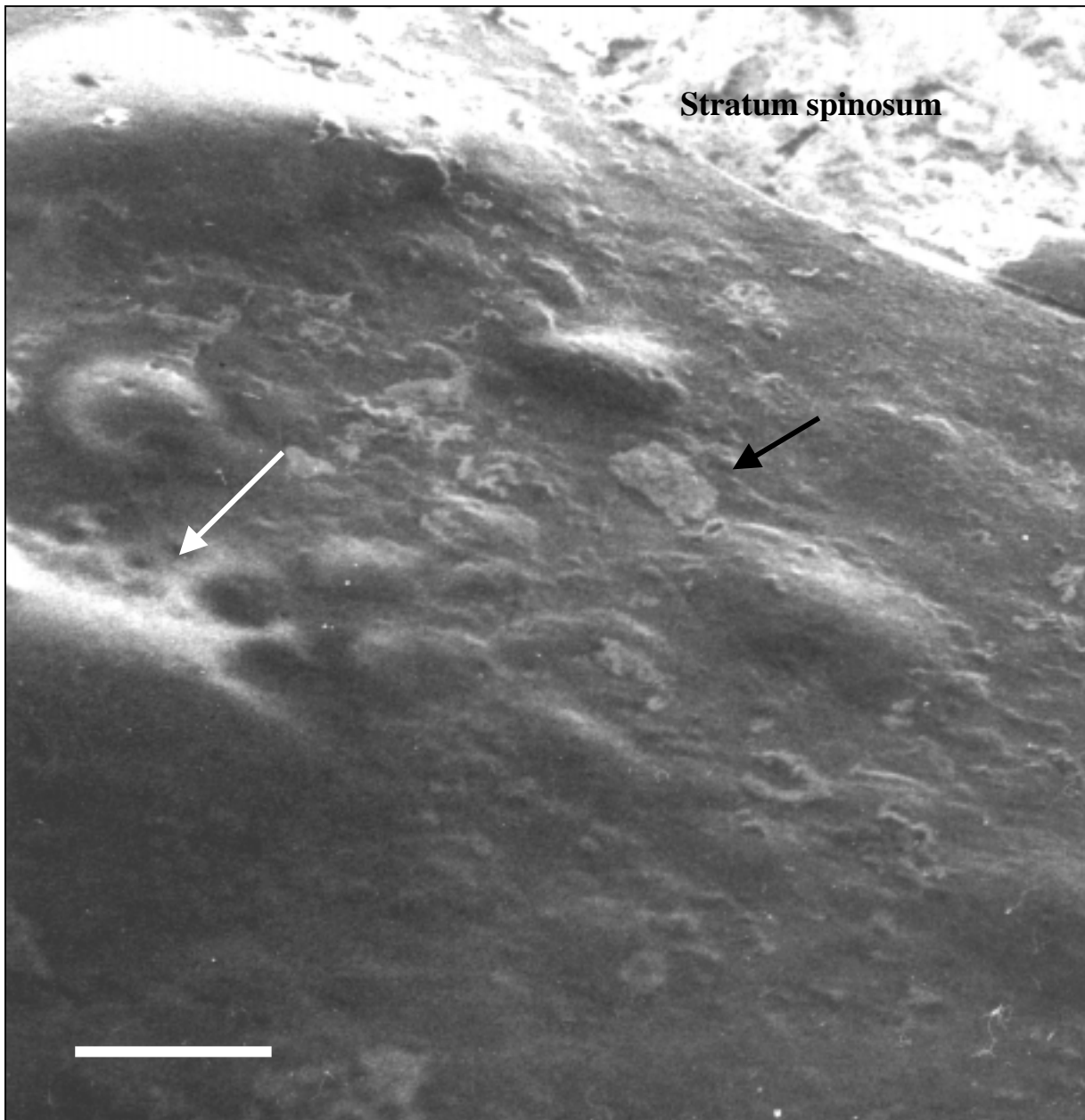


Abb. 3-2: Oberflächenhabitus der Haut des Pilotwales (*Globicephala melas*). Von der glatten Oberfläche wölbten sich mitunter 10 bis 300 µm große Areale (weißer Pfeil) auf (vgl. Abb. 3-4). Bruchstücke (schwarzer Pfeil) des aufgebrochenen Stratum spinosum (Hintergrund). Kryo-rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der unfixierten und nicht dehydratisierten Haut. Maßstab 100 µm.

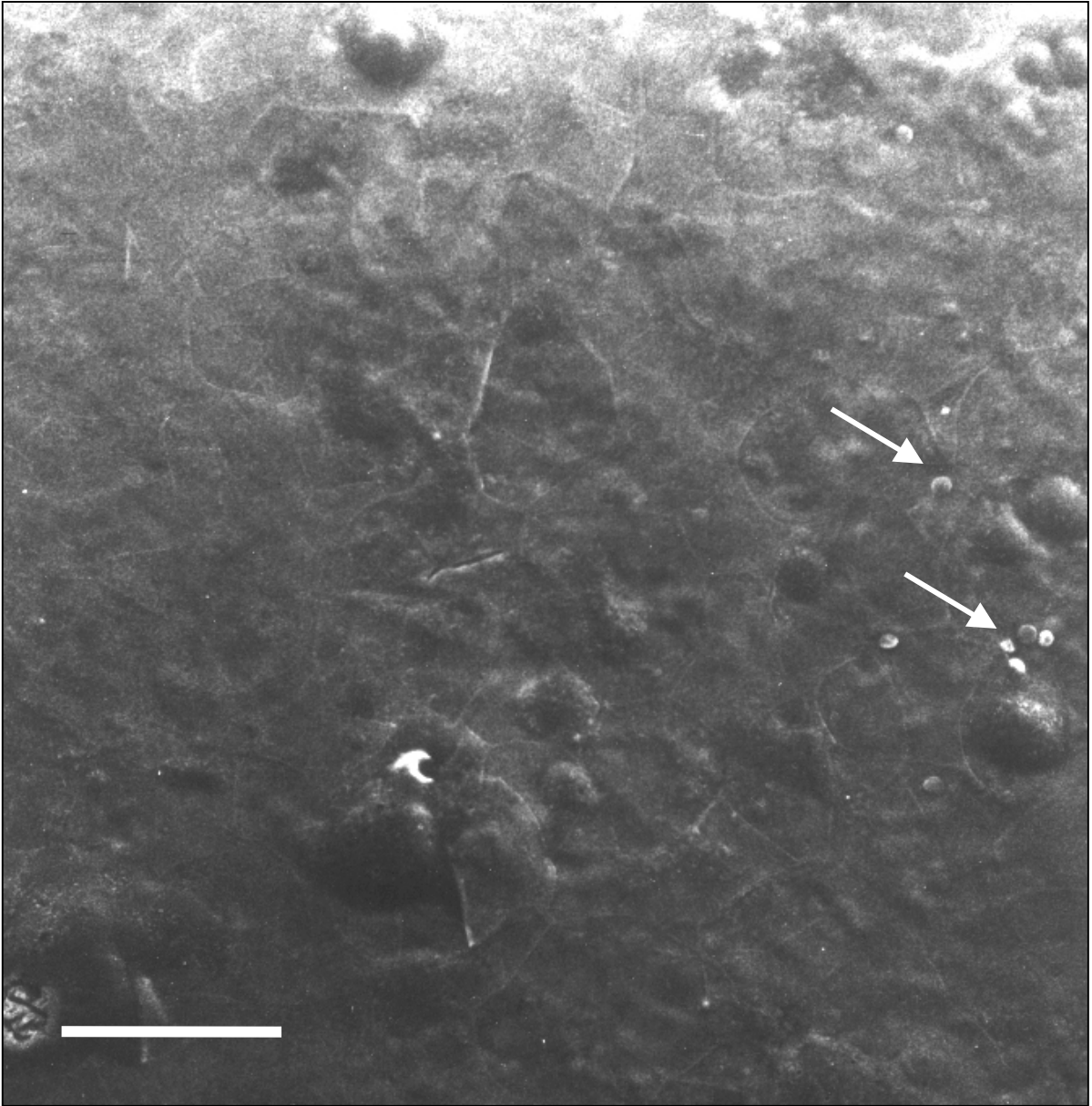


Abb. 3-3: Bewuchskontrolle an der Hautoberfläche des Pilotwales (*Globicephala melas*). Auf der „sauberen“ Haut waren vereinzelt Kieselalgen (Pfeil) zu finden, Makrofoulingorganismen fehlten. Kryo-rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der unfixierten und nicht dehydratisierten Haut. Maßstab 50 µm.

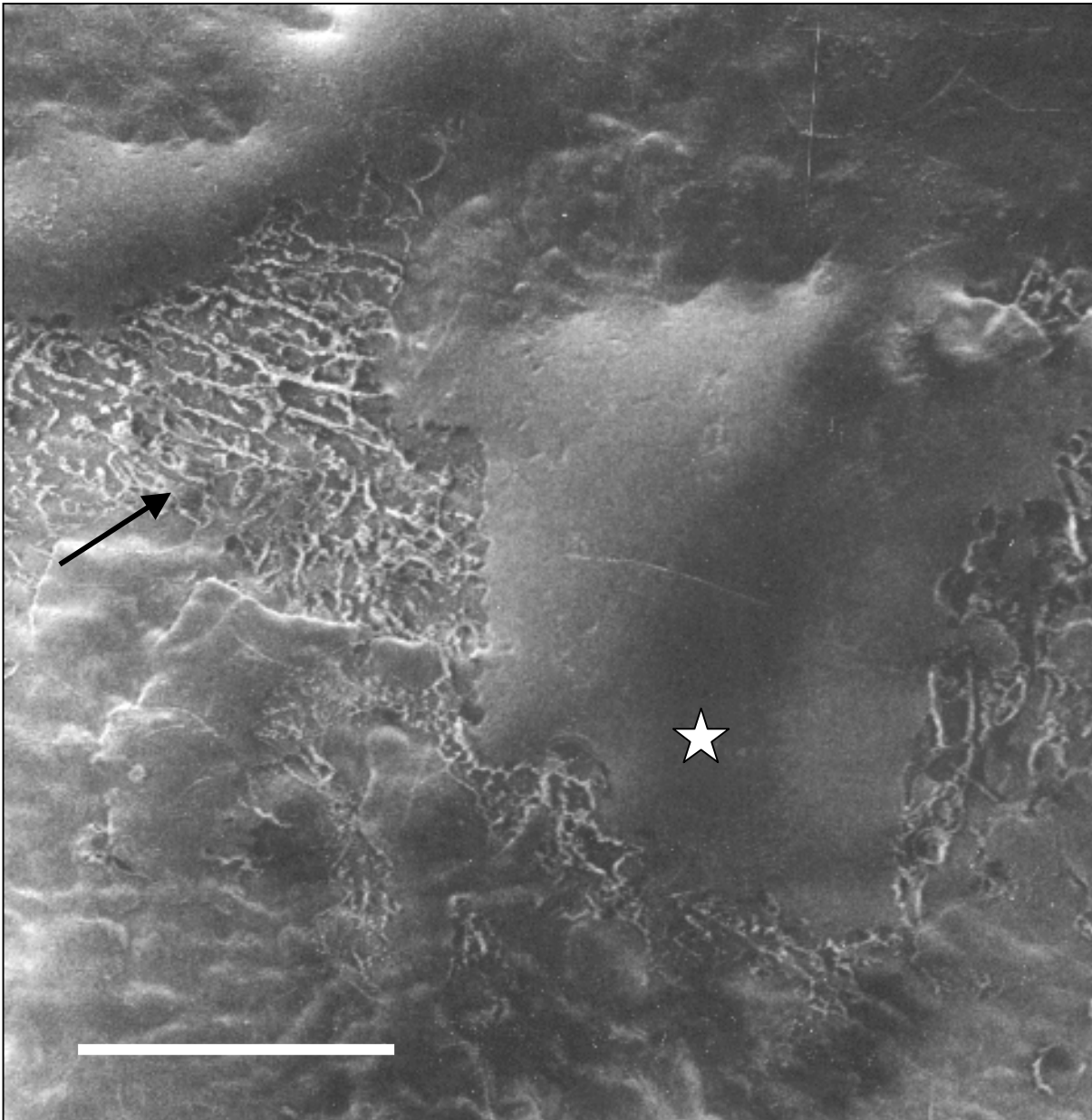


Abb. 3-4: Kryo-rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Hautoberfläche (vgl. mit Abb. 3-2). Nach einer milden Dehydratisierung (Gefrierätzung) erodierten wasserhaltige Areale (Pfeil), während die Form der fetthaltigen Gebiete (Stern) von der Dehydratisierung unberührt blieb. Maßstab 100 μm .

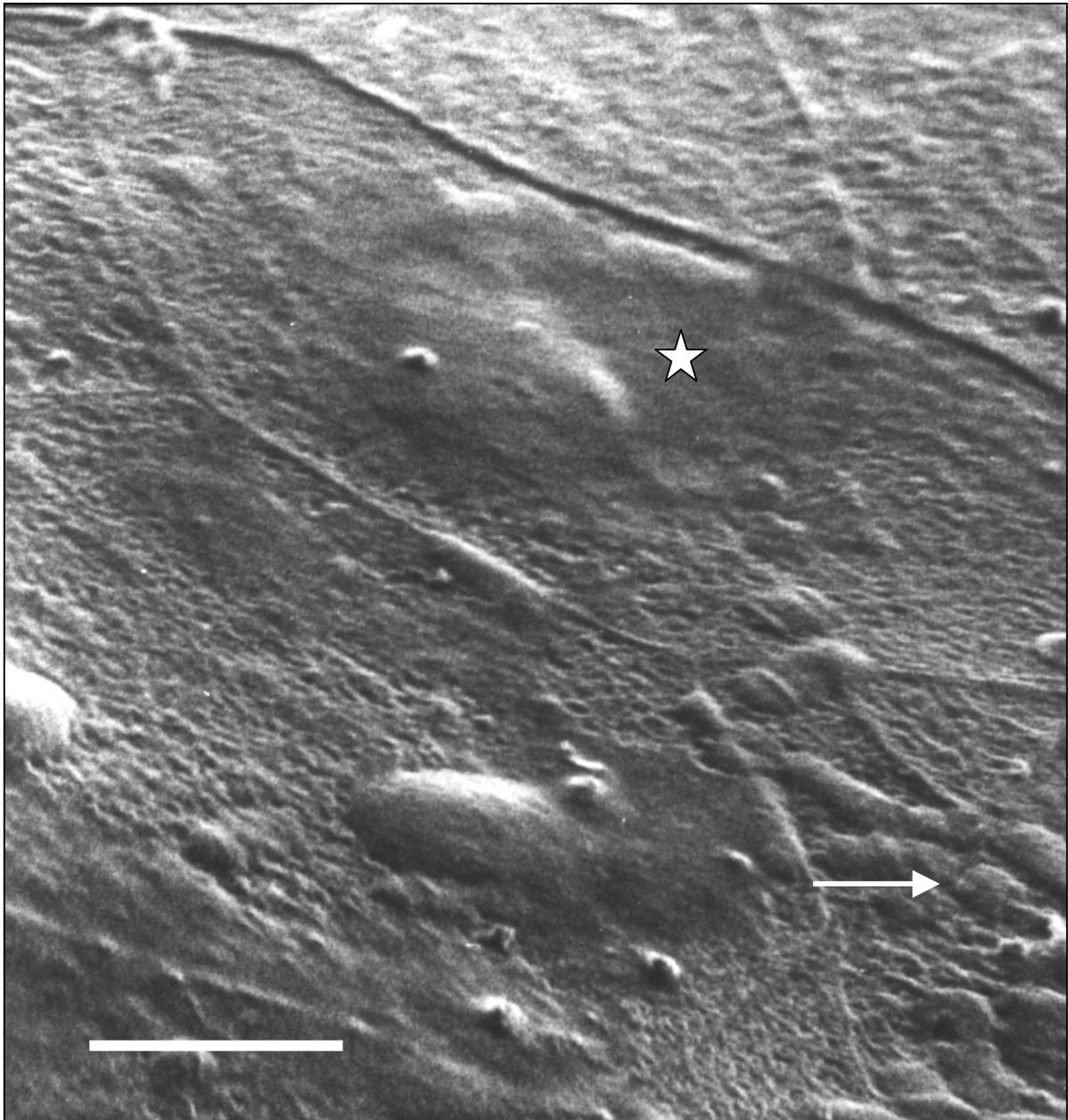


Abb. 3-5: Kryo-rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Hautoberfläche des Pilotwals (*Globicephala melas*). Ansicht von Arealen, die nicht von einer dickeren Schicht (vgl. mit Abb. 3-4) überlagert waren. Melanin-Granula (Pfeil) überragen die ebene, mit Gel bedeckte Hautoberfläche. Fetthaltige Bereiche (Stern). Maßstab 10 μm .

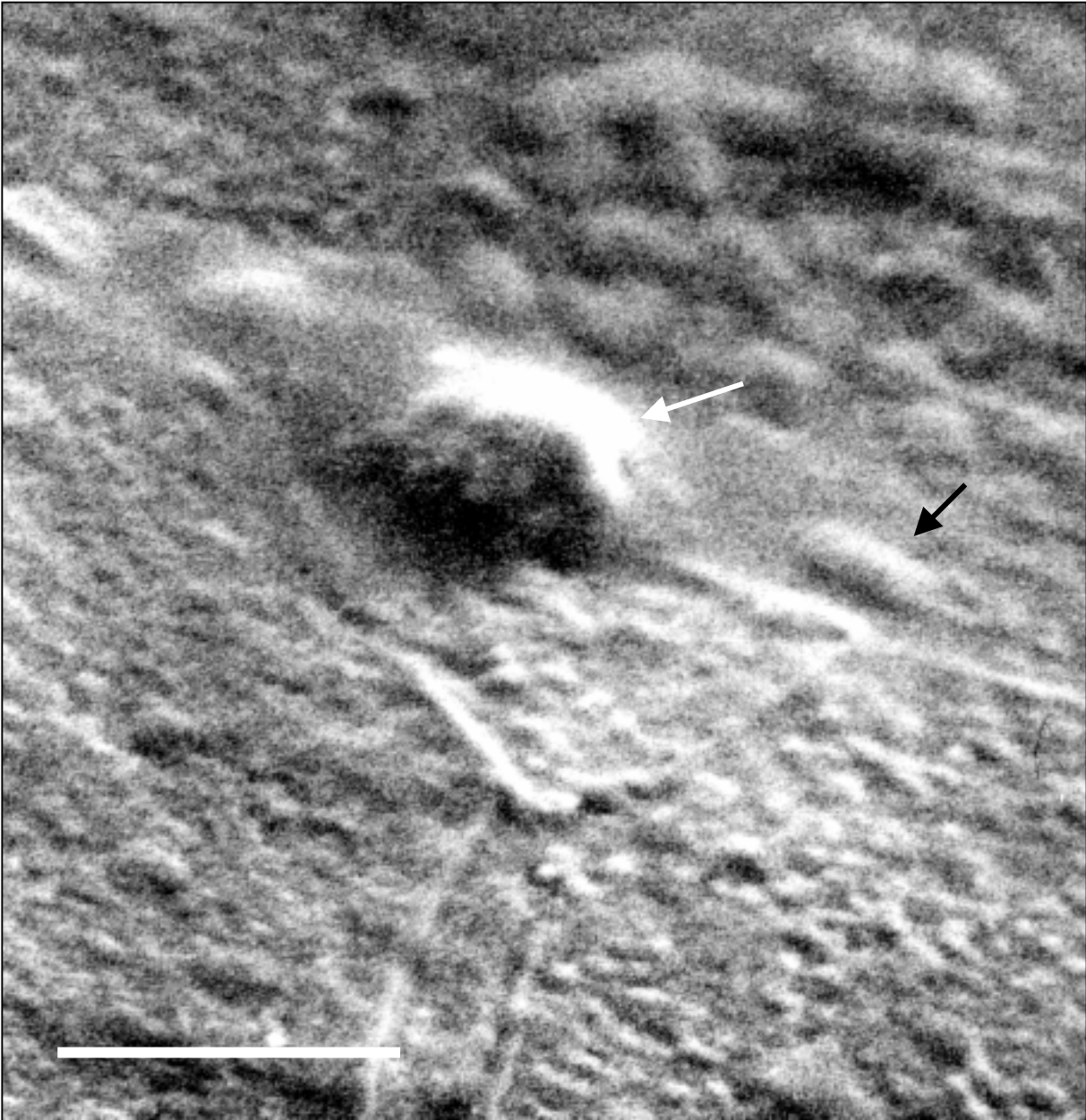


Abb. 3-6: Unkontrastierte kryo-rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Hautoberfläche des Pilotwals (*Globicephala melas*). Die Oberfläche zeigte eine laterale Rauigkeit von etwa $0,03\ \mu\text{m}$. Mitunter überragten kleinere Verunreinigungen (weißer Pfeil) die ebene Fläche. Melanin-Granula (schwarzer Pfeil). Maßstab $10\ \mu\text{m}$.

Das hier untersuchte verhornte und bis zu 15 Schichten mächtige Stratum corneum der Epidermis setzt sich aus überlagernden, 0,5 bis 1,5 μm dicken Zellen mit einer lateralen Ausdehnung von etwa 50 x 80 μm zusammen (vgl. Abb. 3-5 und 3-7). Die Zellen sind untereinander über desmosomale Brücken verbunden (Abb. 3-8). Die kryo-rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass sich diese Brücken in den unteren Bereichen des Stratum corneums (offener weißer Pfeil in Abbildung 3-8) gegenüberliegen und einen Interzellularraum von etwa 0,3 – 0,8 μm Höhe umschliessen. Der Interzellularraum verringert sich auf etwa 0,3 μm mit zunehmender Nähe zur Hautoberfläche (geschlossener weißer Pfeil in Abb. 3-8). Diese Verringerung ist mit einem Formwandel der desmosomalen Brücken verbunden, die von einer meist stabförmigen in eine verhakte Form wechseln (Abb. 3-8, vgl. auch Abb. 3-13, transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme des oberen Stratum corneums). Die Annäherung der Zellen erhöht den Grad an Kompaktheit der Lagen zur Oberfläche hin.

Unter methodischen Gesichtspunkten betrachtet fällt auf, dass starke Scherkräfte, wie sie beim Zerteilen auf das frische und elastische Gewebe mit einer Rasierklinge ausgeübt werden, die kompakte Schichtung aufbrechen können und nachfolgend diese Aufbrüche als Spalträume kryo-konserviert werden (Stern in Abbildung 3-8). Vergleichbare Kräfte traten während des mechanischen Abtrages des Stratum corneums auf, das anschließend zentrifugiert wurde, um für biochemische und rheologische Untersuchung verwendet zu werden (siehe Abschnitt Material 2.2).

In Experimenten, bei denen der Wassergehalt der Probe durch kontrollierte Gefrier-trocknung verringert wurde, zeichneten sich wasserhaltige Bereiche im Interzellularraum des Stratum corneums durch Schrumpfung von formunveränderten fetthaltigen oder chemisch vernetzten Bereichen ab. Durch dieses Verfahren differenzierte sich bei chemisch unbehandelten Hautproben der Interzellulärbereich des Stratum corneums: Während sich die Interzellularräume in den obersten 5 bis 6 Lagen einheitlich darstellten (offener weißer Pfeil in Abb. 3-8), und die Zellkörper kaum vom Interzellularraum zu unterscheiden waren, führte der induzierte Wasserentzug in den darunterliegenden Schichten zu interzellulären Spalträumen (geschlossener weißer Pfeil, Abb. 3-8). Von der Austrocknung unberührt blieben die in ihrer Form unveränderten Zellkörper (schwarze Pfeile in Abb. 3-8) und die desmosomalen Brücken.

Durch Gefriertrocknung konnte kein Unterschied in der Konsistenz zwischen den obersten Interzellularräumen und der Bedeckung der Hautoberfläche erzeugt werden. Diese Bedeckung stellt einen „Interzellularraum“ dar, der nach dem Abtrag der darüberliegenden Zelle (Desquamation) vor der Probenentnahme dem Meerwasser zugewandt war.

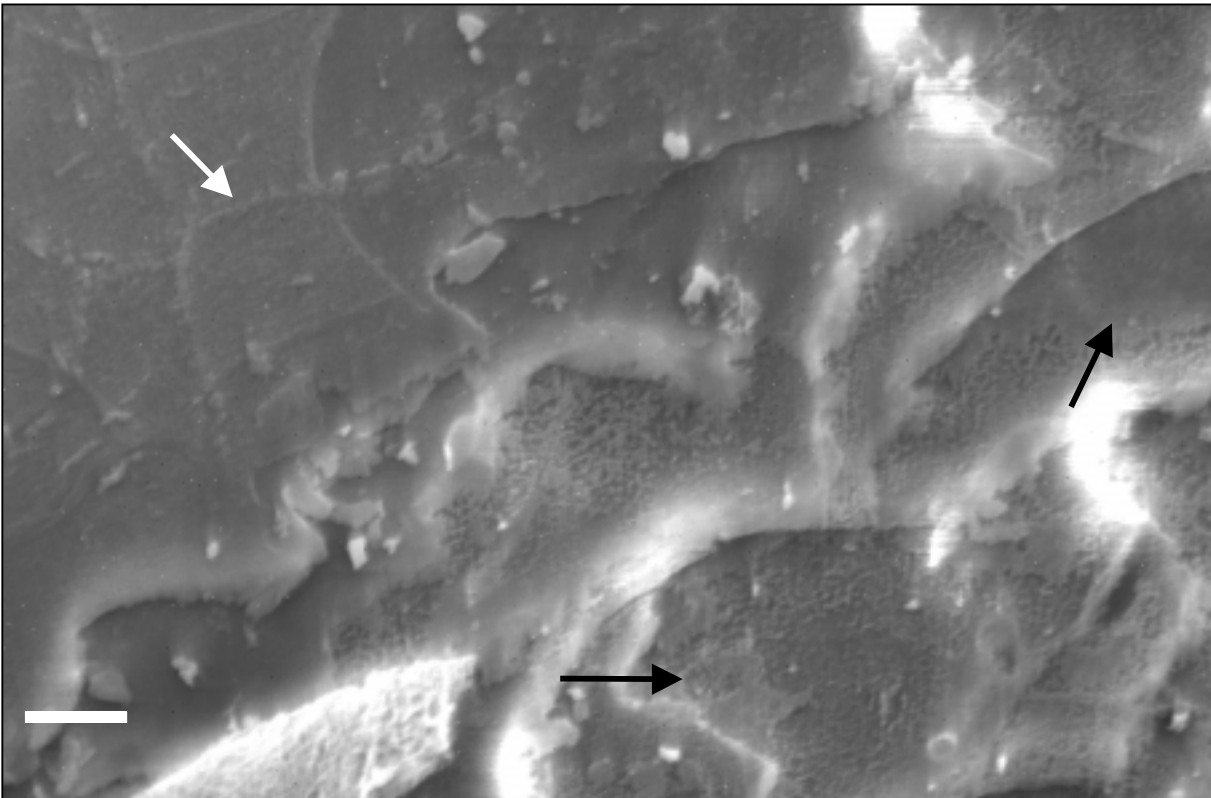


Abb. 3-7: Kryo-rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Hautoberfläche des Pilotwales (*Globicephala melas*) nach Gefrierbruch. Die Bruchrichtung verläuft von schräg unten zur Oberfläche hin. Ein Gel füllte den Interzellularraum (schwarzer Pfeil) zwischen den Zellen und den zur Wasseroberfläche gewandten Interzellularraum der Hautoberfläche aus (weißer Pfeil). Maßstab 10 μm .

Sowohl diesem Bereich als auch den fünf bis sechs darunterliegenden Interzellularräumen ließ sich durch längere Gefriertrocknung Wasser entziehen. Nach dieser Prozedur wurde an der dem Meerwasser zugewandten Zelloberfläche des Stratum

corneums, die zuvor laterale Rauigkeiten von unter $0,03 \mu\text{m}$ aufwies, das Netzwerk der Interzellularbrücken sichtbar. Die Strukturen dieser Brücken in Form eines Porenreliefs mit wabenförmigem Grundmuster hatten eine Tiefe von etwa $0,3 \mu\text{m}$ (siehe Abb. 3-9 und 3-10).

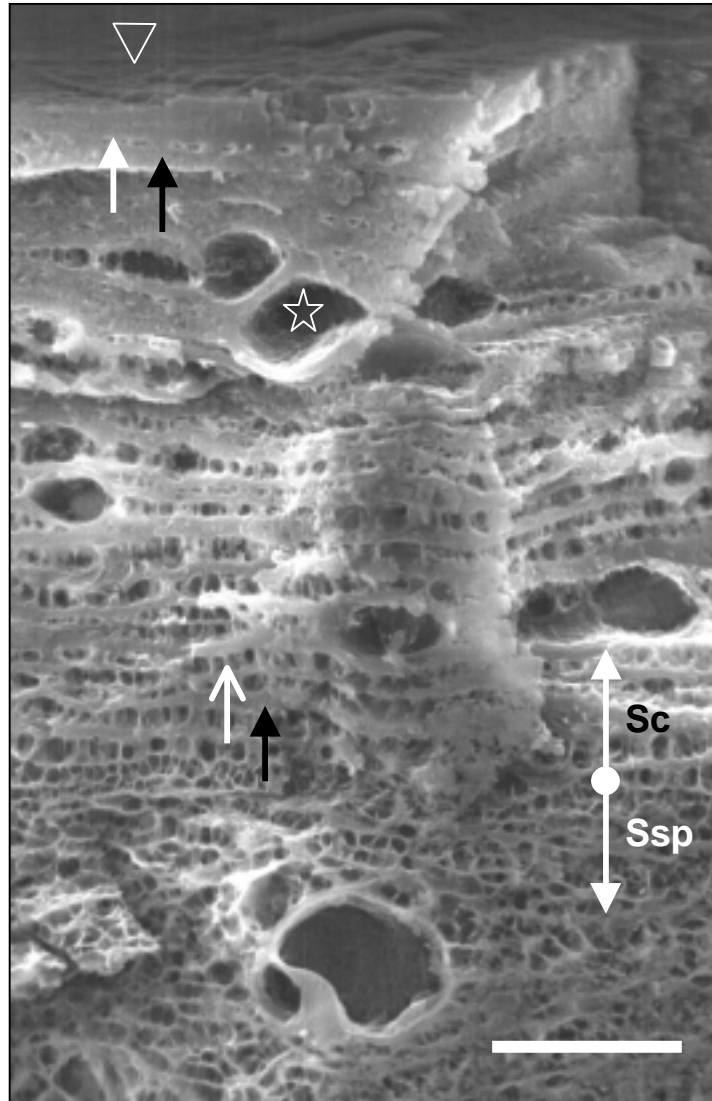


Abb. 3-8: Kryo-rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des unfixierten, längsgeschnittenen Stratum corneums (Sc) des Pilotwales, *Globicephala melas*, und des darunterliegenden Stratum spinosums (Ssp). Hautoberfläche (weißes Dreieck). Während der Verlagerung der Zellen (schwarze Pfeile) zur Oberfläche hin verkleinerten sich die mit Gel gefüllten Interzellularräume des Stratum corneums (vergleiche geschlossene und offene weiße Pfeile). Kryo-konservierte Spalträume (Stern), die während der Probenentnahme entstanden waren. Maßstab $10 \mu\text{m}$.

3.1.2 Rasterelektronenmikroskopische Ergebnisse zum Stratum corneum

Das oben beschriebene topologische Merkmal der Corneocyten in Form eines Porenreliefs wurde ebenso bei den fixierten Hautproben gefunden (Abb. 3-9). Diese Strukturen waren nicht durch Trypsin zu verdauen (Abb. 3-10). In Folge der enzymatischen Behandlung kam es häufig zur Ablösung der etwa 1 μm dicken Zellen an der Hautoberfläche (Abb. 3-10).

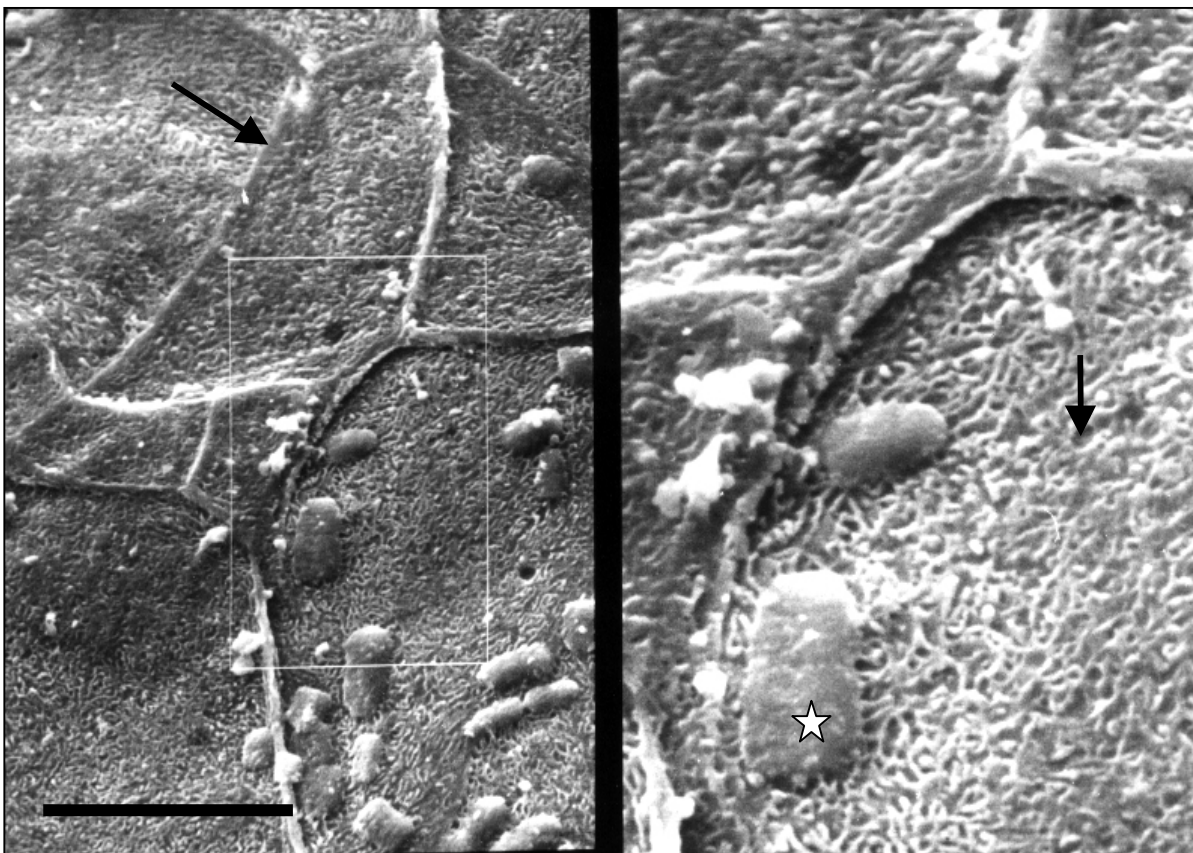


Abb. 3-9: Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der chemisch fixierten Haut des Pilotwales (*Globicephala melas*) zeigte das Porenrelief der Corneocyten, das im nativen Zustand mit einem Gel gefüllt ist (vgl. Abb. 3-5 und 3-6). Durch präparationsbedingte Salzeinlagerung erschienen die Zellgrenzen verdickt (schwarzer Pfeil). Auf der rechten Seite ist der umrandete Detailausschnitt der linken Seite zu sehen. Poren (weißer Pfeil). Gepresste, abgeplattete Melanosomen (Stern). Maßstab 20 μm .

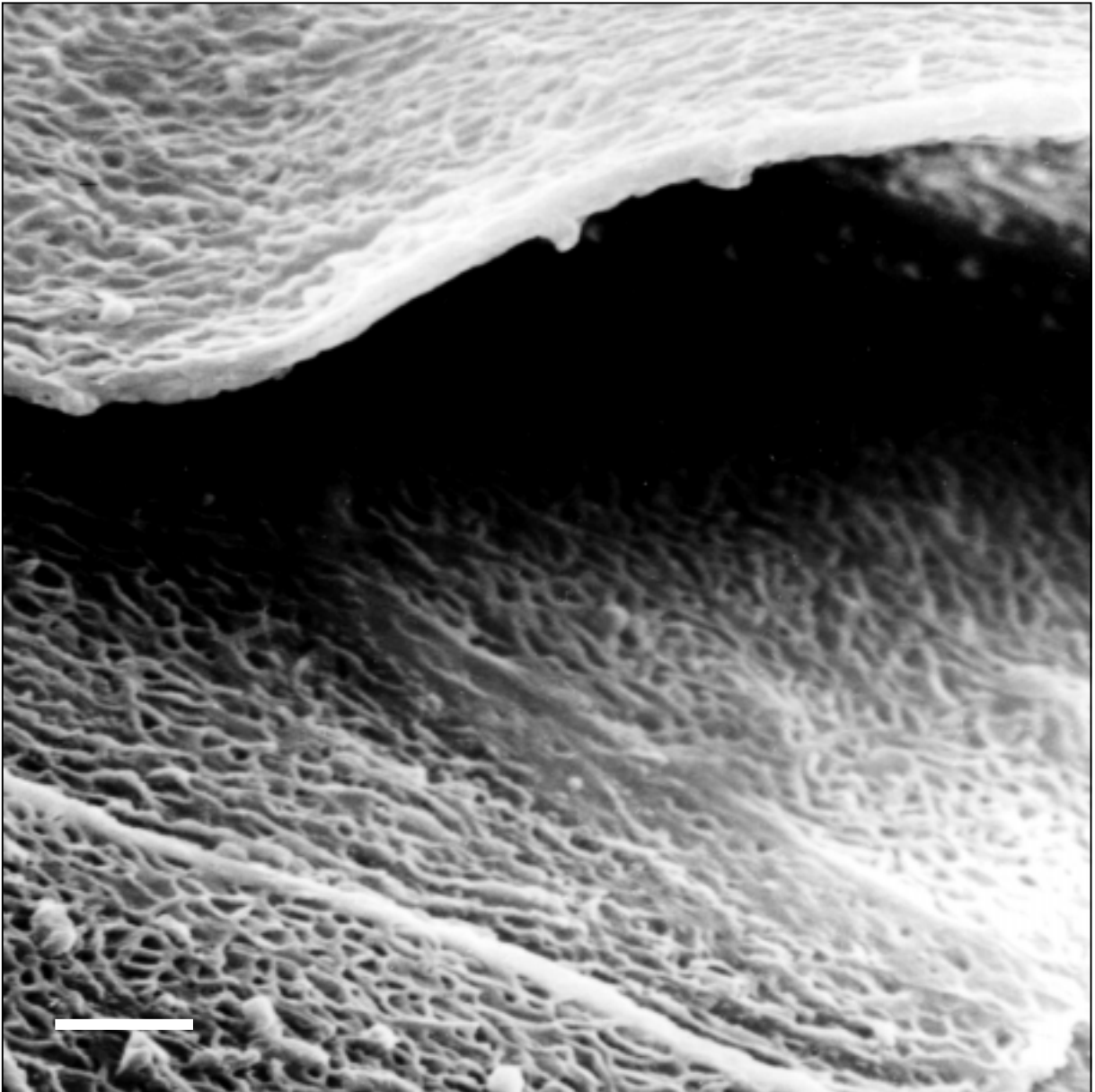


Abb. 3-10: Ebenso wie bei fixierten Hautproben (Abb. 3-9) zeigten die trypsinisierten Corneocyten an der Hautoberfläche des Pilotwales (*Globicephala melas*) eine nanoporige Strukturierung an der Hautoberfläche (kontrastierte Probe, kryorasterelektronenmikroskopische Aufnahme). Durch die enzymatische Behandlung kam es verstärkt zur Abschuppung von Zellen (siehe oberer Bildanteil). Maßstab 1 μm .

Im Vergleich zur Strukturierung eines Sterilfilters (Abb. 3-11) aus Celluloseacetat-Nanopartikeln mit einem Porenausschluß von $0,2\ \mu\text{m}$ ist die Strukturierung der Zelloberfläche weniger rau (vergleiche Abb. 3-10 und 3-11).

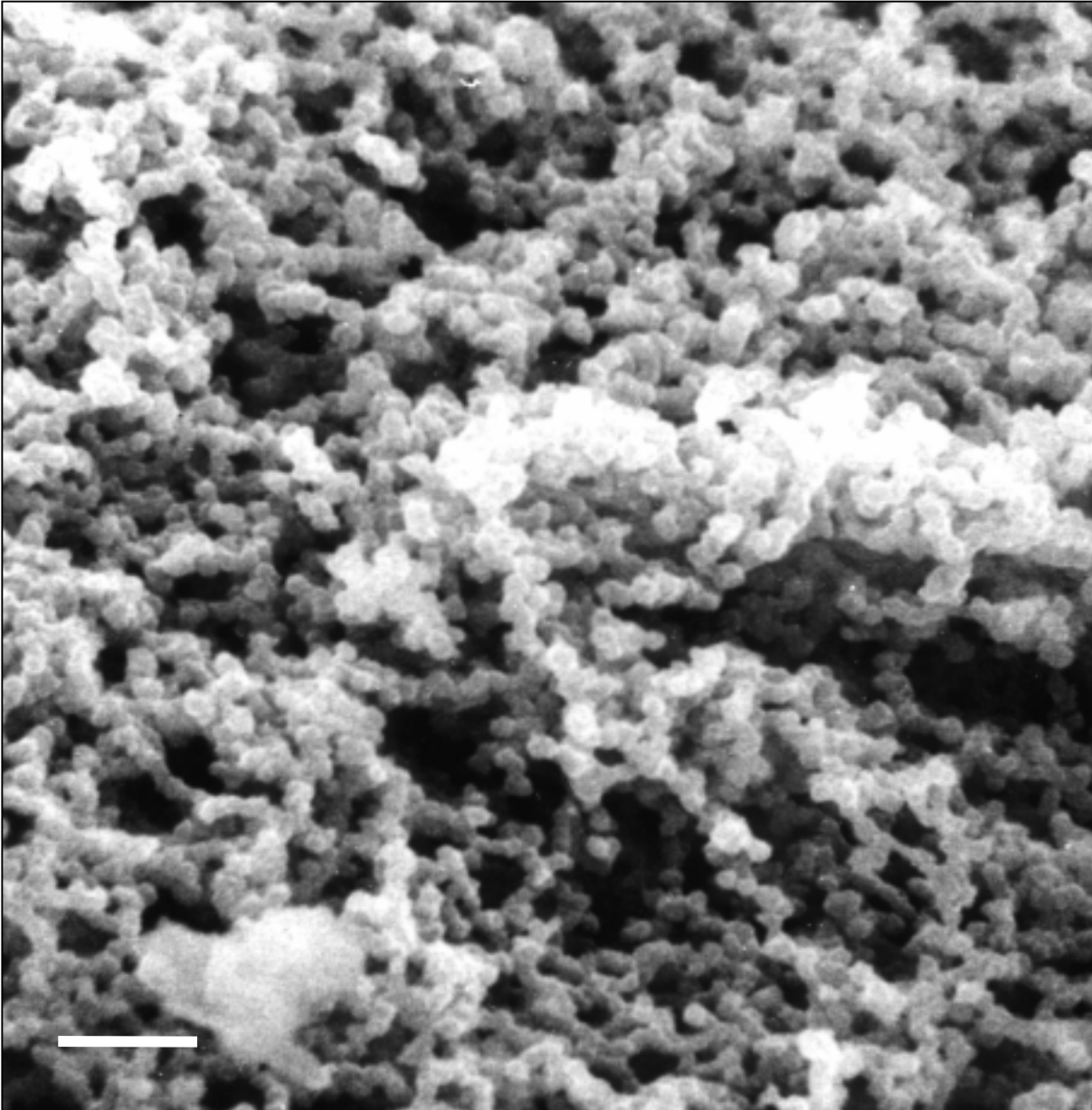


Abb. 3-11: Strukturierung eines Sterilfilters aus Celluloseacetat-Nanopartikeln mit einer Ausschlußgröße von $0,2\ \mu\text{m}$ (Sartorius, SM 11307). Maßstab $1\ \mu\text{m}$.

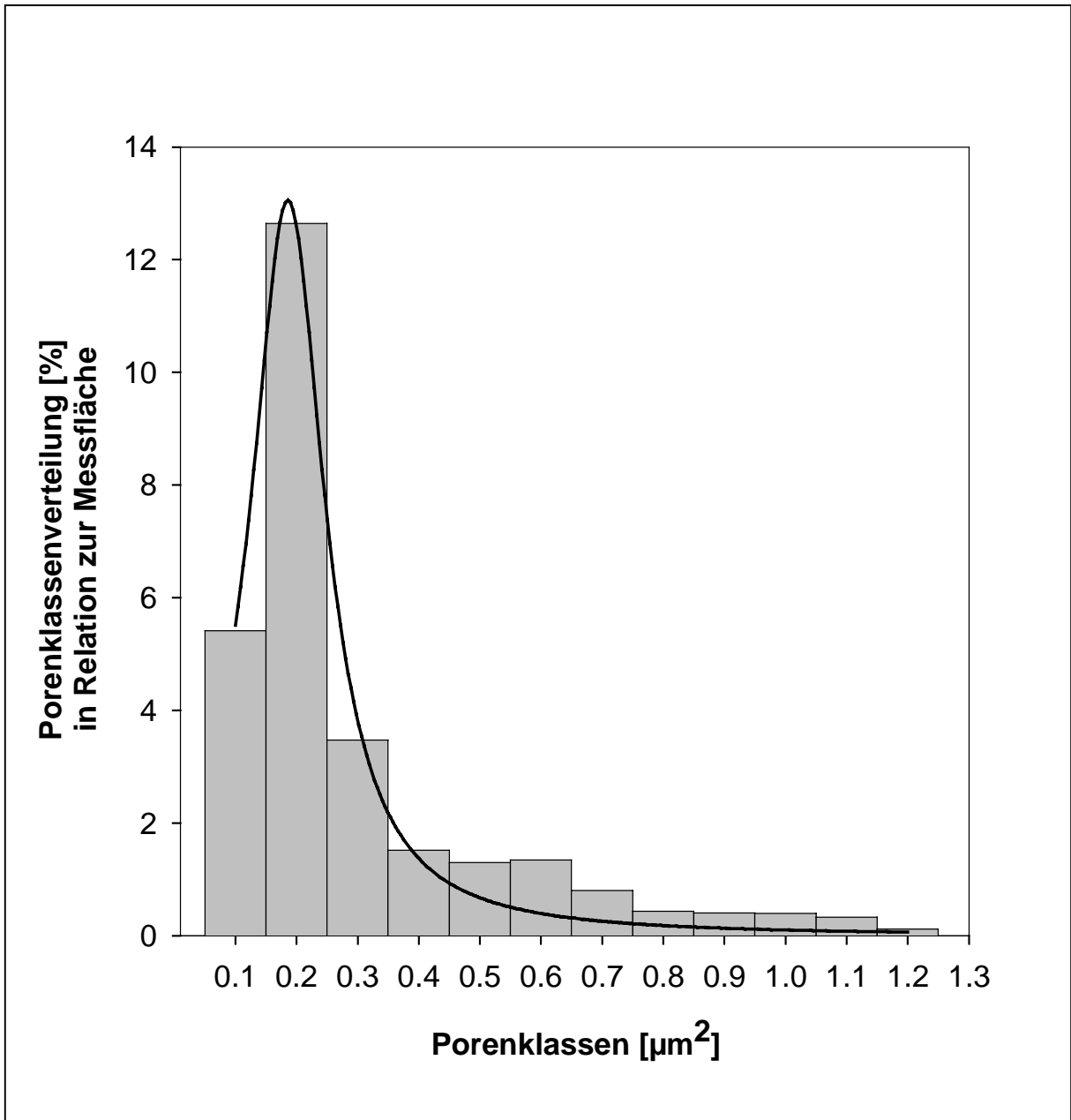


Abb. 3-12: Porengrößenverteilung nach isometrischer Maßstabskorrektur (10%) des Porenreliefs an der Hautoberfläche des Pilowales (*Globicephala melas*). 90% aller Poren fallen in das Porengrößenintervall zwischen 0,1 und 0,2 µm². Die Poren machten 20% der untersuchten Fläche aus.

Die morphometrische Analyse der Porengrößen (Abb. 3-12) ergab ein Verteilung, bei der sich die Poren auf Klassen zwischen von 0,1 und 1,2 µm² verteilen. 90 % aller

Poren gehören der Porenklasse von 0,1 bis 0,2 μm^2 an. Die Verteilung der Porenklassen ließ sich mit einer Lorentz-Dichte-Verteilung (Regressionskoeffizient $r^2 = 0,986$, Standardfehler der Abschätzung 0,475) beschreiben. Die Porenfläche betrug ungefähr 20 % der untersuchten Gesamtfläche.

3.1.3 Transmissionselektronenmikroskopische Ergebnisse zum Stratum corneum

Die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung des chemisch fixierten Stratum corneums zeigte, dass von den Zellen der Übergangszone Interzellulärsubstanz in den Zellzwischenraum abgegeben wurde (Abb. 3-13 und 3-14). Dieses homogene Material veränderte seine Konsistenz mit zunehmendem Abstand von der Übergangszone zur Hautoberfläche hin (vgl. Abb. 3-14 mit Abb. 3-15). In den oberen Interzellularräumen ähnelte die Konsistenz einem phasenseparierten wasserhaltigen Proteinnetzwerk (vgl. Abb. 3-19 mit Abb. 3-21). Es gab keine Filament-ähnlichen Strukturen im Interzellularraum des Stratum corneums.

Es fiel auf, dass in der obersten Lage des Stratum spinosum intrazelluläre Filamente (iF in Abb. 3-13, 3-14) im desmosomalen Randbereich der Zelle neben homogenen und voluminöseren Filamentaggregaten zu finden waren. Diese homogenen Aggregate ähnelten in ihrer Form den homogenen Zellen des Stratum corneums. Im Zusammenhang mit der Dickenreduktion der Zellen des Stratum spinosums im Übergang zum Stratum spinosum traten Unterschiede in der Kompaktheit zwischen Stratum spinosum (locker) und Stratum corneum (dicht) deutlich hervor. Im besonderen wurde auffällig, dass Einschlüsse, die im Stratum corneum intrazellulär (vesikelförmige Einschlüsse, V, in Abb. 3-15) zu finden waren, Ähnlichkeit mit der Substanz des Interzellularraumes (I) zeigten.

Wie aus der Arbeit von PFEIFFER und JONES (1993) bekannt bleiben in den durch Detergentien entfetteten Hautzellen leere vakuoläre ehemals fetthaltige Bereiche erhalten.

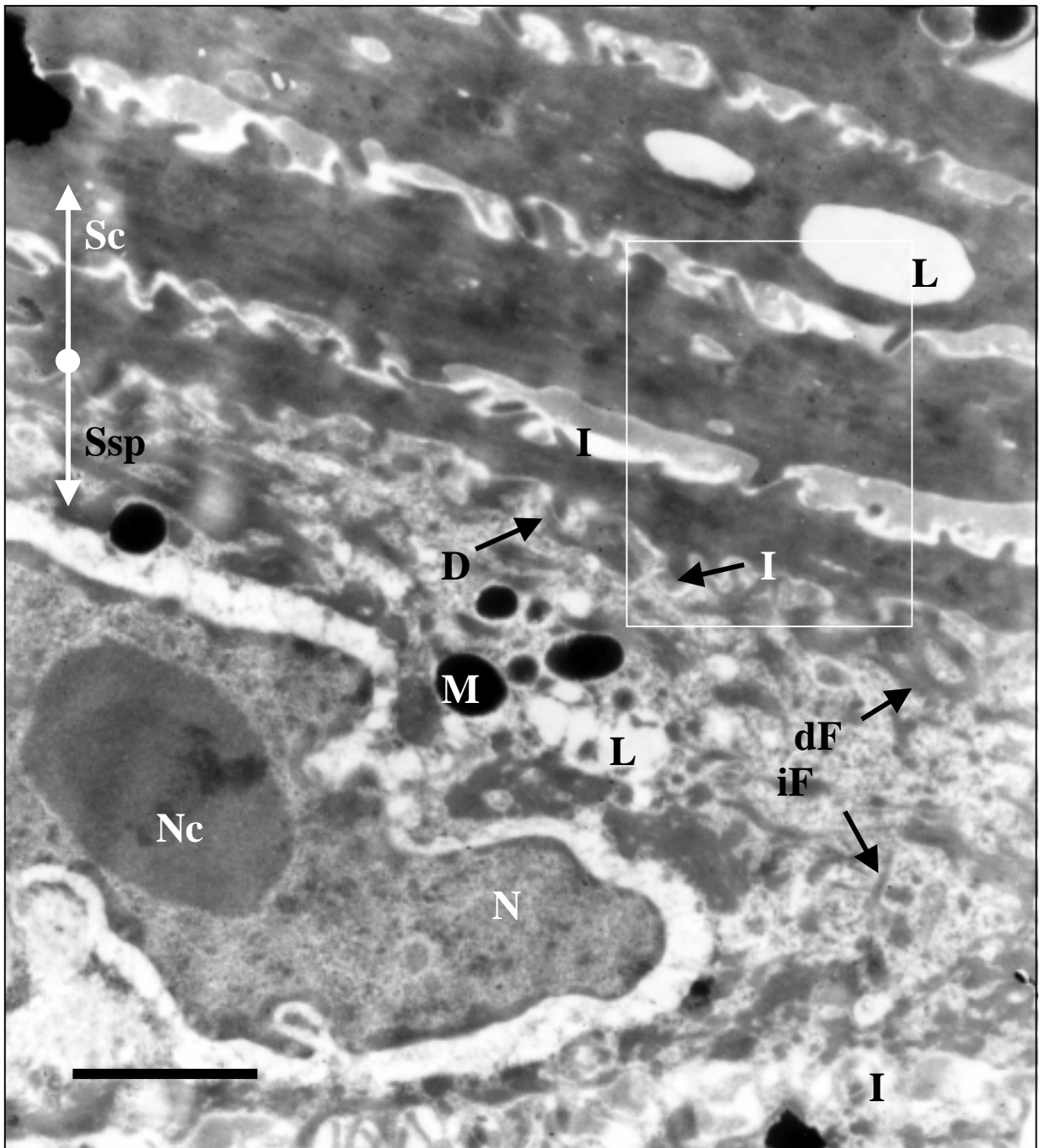


Abb. 3-13: Transmissionselektronenmikroskopischer Längsschnitt der Übergangszone zwischen Stratum spinosum und Stratum corneum der Epidermis des Pilotwales, *Globicephala melas*. Die Zellen des Stratum corneums (Sc) erscheinen kompakt gegenüber der Zelle des Stratum spinosums (Ssp). N Nucleus, Nc Nucleolus, entleerte Lipid-Vakuolen, D Desmosomen, M Melanin-Granula, I Interzellularraum, iF intakte Filamente, dF degenerierte Filamente. Maßstab 1,5 μ m.

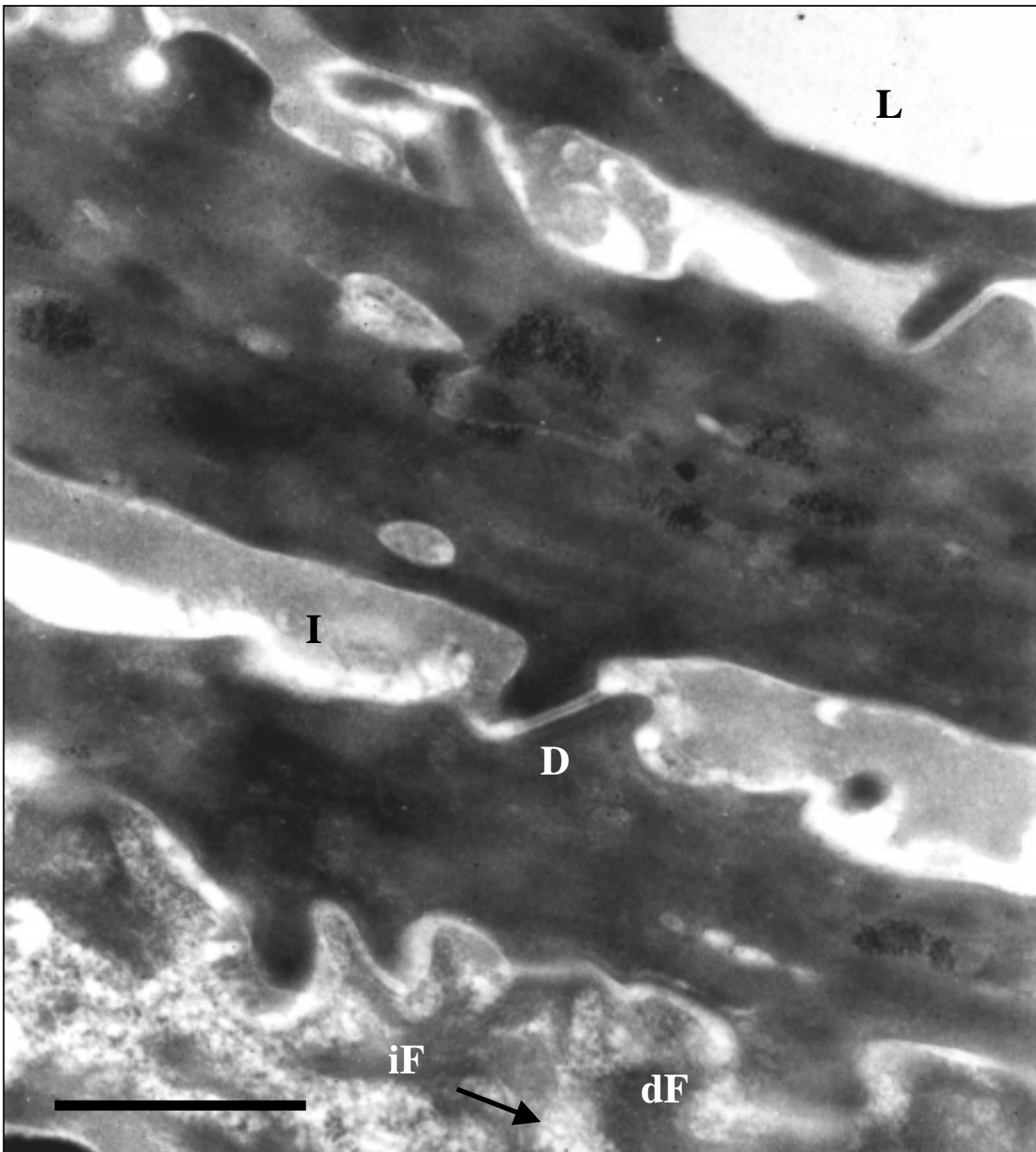


Abb. 3-14: Transmissionselektronenmikroskopischer Längsschnitt (Detail aus Abb. 3-13) der Übergangszone zwischen Stratum spinosum (strukturiert) und Stratum corneum (homogen) der Epidermis des Pilotwales, *Globicephala melas*. D Desmosomen, I Interzellularräume, iF intakte Filamente der Zelle des Stratum spinosum, dF degenerierte Filamente. Maßstab 0,75 μm .

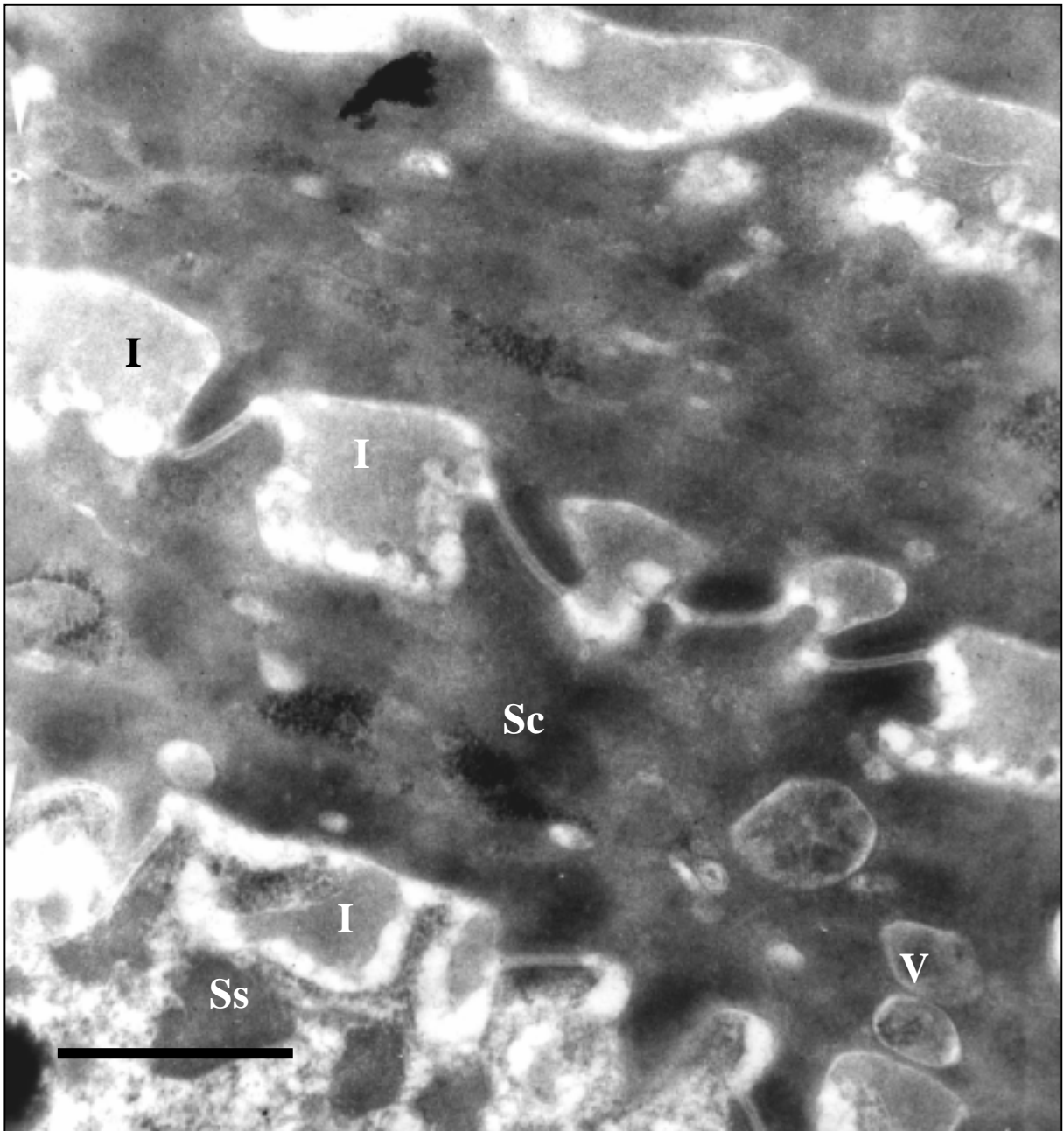


Abb. 3-15: Transmissionselektronenmikroskopischer Längsschnitt der Übergangszone zwischen Stratum spinosum (Ss) und Stratum corneum (Sc) der Epidermis des Pilotwales, *Globicephala melas*. Intrazelluläre vesikelförmige Einschlüsse (V), die vermutlich unter Druck aus der homogenen intrazellulären Matrix in den Interzellularraum (I) gepreßt werden, zeigten Ähnlichkeiten mit der Substanz des Interzellularraum. Maßstab 0,75 µm.

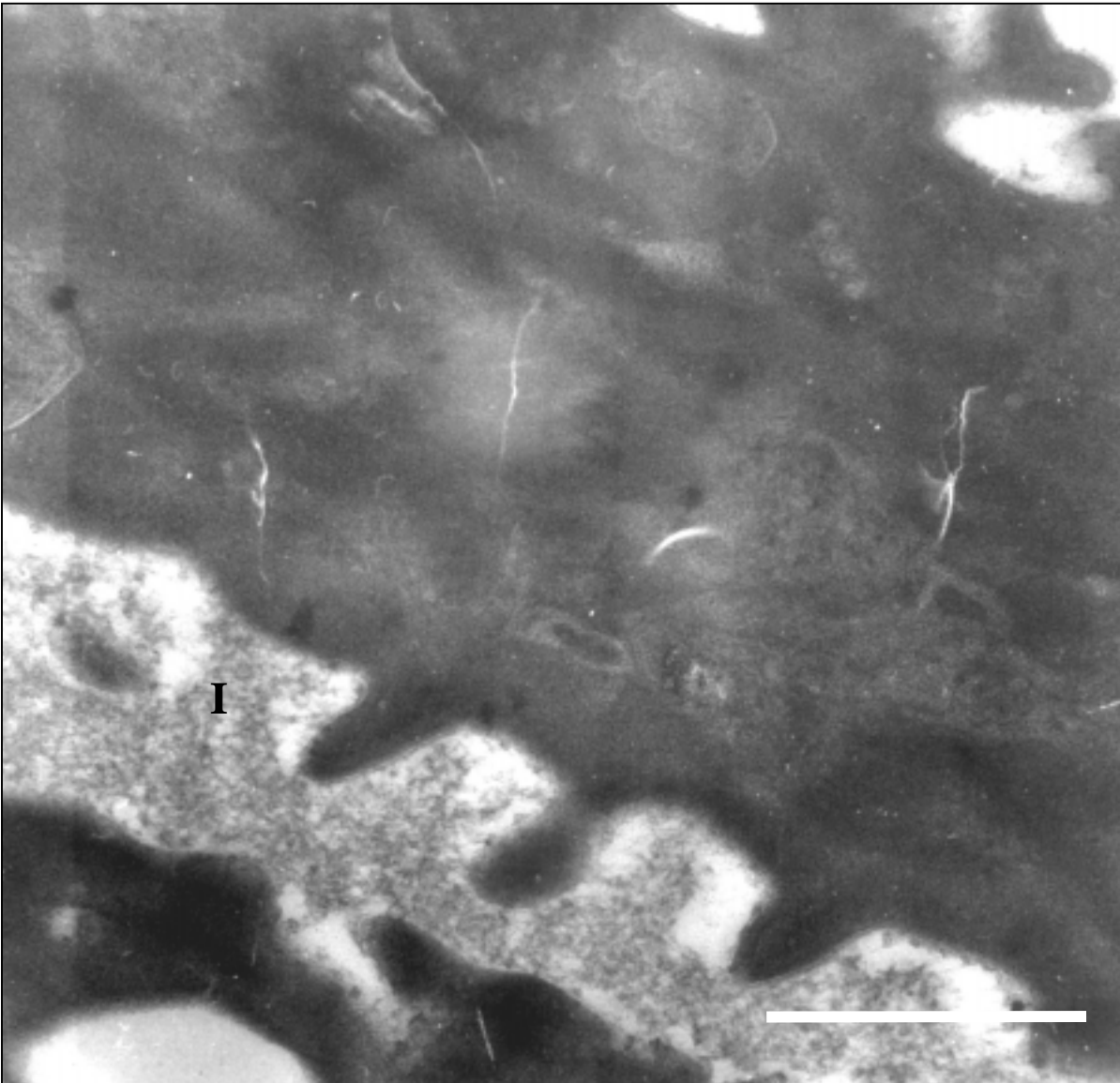


Abb. 3-16: Transmissionselektronenmikroskopischer Längsschnitt des oberen Stratum corneums des Pilotwales (*Globicephala melas*). Der Interzellularraum (I) war im Gegensatz zu den Interzellularräumen des unteren Stratum corneums (siehe Abb. 3-15) mit einer polymorphen Matrix gefüllt. Maßstab 0,4 μ m.

3.1.4 Histochemische Ergebnisse zum Stratum corneum

Nach histochemischer Färbung mit Alcianblau wurden bei verschiedenen fixierten und unfixierten Hautproben saure Glykokonjugate nachgewiesen (Abb. 3-17). Diese wurden vor allem intrazellulär und interzellulär in der Übergangszone sowie interzellulär im reifenden Stratum corneum und an der Hautoberfläche gefunden (Pfeile in Abb. 3-17).

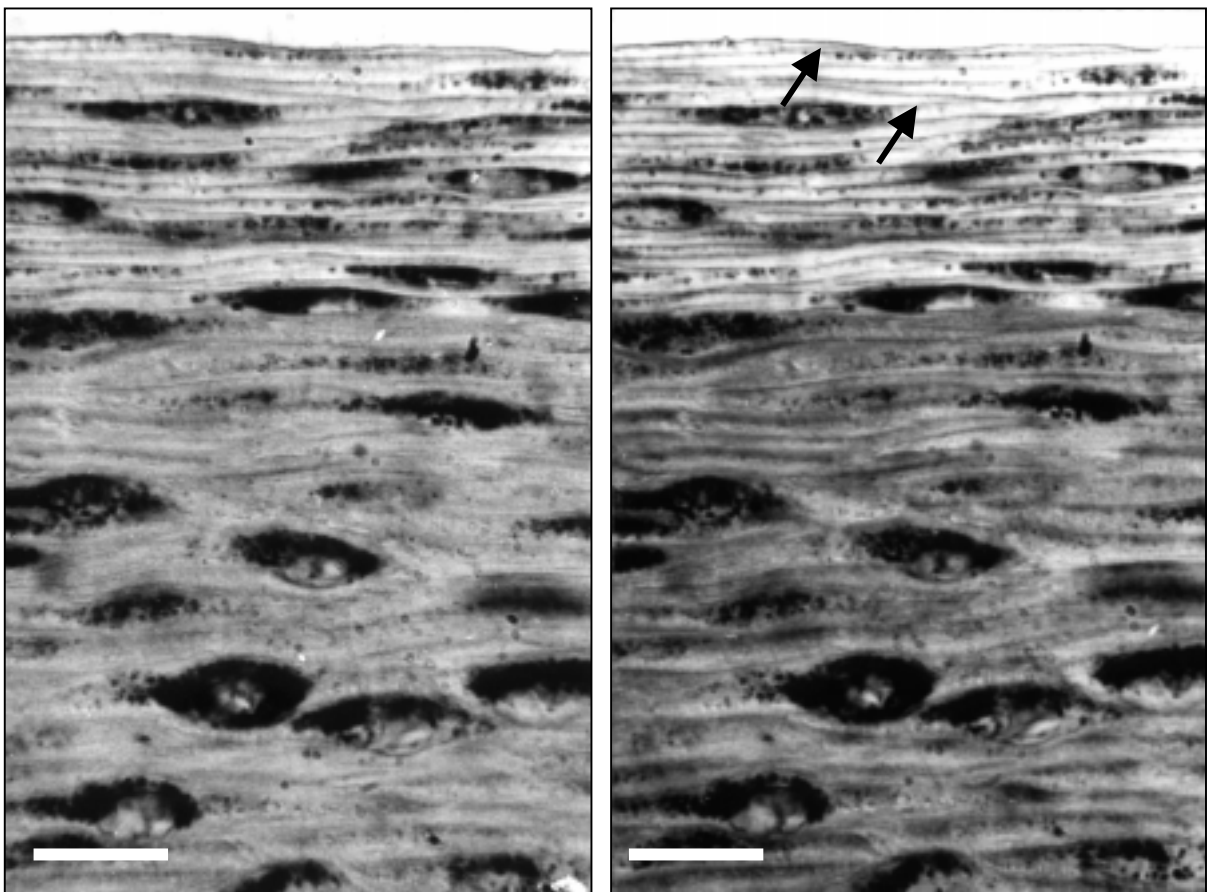


Abb. 3-17: Histochemische Darstellung saurer Glykokonjugate in der oberen Epidermis des Pilotwales, *Globicephala melas* (linke Abbildung Durchlicht, rechte Abbildung gleicher Ausschnitt im Absorptionsmaximum $\lambda = 595$ nm von Alcianblau). Die Glykokonjugate akkumulierten vorzugsweise interzellulär (Pfeil). Der intrazelluläre Anteil saurer Glykokonjugate des Stratum corneums (hell) war gegenüber dem Stratum spinosum (dunkel) reduziert. Maßstab 50 μ m.

Die Bindung des Thiol-spezifischen Fluoreszenz-Farbstoffes Eosin-5-maleimid war ungleichmäßig in der Epidermis des Pilotwales verteilt (Abb. 3-18). Die Färbung zeigte die höchste Konzentration freier Thiol-Gruppen in der Übergangszone. Die Konzentration freier Thiol-Gruppen war intra- und interzellulär im Stratum corneum rückläufig und erfolgte im Stratum spinosum deutlich Filament-gebunden, im Falle des Stratum corneums Filamentfragment-gebunden.

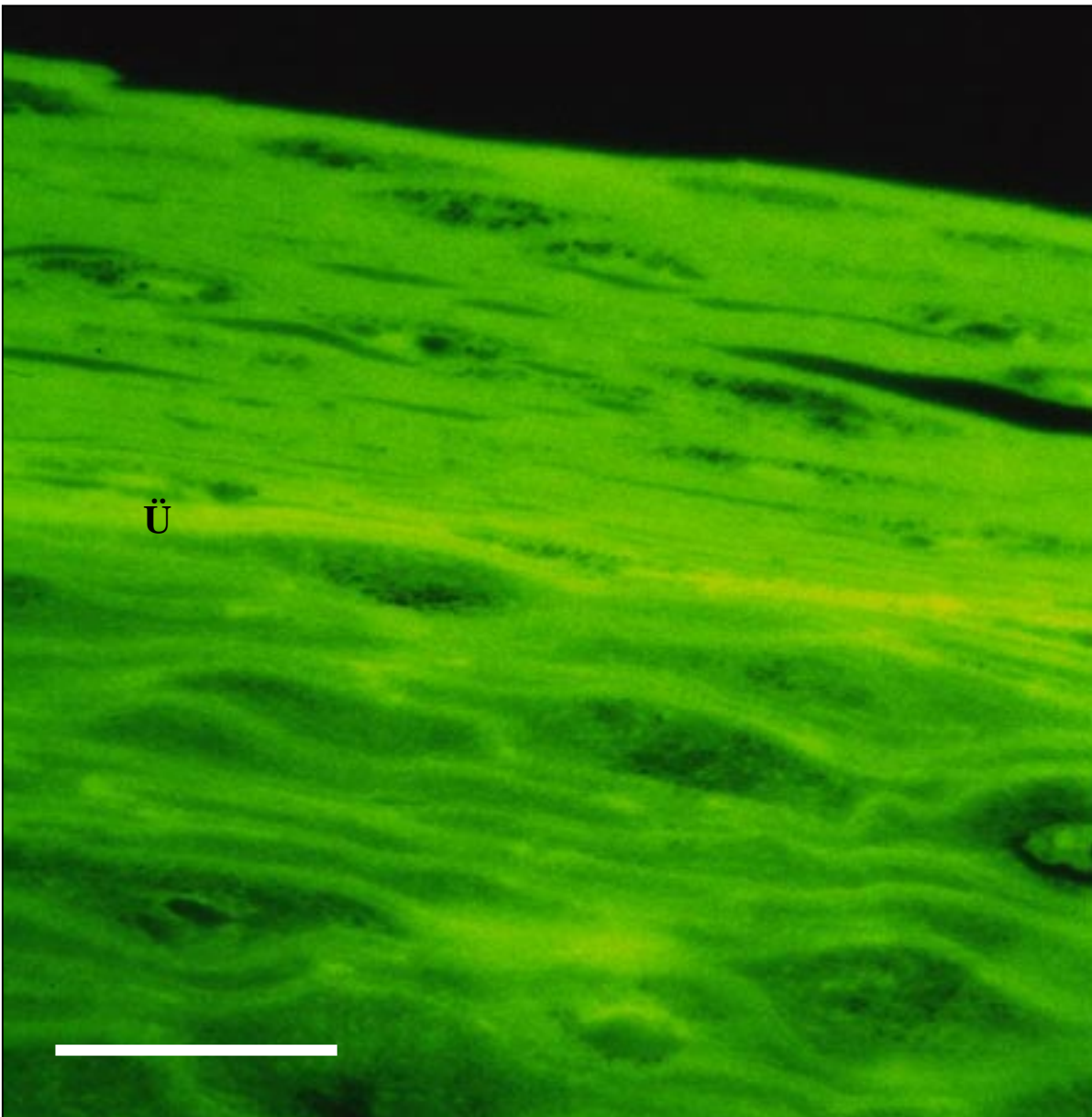


Abb. 3-18: Thiol-Gruppenverteilung in der oberen Epidermis des Pilotwales (*Globicephala melas*). Übergangszone (Ü). Maßstab 50 μm .

3.2 Elektronenoptische Ergebnisse zum Gel

3.2.1 Transmissionselektronenmikroskopische Ergebnisse zum Gel

Nach einer Polymerisationszeit von 4 Stunden wurde die Morphologie des unverdünnten, Glutaraldehyd-fixierten und post-osmierten Gels untersucht (Abb. 3-19). Die Fixierungsmittel stabilisierten Membran-umschlossene osmophile Lipidtröpfchen (Pfeile in Abb. 3-19). Diese 0,1 bis 1 μm großen Tröpfchen waren von einem vielgestaltigen fragmentierten Netzwerk Aldehyd-fixierter Proteine umgeben. Die Fragmente zeigten keinen filamentartigen Aufbau. Die Form der fixierten Proteine zeigte auffällige Ähnlichkeiten mit der fixierten Interzellulärsubstanz in den oberen 5 bis 6 Schichten des Stratum corneums des Pilotwales (Abb. 3-16). Die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung ergab, dass das Gel aus drei Phasen (Wasser sowie Proteinen und Lipiden) bestand.

3.2.2 Kryo-rasterelektronenmikroskopische Ergebnisse zum Gel

Das unfixierte Gel wurde kurz nach der Zentrifugation und nach einer Polymerisationszeit von vier Stunden kryo-rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Nach Gefrierätzung entwickelten sich tiefe Spalten als typisches Eigenschaftsbild in den beiden, unterschiedlich lang gereiften Gelen (Abb. 3-20). Demgegenüber unterschieden sich die beiden Probenarten nach vorangegangener Gefrierätzung im Hinblick auf ihre oberflächliche Strukturierung (Abb. 3-21). In dem polymerisierten Gel erzeugte die Gefrierätzung im Gegensatz zu dem nicht auspolymerisierten Material deutlich schärfere und ausgeprägtere morphologische Veränderungen. Die Konsistenz des polymerisierten Gels (Abb. 3-21) ähnelte dem phasenseparierten, wasserhaltigen Proteinnetzwerk der Delfinhautoberfläche (vgl. Abb. 3-4), dem chemisch fixierten Gel im Interzellulärraum des Stratum corneums (Abb. 3-16) sowie dem chemisch fixierten zellfreien Gel (Abb. 3-19).

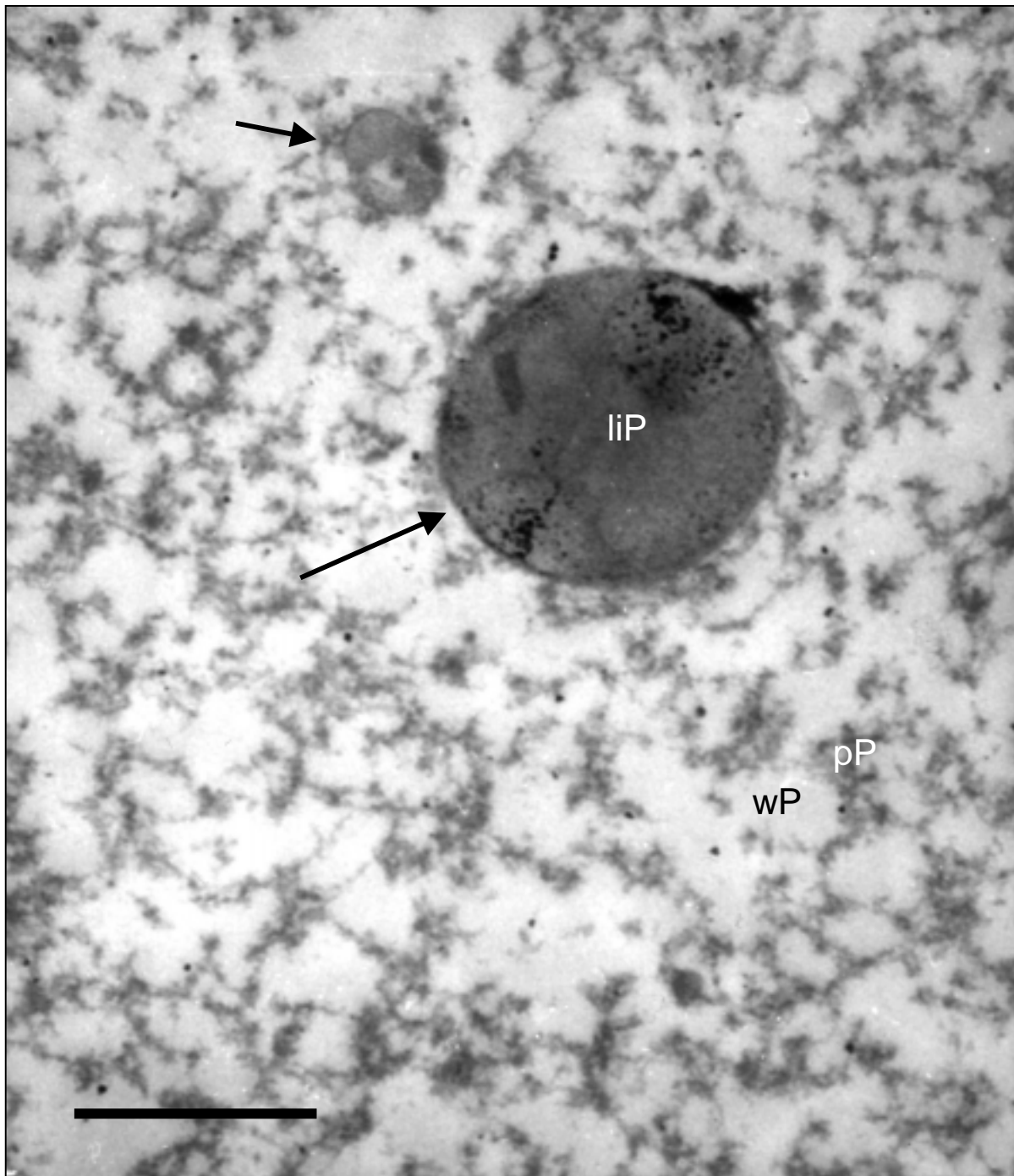


Abb. 3-19: Transmissionselektronenmikroskopische Ansicht des unverdünnten, polymerisierten Gels (fixiert in 2 % Glutaraldehyd, 2 % Osmiumsäure). Innerhalb des Gels umschlossen Membranen (Pfeile) Lipidtröpfchen (lipide Phase, liP), die von einem polymorphen Netzwerk chemisch vernetzter Proteinkomponenten (pP) umgeben waren. Der Zwischenraum des Netzwerkes war mit einer wasserhaltigen Phase (wP) ausgefüllt. Maßstab 0,5 μm .



Abb. 3–20: Kryo-rasterelektronenmikroskopische Darstellung des unpolymersierten Gels aus dem zentrifugierten Stratum corneum des Pilotwales, *Globicephala melas*. Nach milder Gefrierätzung entwickelten sich tiefe Spalten in dem Material. Maßstab 100 μm .

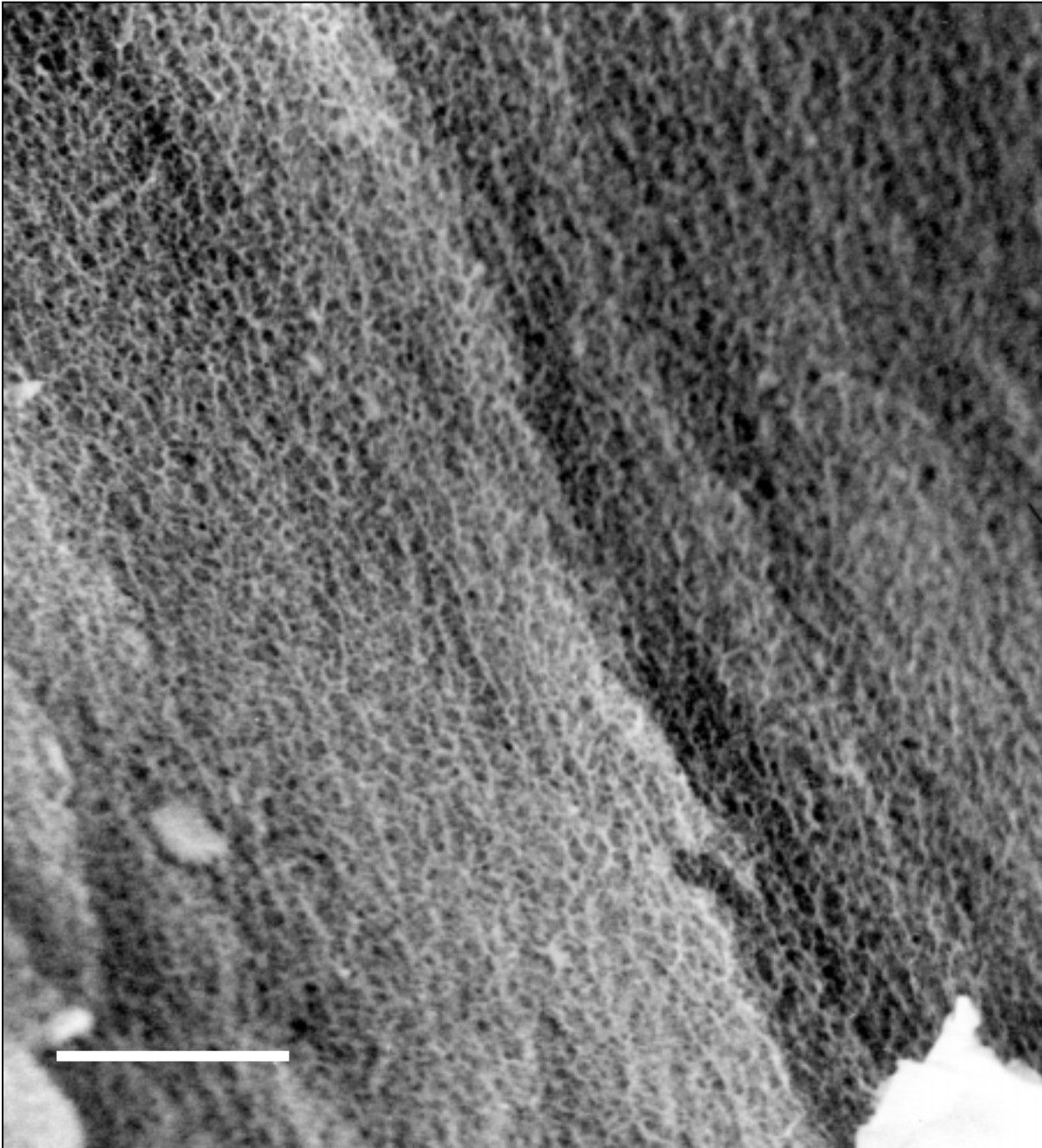


Abb. 3-21: Kryo-rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des gefriergeätzten Gels aus dem zentrifugierten Stratum corneum des Pilotwales, *Globicephala melas*, nach vierstündiger Polymerisationszeit. Im Gegensatz zu dem unpolymerisierten Material (vgl. Abb. 3-20) ergab die Gefrierätzung bei dem polymerisierten Material eine stärkere und schärfere Ausbildung einer feinstrukturierten Oberfläche. Die Feinstrukturierung der Oberfläche ähnelte chemisch fixierten Präparaten (vgl. Abb. 3-16 und 3-19). Maßstab 10 μm .

3.3 Vielwinkel-Laserstreulicht-photometrische Untersuchung des Gels

3.3.1 Untersuchung zur Dispersität des Gels

Nach einer säulenchromatographischen Auftrennung des zentrifugierten Fluids aus dem Stratum corneums des Pilotwales, *Globicephala melas*, wurden sieben Fraktionen des Zentrifugates separiert (Abb. 3-22). Die Konzentrationen der Fraktionen wurden über ihr UV Signal bei 280 nm sowie das Absorptionssignal des Refraktionsindex-Detektors aufgezeichnet. Absorptionen bei 280 nm zeigten die Anwesenheit der proteinogenen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin. Der Refraktionsindex-Detektor registrierte die Gesamtkonzentration von Stoffen (Proteine, Zucker, Fette). Aus dem Vergleich zwischen dem UV-Signal und dem Signal des Refraktionsindex-Detektors geht hervor, dass die Proteinkonzentration etwa 10-fach niedriger als die gesamte detektierte Masse ausfiel (Abb. 3-22). Eine Ausnahme bildeten Fraktionen von 4-6 kD, die bei 12 ml eluierten. In diesen Fraktionen überstieg das UV Signal das Signal des Brechungsindex-Detektors, was auf eine zusätzliche Absorption ultravioletten Lichtes oder die Anwesenheit von autofluoreszenten Komponenten hindeutet. Da durch diesen Vergleich festgestellt wurde, dass das Zentrifugat des Stratum corneums Substanzen mit unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten enthielt, wurde das Signal des Refraktionsindex-Detektors zur Konzentrationsbestimmung verwendet (siehe 2.7.1).

Aus der Auswertung der Streulichtintensität der sieben separierten Fraktionen geht hervor, dass sehr große Aggregate (bei 5-6 ml) zu Beginn der Elution und sehr kleine Bestandteile am Ende der Trennung separiert wurden. Diese großen Aggregate erreichten Molmassen von $10^7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Die Molmassen der kleinsten trennbaren Fraktionen lag unter $10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Eine Analyse des Gyrationradius zeigt, dass entgegen den Erwartungen keine Abnahme der Radien mit abnehmender Molmasse zu verzeichnen war. Da durch dieses Ergebnis, das als kontinuierlicher Beipass von Aggregaten während der Trennung gedeutet wurde, eine Analyse der Verteilung der Molmassen über das gesamte Chromatogramm unmöglich war, wurden zur Berechnung der absoluten Molmassen die Peakspitzen der Fraktionen verwendet. In diesen Spitzen sind die Molmasse und die Konzentration der koeluiierenden Aggregate ein

Hintergrundsignal und gegenüber der hohen Konzentration der zum Peak führenden Komponenten zu vernachlässigen.

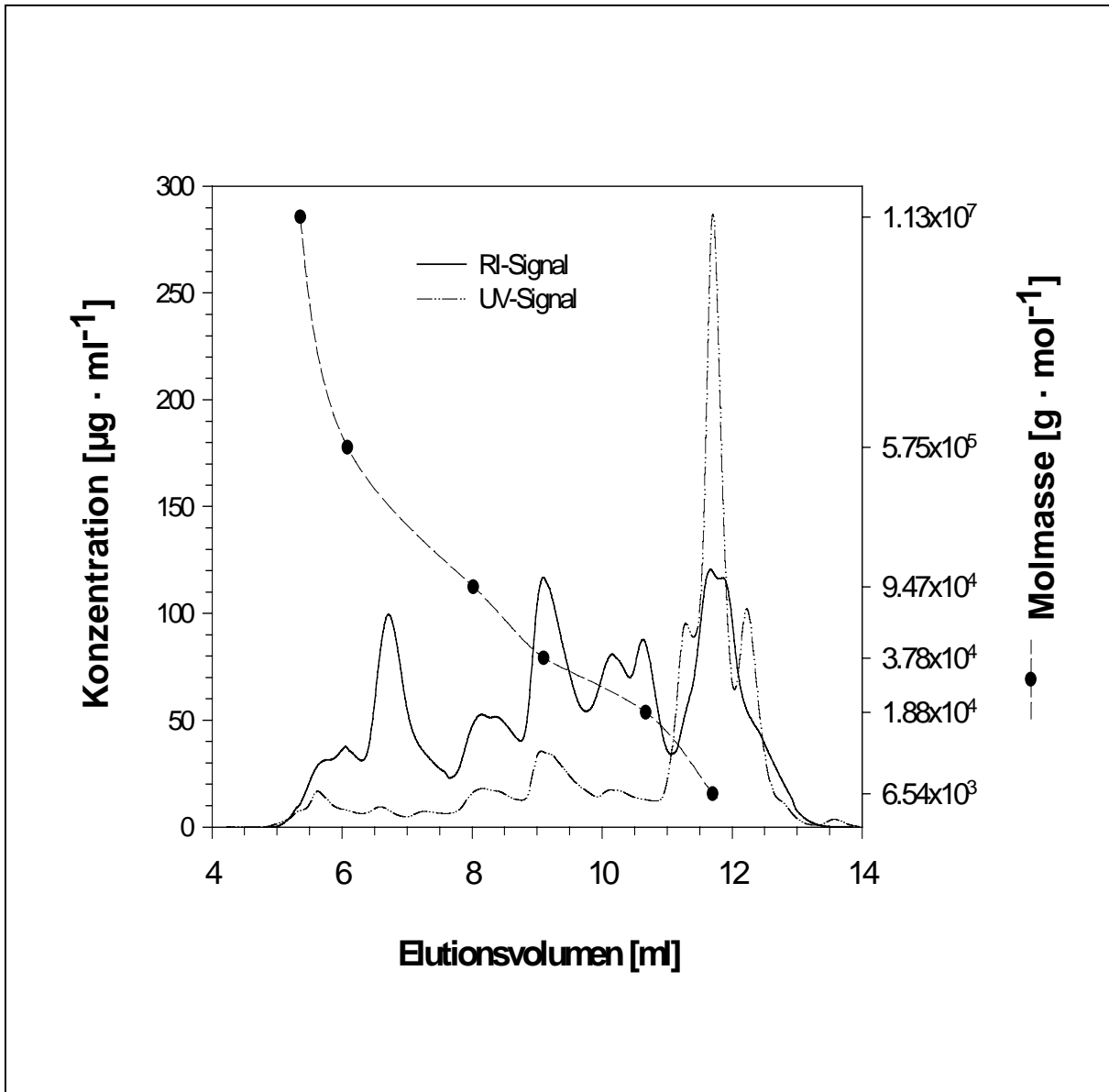


Abb. 3-22: Gelpermeationschromatographische Auftrennung des unpolymerisierten Fluids (auf 1:10 mit isotonischer NaCl-Lösung verdünnt) aus dem zentrifugierten Stratum corneum des Pilotwales (*Globicephala melas*). Die Gesamtkonzentration der aufgetrennten Substanzen (RI-Signal) fiel um den Faktor 10 höher aus als die detektierte Proteinkonzentration (UV-Signal). Eine Ausnahme bildete eine Fraktion, die um 12 ml eluierte.

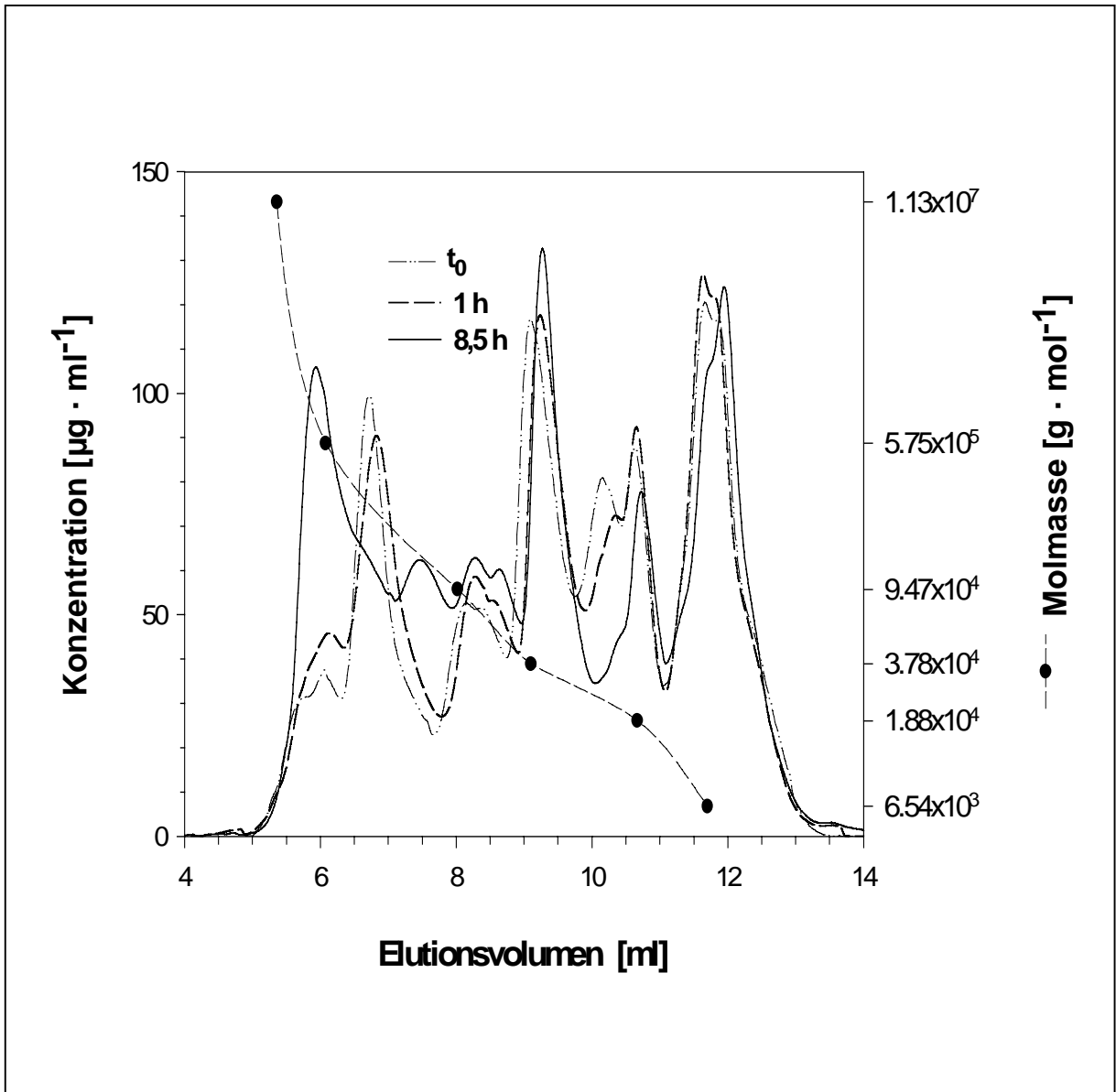


Abb. 3-23: Gelpermeationschromatographische Auftrennung des Fluids (auf 1:10 mit isotonischer NaCl-Lösung verdünnt) aus dem zentrifugierten Stratum corneum des Pilotwales (*Globicephala melas*) zu drei unterschiedlichen Zeiten nach der Zentrifugation. Die Peakhöhe und Peaklage (RI-Signal) schwankt mit der Zeit mit deutlicher Tendenz zur Molmassenzunahme. Während die Fraktion um 20-30 kD mit der Zeit abnahm, stieg die Konzentration der korrespondierenden Massenvielfachen an.

Es wurden verschieden alte Stadien derselben Probe untersucht (Abb. 3-23). Dabei zeigte sich eine starke Veränderung in den Signalen des Refraktionsindex-Detektors

mit einer Tendenz zum Anstieg der Molmassen. Innerhalb einer Stunde nach Verdünnung verkleinerte sich der Peak um 20-30 kD (bei 10,1 ml) bis er nach 8,5 Stunden auf das Niveau des Hintergrundsignals abfiel. In der gleichen Zeit vergrößerte sich der Peak der Molmassen zwischen 50 - 70 kD (bei 7,5 - 8,5 ml) und 500 - 1000 kD (bei 5,5 - 6 ml). Während der Peak um 7,0 ml bis auf das Hintergrundniveau zurückging, entstand nach 8,5 Stunden eine neue Fraktion mit 90 - 120 kD (bei 7,3 ml). Der Anstieg der Molmassen von 50 - 70 kD und 90 - 120 kD entsprach einer Vervielfachung der Fraktion von 20 - 30 kD, die nach 8,5 Stunden im Bereich des Hintergrundsignals lag.

3.3.2 Untersuchungen zur Aggregationskinetik des Gels

Ebenso wie bei der Untersuchung von Verdünnungen von 1:10 wurden bei der Untersuchung von Verdünnungen von 1:500 Veränderungen in der Verteilung der Molmassen mit der Zeit sichtbar (Abb. 3-24). Trotz der starken Verdünnung der zentrifugierten Proben stiegen die Molmassen immer exponentiell an. Ohne genauere Kenntnisse eines begründeten Reaktionsmodells wurden die Funktionswerte mit einem Marquardt-Levenberg Algorithmus an eine rationale Funktion zweiter Ordnung angepaßt ($y_0 = 11,7 \cdot 10^6$, $a = 5,9 \cdot 10^6$, $b = 8,8 \cdot 10^6$ für $f = y_0 + ax + bx^2$, Regressionskoeffizient $r^2 = 0,999$). Der Algorithmus bestimmt die Summe der kleinsten Fehlerquadrate zwischen der beobachteten und den vorgeschlagenen Funktionswerten. Zusätzlich wurde mit Erfolg eine Kurvenanpassung an eine komposite Funktion durchgeführt, die im Abschnitt der rheologischen Ergebnisse beschrieben ist (siehe unten). Zu Beginn des Experimentes (t_0) variierten die Molmassen (M_w) um $10 - 30 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ und stiegen nach 5,5 Stunden auf $M_w 100 - 300 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Die Molmassen, die 12 Stunden nach Versuchsbeginn bei $900 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ lagen, stiegen auch nach dieser Zeit weiterhin ohne ein Anzeichen eines Gleichgewichtes an (wie es dementsprechend beispielsweise bei zeitgleichen Aggregations- und Desaggregationsvorgängen zu beobachten gewesen wäre).

Durch die Zugabe von L-Cystein wurde der Anstieg der Molmassen konzentrationsabhängig unterdrückt. L-Cystein reduzierte die Ausgangsmassen zu Beginn des Experimentes (vergleiche die Lage der Messwerte an t_0 in Abb. 3-24).

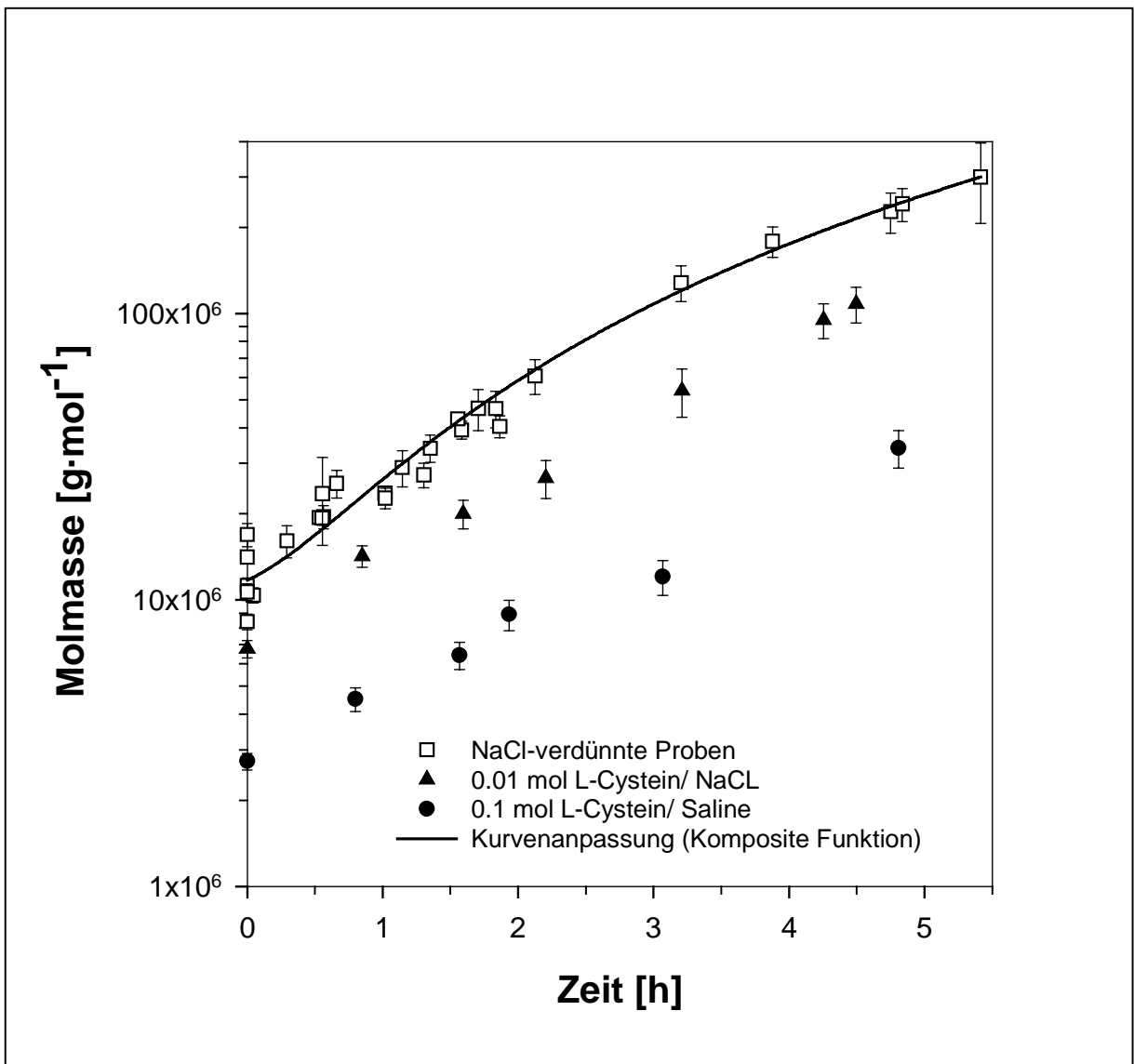


Abb. 3-24: Zeitlicher, exponentieller Anstieg der Molmassen von 15 verschiedenen, verdünnten Proben (1:500) des zentrifugierten Stratum corneums des Pilotwales, *Globicephala melas*. Nach Zugabe von L-Cystein wurden präformierte Aggregate zerstört (vgl. niedrigere Ausgangsmassen bei t_0 von L-Cystein/ Saline im Gegensatz zu NaCl-verdünnten Proben). Der Anstieg der Molmasse erfolgte ebenfalls exponentiell, jedoch auf einem niedrigeren Niveau.

Wie bei den unbeeinflussten Proben zu beobachten, vergrößerten sich nach 5,5 Stunden Versuchszeit die Molmassen auch in diesem Versuch um das 10-fache der

Ausgangsmasse. Bei den Proben, die mit $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Cystein inkubiert worden waren, kam es zum Anstieg der Molmasse von 2 auf $10 \cdot 10^6 \cdot \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

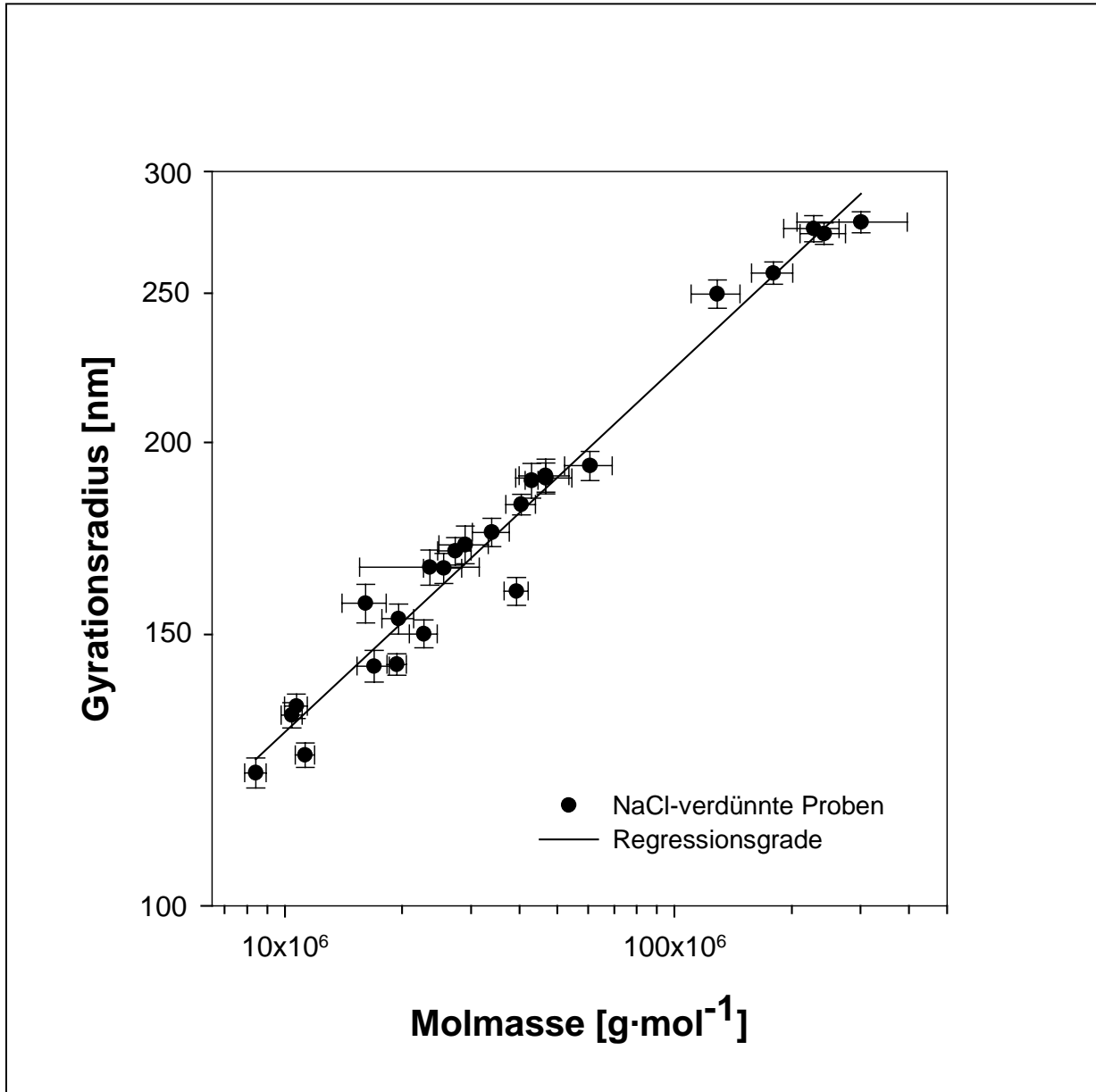


Abb. 3-25: Abhängigkeit der Gyrationradien von den Molmassen während der Aggregation von verdünnten (1:500), zentrifugierten Substanzen aus dem Stratum corneum des Pilotwales, *Globicephala melas*. In doppelt-logarithmischer Darstellung zeigte sich, dass ein linearer Zusammenhang zwischen Gyrationradius und Molmasse bestand: Gyrationradius $G = 0,24 M^{0.46}$

In doppelt-logarithmischer Darstellung korrelierten die Gyrationen linear mit der Molmasse unabhängig von der Versuchszeit (Abb. 3-25). Unter Verwendung der kleinsten Fehlerquadrate wurde eine lineare Regression durchgeführt, deren Steigung 0,46 betrug (Gyrationsradius $G = 0,24 M^{0,46}$).

3.4 Rheologische Ergebnisse zum Gel

Die kinetischen Experimente zur Gelbildung des unverdünnten Zentrifugates zeigten, dass sich aus dem Sol der fluiden Bestandteile des Stratum corneums des Pilotwales ein Gel bildet, das die Konsistenz eines viskoelastischen Körpers aufweist.

Um die Vergleichbarkeit der Messungen zu gewährleisten, wurde die Probenaufbereitung mittels Zentrifugation (10 Minuten) und das Zeitintervall zwischen Aufbereitung und Messung konstant gehalten (5 Minuten). Dieser Zeitraum war im Verhältnis zur Meßzeit von mehr als 5 Stunden zu vernachlässigen. Die Zentrifugationsgeschwindigkeit zwischen 1500 und 4000 U·min⁻¹ beeinflusste nicht die Konzentration der Probe.

Bei den unverdünnten Proben, deren Proteingehalt bei etwa 0,06 g·ml⁻¹ lag, und Verdünnungen bis zu 1:3 wurden zu Beginn der kinetischen Messungen Schwankungen in den Modulen beobachtet. Nach ungefähr 1,5 Stunden (t_0 , Ende der Zentrifugation bei 4000 U·min⁻¹) stiegen die Speichermodule G' (Kreise in Abb. 3-26) über das Niveau der Verlustmodule G'' (Dreiecke in Abb. 3-26). Bei unverdünnten Proben lag der Cross-over point ($G' = G''$) bei 0,063 Pa (Frequenz $\omega = 0,35 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$, Schubspannung $\tau = 0,27 \text{ Pa}$, Temperatur $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$). In den folgenden 3,5 Stunden stiegen die Speichermodule G' auf 600 - 800 Pa und die Verlustmodule auf 100 - 200 Pa an. Der Anstieg der Verlustmodule G'' verlief bei unverdünnten Proben über zwei Plateauphasen. Nach einer Versuchszeit von ungefähr 5 Stunden fluktuierten G' and G'' für die nächsten 12 Stunden um 800 - 1000 Pa. In vergleichbaren gelkinetischen Untersuchungen an unverdünnten Zentrifugaten variierte die Konzentration der Proben leicht. Infolgedessen wurden auch leichte Veränderungen der kinetischen Evolution des System beobachtet, die sich als Verschiebungen des Cross-over points bemerkbar machten.

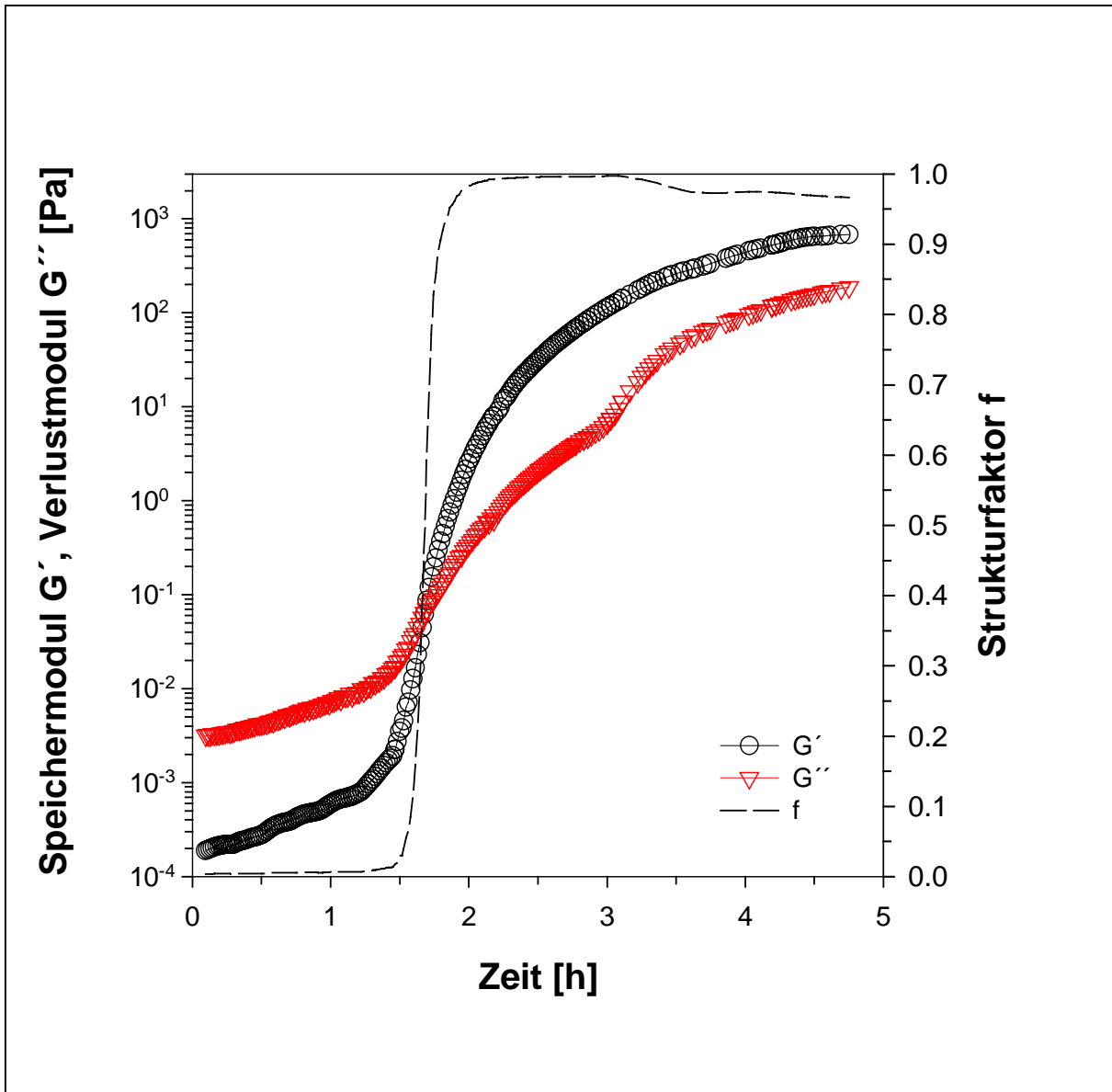


Abb. 3-26: Stress-kontrollierte Gelkinetik des unverdünnten Zentrifugates aus dem Stratum corneum des Pilotwales, *Globicephala melas* ($\omega = 0,35 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$, Schubspannung $\tau = 0,27 \text{ Pa}$, Temperatur $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$, Zentrifugation für 10 Minuten bei $4000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$, Proteinkonzentration $0,062 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Das Fluid entwickelte sich vom Sol zum Gel. Die Daten von G'' wurden im Zeitintervall zwischen 3 und 5 Stunden geglättet. Nach 3 Stunden zeigte der erneute Anstieg von G'' , dass Scherenergie bei steigender Elastizität (G') dissipierte.

Während der ersten 1,5 Stunden deutete das niedrige Niveau des Strukturfaktors f an (gestrichelte Linie in Abb. 3-26), dass die Fähigkeit des Fluids, freie Energie zu speichern, gering war. Der steile Anstieg von f (ab $f \leq 0,025$) vor dem Cross-over point ($f = 0,5$) offenbarte den schnellen Zuwachs an strukturierenden, elastischen Elementen. Der steile Zuwachs kam an dem Punkt zum Erliegen, an dem der Verlustmodul G'' zum zweiten Mal anstieg. Damit verbunden war der Abfall von f nach Ablauf von 3 Stunden auf ein niedrigeres Niveau bei unverdünnten Proben.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Gelbildungskinetik wurde an Zentrifugaten untersucht, die mit isotonischer NaCl-Lösung verdünnt worden waren (Abb. 3-27). Dabei zeigte sich, dass die auf die Temperatur von 20 °C normierten Werte der Speichermodul G' am Cross-over point ($f_{G',G''} = 0,5$) mit geringerer Probenkonzentration exponentiell abnahmen. Die Abnahme der Speichermodul fiel bei geringerer Verdünnung weniger gravierend aus als bei Verdünnungen über 1:10. Wie in der Rheologie allgemein üblich, wurden die Modul doppelt-logarithmisch gegen die Konzentration aufgetragen und mit Erfolg an eine power-law Funktion angepaßt ($y_0 = -0,01$; $a = 1,50$; $b = 1,12$ für $f = y_0 + ax^{(b)}$, Regressionskoeffizient $r^2 = 0,9995$).

Ebenso wie die Speichermodul zeigten die Werte des Strukturfaktors f eine Abhängigkeit von der Konzentration (Abb. 3-28). Im Vergleich zu unverdünnten Proben erreichte der Strukturfaktor f bei Verdünnungen über 1:10 nicht den maximalen Wert von $f = 1$. Die veränderte Lage von f bei $f = 0,5$ zeigte eine Verlangsamung im Aufbau von Strukturen an, die sich aber im Gegensatz zu unverdünnten, hochgeordneten Proben ohne Anlaufphase (siehe oben) vollzog. Generell wechselten die Verläufe von f von asymmetrisch sigmoidalen Kurven bei unverdünnten Proben zu exponentiellen Kurven bei Verdünnungen unterhalb von 1:10. Eine gute, einheitliche mathematische Anpassung aller Kurven an eine zusammengesetzte Funktion mit geringen Schätzfehlerabweichungen von 0,0287 bis 0,0033 ließ sich durch Kombination einer sigmoidalen Kurve nach Chapman und einer hyperbolischen Funktion erreichen:

$$f = y_0 + a(1 - \exp(-bx))^c + \frac{dx}{(e+bx)}$$

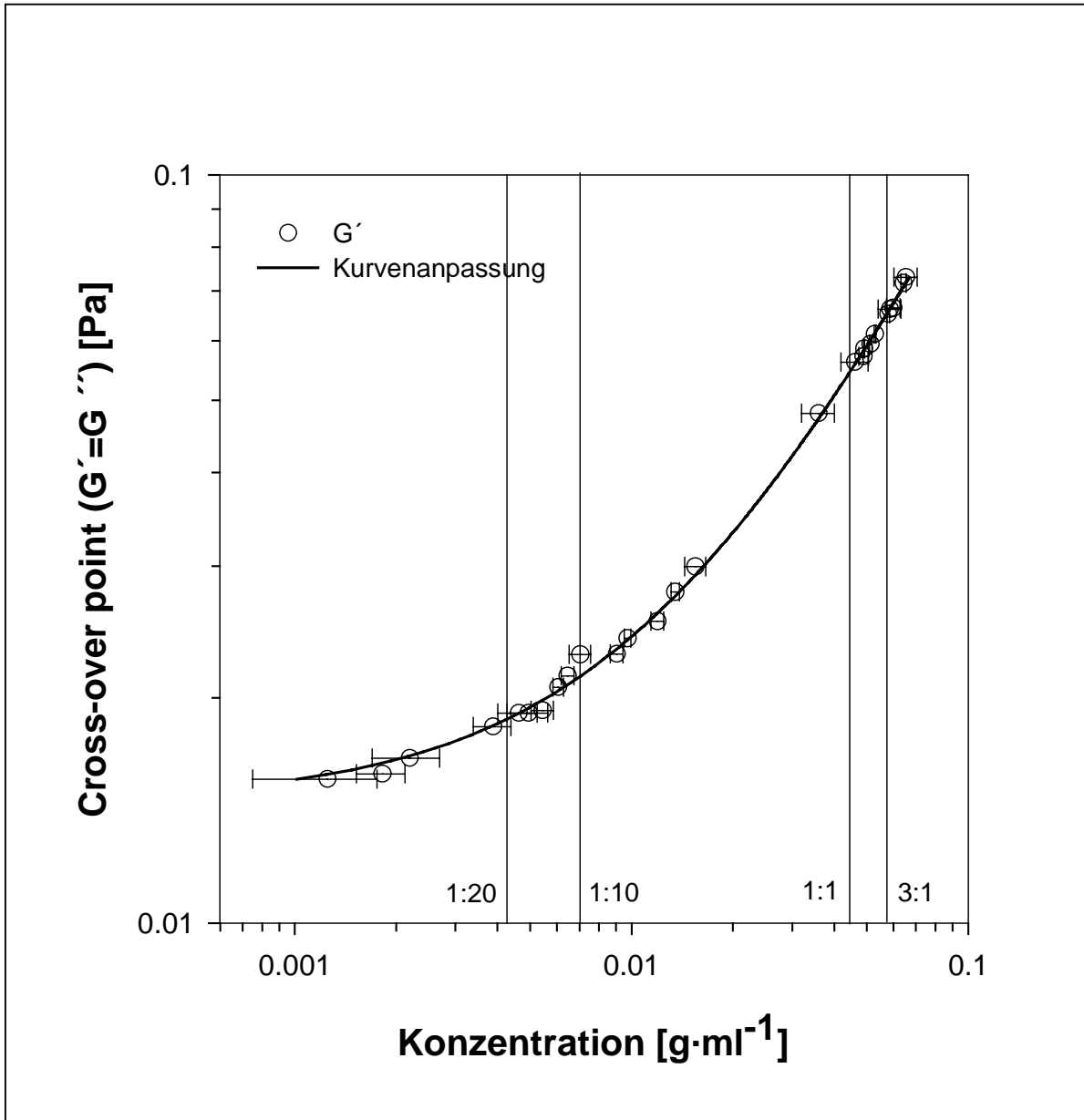


Abb. 3-27: Konzentrationsabhängigkeit der Cross-over points von diversen unverdünnten und verdünnten Zentrifugaten aus dem Stratum corneum des Pilotwales, *Globicephala melas*. Die Messwerte sind von Probenvorbehandlungen mit unterschiedlichen Zentrifugationsgeschwindigkeiten zusammenfaßt. Die Messwerte wurden an eine power-law Funktion angepasst (doppelt-logarithmische Darstellung).

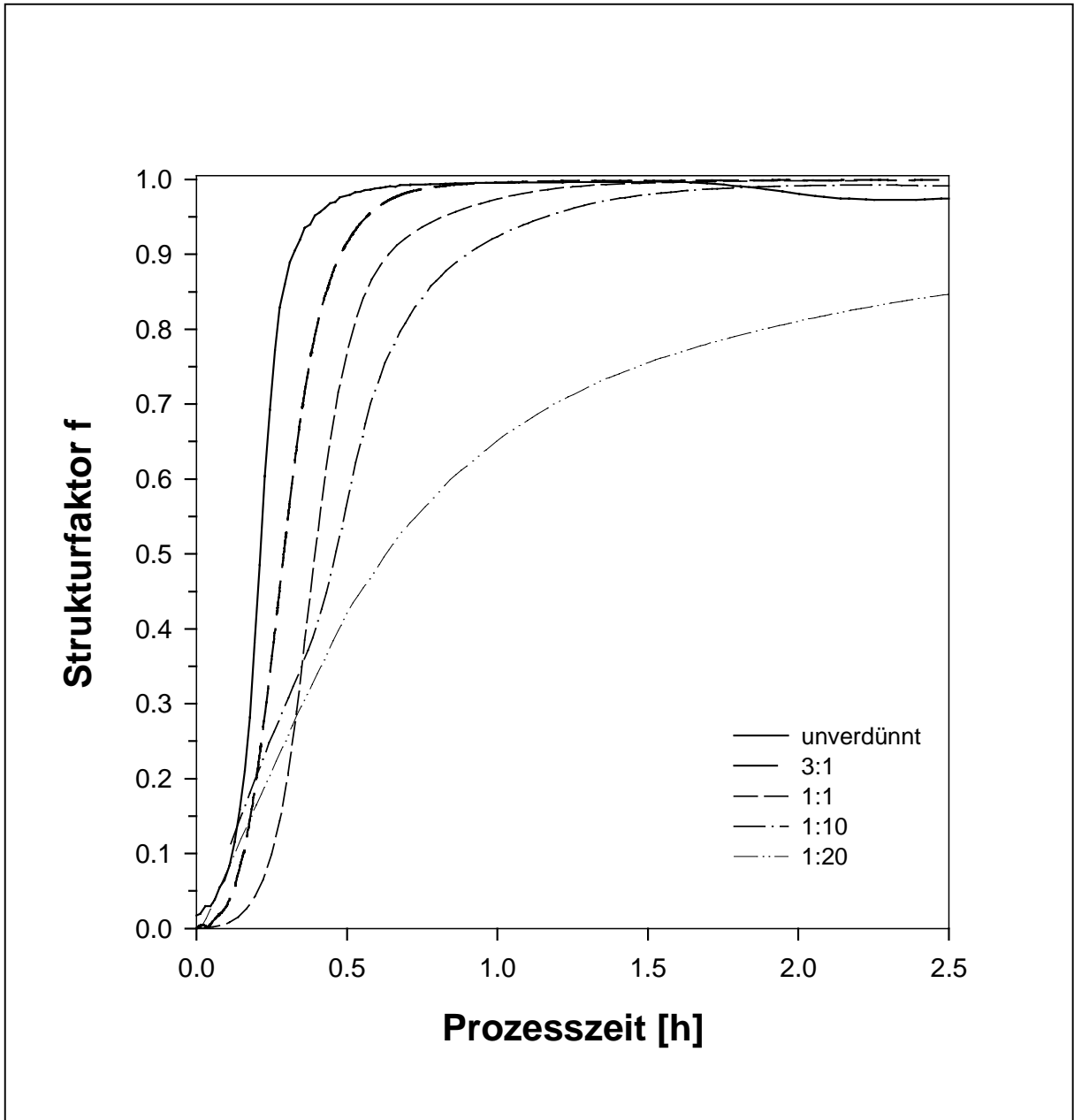


Abb. 3-28: Verläufe der Strukturfaktoren von verschiedenen Gelkinetiken (Zentrifugate aus dem Stratum corneum des Pilotwales, *Globicephala melas*) nach Extrapolation auf den Beginn der Strukturbildung (Prozesszeit, vergleiche mit dem realen Cross-over point von f einer unverdünnten Probe in Abb. 3-26). Bei höheren Konzentrationen erreichte f das Maximum von 1 früher; bei geringeren Konzentrationen kam es zu einer Verlagerung von f in Richtung niedrigerer Werte, die gegenüber den Werten von unverdünnten Proben nicht mehr das Maximum von 1 erreichten.

Während die gelkinetischen Daten innerhalb des viskoelastischen Bereiches (vgl. Deformationstest in Abb. 3-32) unabhängig von der Vorgabe der Schubspannung oder Scherrate waren, zeigte die Gelbildungszeit eine Abhängigkeit von der Zentrifugationsgeschwindigkeit. Eine Beschleunigung der Gelbildung (Kurvenverschiebung nach links) um etwa eine Stunde wurde bei Proben beobachtet, die bei 4000 U min^{-1} anstelle von 3000 U min^{-1} zentrifugiert worden waren. Eine Verzögerung der Gelbildung um etwa eine Stunde trat bei 1500 U min^{-1} auf (Abb. 3-29). Der Cross-over point bei unverdünnten Proben wurde im Gegensatz zu verdünnten Proben später erreicht (siehe Abb. 3-29, lineare Korrelationen).

Im Anschluss an die Gelbildung unverdünnter und unbehandelter Proben wurden mechanische Spektren bei einer Frequenz zwischen $\omega = 43,98$ und $0,035 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ($\tau = 15 \text{ Pa}$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$) aufgenommen (das Frequenzspektrum ist in den Abbildungen 3-30 und 3-31 auf den Bereich zwischen $\omega = 43,98$ und $0,13 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ eingeschränkt, siehe unten). Die Spektren zeigen für Proben mit zunehmendem Gelationsalter unabhängig von der aufgeprägten fallenden oder steigenden Frequenz einen stetigen Anstieg des Speichermoduls G' (1200 - 2800 Pa, siehe Abb. 3-30) und des Verlustmoduls G'' (10 - 70 Pa, siehe Abb. 3-31) mit zunehmendem zeitlichen Abstand vom Cross-over point. G' und G'' erwiesen sich dabei über den gesamten gemessenen Frequenzbereich als von der Frequenz nahezu unabhängig. Die Messwerte von G' fielen bei jüngeren Gelen um eine Zehnerpotenz höher aus als G'' und bei älteren Gelen um zwei Zehnerpotenzen. In Übereinstimmung mit derjenigen Frequenz, mit der die Proben während der Gelbildungskinetik deformiert worden waren, wurde bei der Aufnahme der Spektren ein Anstieg von G'' bei $\omega = 0,35 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ beobachtet. Dieser Effekt schwächte sich mit zunehmendem Gelalter ab und verschwand völlig bei Gelen, die länger als 9,5 Stunden (t_0 , Ende der Zentrifugation) deformiert worden waren. In jedem Spektrum war ein Abfall von G'' zwischen etwa $\omega = 20$ bis $30 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ zu verzeichnen, der sich mit zunehmendem Alter des Gels abschwächte. Auffällig war ein starker Anstieg von G' and G'' unterhalb einer Frequenz von $\omega = 0,13 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$, bei denen die entsprechenden Meßzeiten länger als die Strukturbildungszeiten ausfielen.

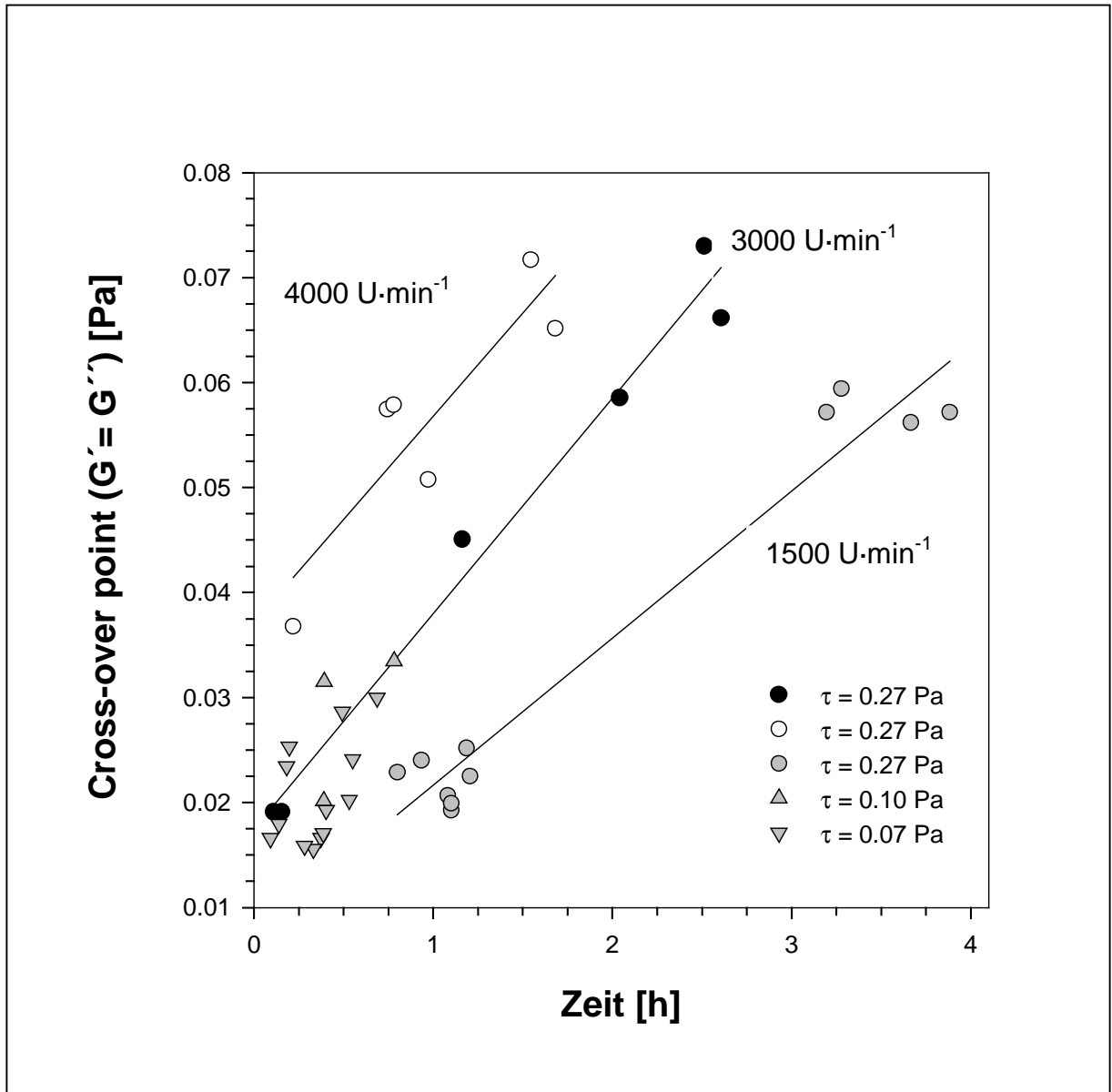


Abb. 3-29: Zeitliche Abhängigkeit der Cross-over points ($G' = G''$) von der Zentrifugationsgeschwindigkeit (Zentrifugate aus dem Stratum corneum des Pilotwales, *Globicephala melas*). Unabhängig vom aufgeprägten Stress (innerhalb des linear-viskoelastischen Bereiches) waren die Cross-over points unterschiedlich konzentrierter Proben (je verdünnter, desto früher der Cross-over point) jeweils in linear Abhängigkeit einer Zentrifugationsgeschwindigkeiten zugeordnet. Die annähernd parallele Verschiebung der Gerade deutete an, dass die Lage des Cross-over points bei vergleichbarer Konzentration ausschließlich von der Zentrifugationsgeschwindigkeit in dieser Untersuchung abhing.

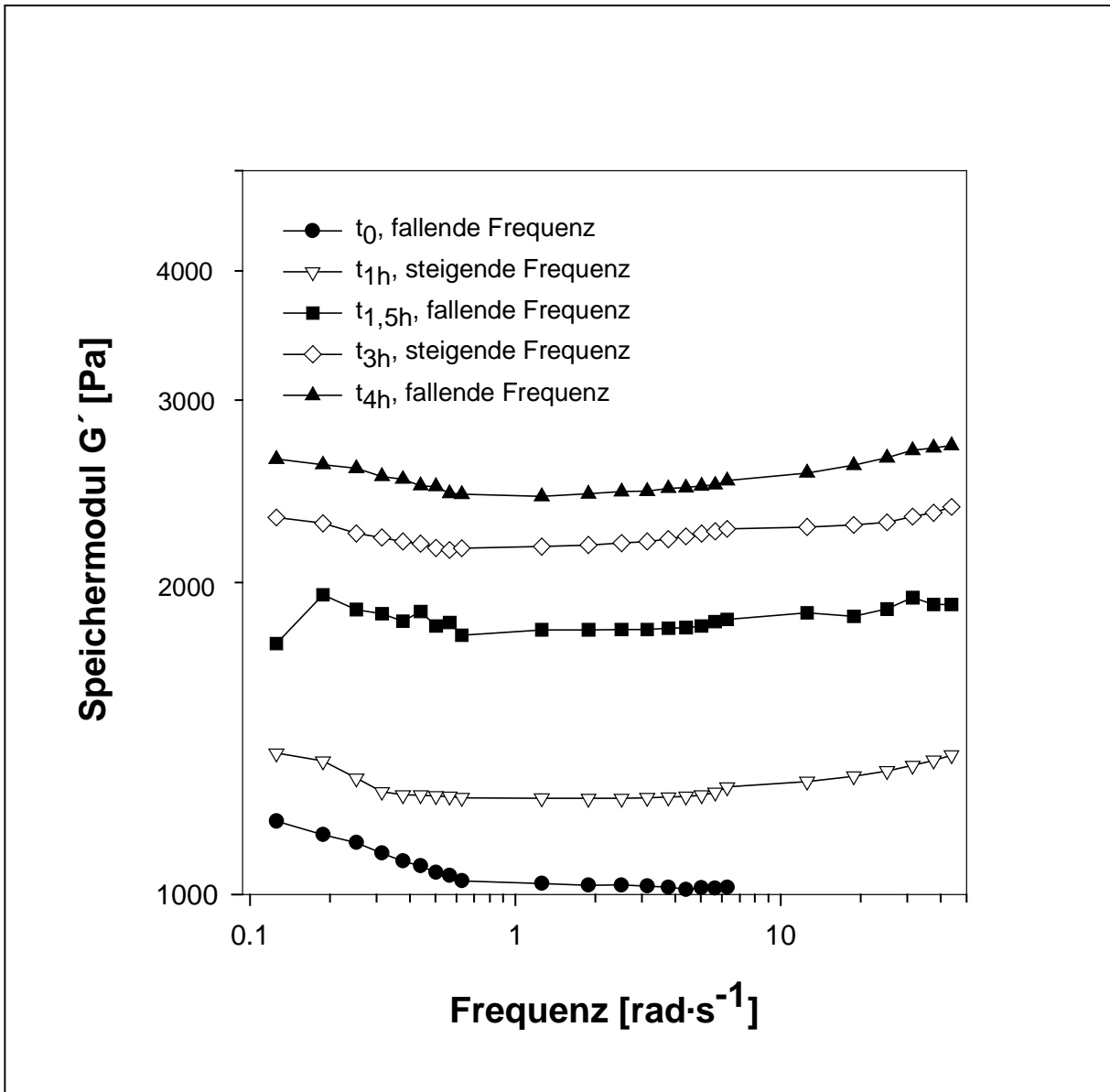


Abb. 3-30: Frequenz-Test mit alternierenden fallenden und steigenden Frequenzen zwischen $\omega = 42,98$ und $0,06 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ($\tau = 15 \text{ Pa}$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$) einer unverdünnten Probe (Zentrifugat aus dem Stratum corneum des Pilotwales, *Globicephala melas*) bei fünf verschiedenen Zeiten nach dem Cross-over point. Der Speichermodul G' war unabhängig von der Frequenz, zeigte aber einen leichten Anstieg bei niedrigen Frequenzen aufgrund der voranschreitenden Gelbildung zum viskoelastischen Körper während der sich stark verlängernden Meßzeiten in diesem Frequenzbereich.

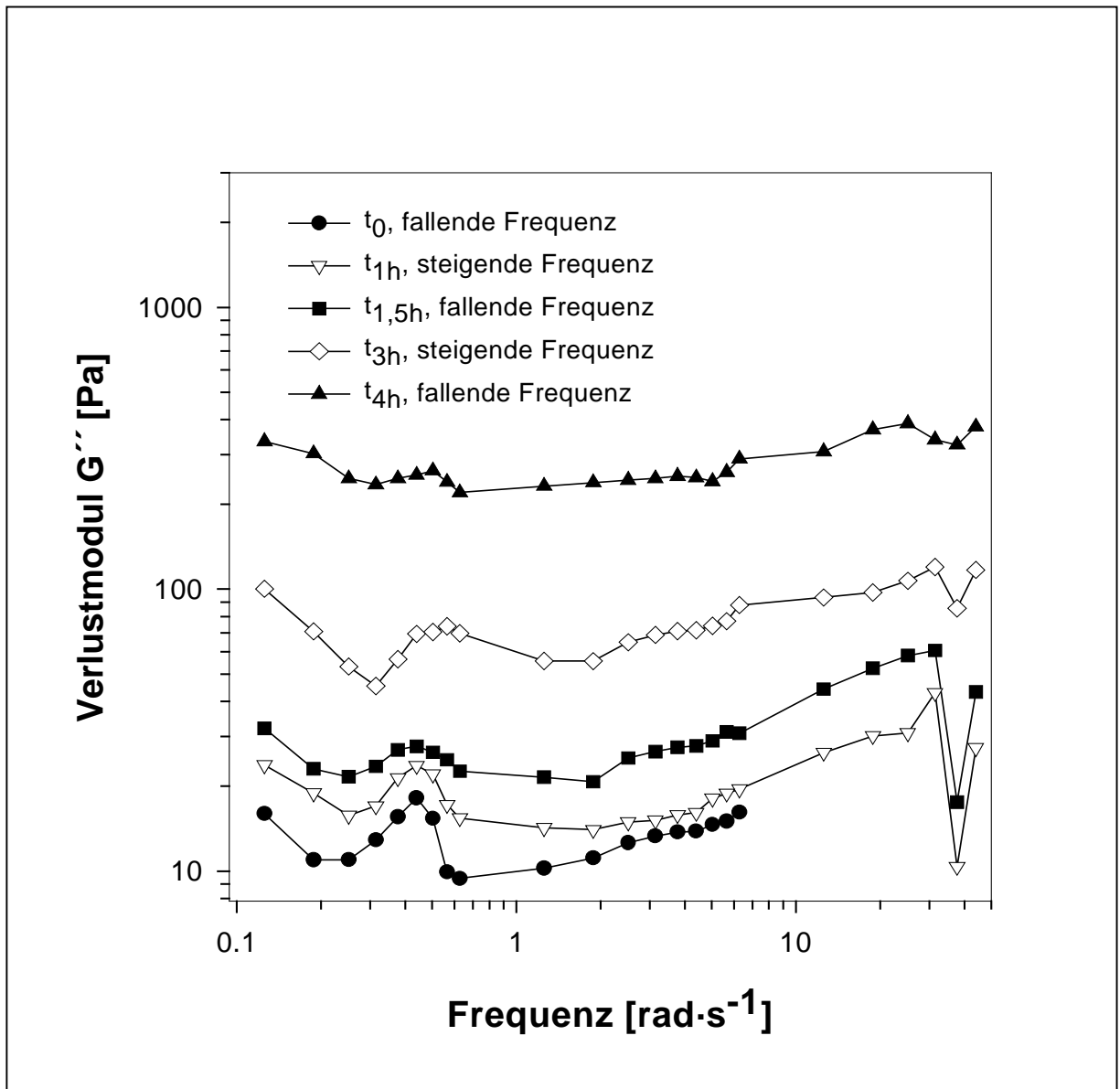


Abb. 3-31: Frequenzabhängigkeit des Verlustmoduls G'' (korrespondierend zu Abb. 3-30) des Gels aus dem Zentrifugat des Stratum corneum des Pilotwales, *Globicephala melas*). Der Verlustmodul G'' zeigte einen Peak um $\omega = 0,35 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ (Frequenz bei der die Gelkinetik gemessen worden war) und fiel bei einer Frequenz zwischen 20 und $30 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ab. G'' lag 1 bis 2 Zehnerpotenzen unterhalb von G' (vgl. Abb. 3-30).

Aus diesem Grund wurden Meßergebnisse von Frequenzen unterhalb von $\omega = 0,13 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ nicht in die Darstellung der Spektren übernommen oder zur Begutachtung des

Struktur factors f verwendet. Die Analyse der Frequenzabhängigkeit von f ergab, dass die Fähigkeit freie Energie zu speichern, nach Ablauf der Gelbildung (in der Phase III) zwischen Frequenzen von $\omega = 43,98$ zu $0,13 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ immer hoch ausfiel ($f \leq 0,95$, nicht abgebildet).

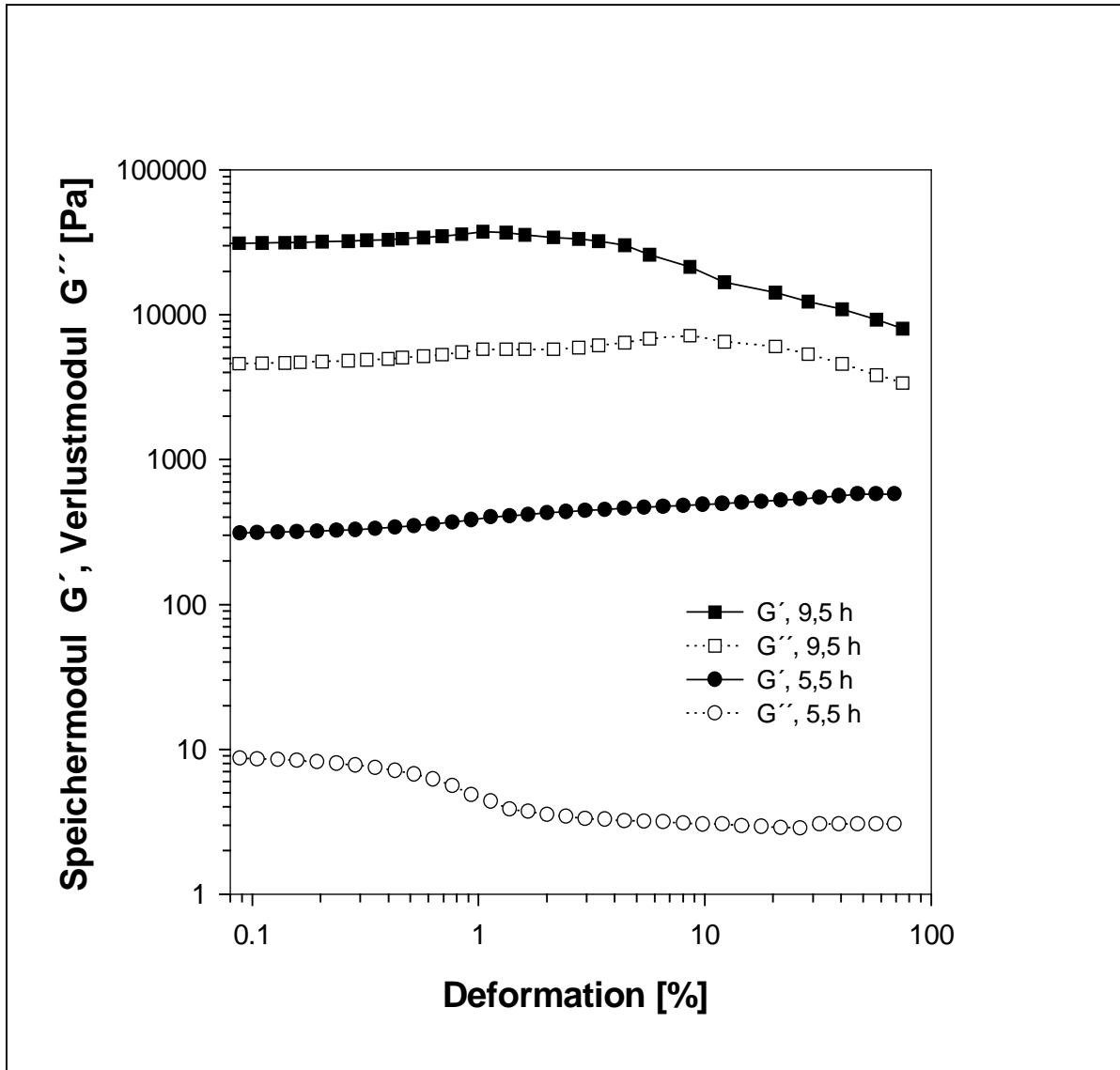


Abb. 3-32: Deformations-Test mit ansteigender Deformation γ zwischen 0,08 und 75 % ($\omega = 0,35 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$) einer unverdünnten, zentrifugierten Probe (Zentrifugat aus dem Stratum corneum des Pilotwales, *Globicephala melas*) nach zwei unterschiedlichen Zeiten (t_0 , Zentrifugation). Das Spektrum des jüngeren Gels zeigte sowohl pseudoplastisches Verhalten als auch Deformationsverhärtung. Pseudoplastisches Verhalten trat bei älteren Gelen nicht auf.

Bei einer Frequenz von $\omega = 0,35 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$, die zur kinetischen Untersuchung der Gelbildung ausgewählt worden war, wurden Deformations-Tests durchgeführt, um den Widerstand gegen eine Deformation zu messen (Abb. 3-32). Junge Gele mit einem Alter von etwa 5,5 Stunden (t_0 , Ende der Zentrifugation) zeichneten sich durch einen Anstieg des Speichermoduls G' im Bereich von $\gamma = 0,1$ bis 75 % aus. Diese Scherverzähung war begleitet von einem strukturviskosen Verhalten, das durch den Abfall des Verlustmoduls G'' (vergleiche $\eta' = G''/\omega$) gekennzeichnet wurde. Nach einer Deformation von $\gamma = 75$ % kam es zu einem abrupten Abfall von G' und G'' auf 0,01 Pa. In reiferen Gelen (9,5 Stunden nach Zentrifugation) lagen die Speichermodule und die Verlustmodule um etwa zwei Zehnerpotenzen über den Modulen der jüngeren Gele. Während der leichte Anstieg von G' zwischen $\gamma = 0,2$ und 1 % weiterhin auf eine Scherverzähung hindeutete, trat strukturviskoses Verhalten in Form fallender Werte von G'' bei älteren Gelen nicht mehr auf. Der Beginn rheodestruktiver Deformation (das Verlassen des linear visko-elastischen Bereiches) erfolgte zwischen $\gamma = 1 - 2$ %. Bei höheren Deformationen wurde ein starker Abfall der Module beobachtet, die bei einer Deformation von $\gamma = 75$ % auf 0,01 Pa zurückfielen. Ein Wiederaufbau der Struktur nach Überschreiten einer Deformation von $\gamma = 75\%$ wurde nicht beobachtet. Bei einer Deformation von $\gamma = 0,75$ % erreichte die Schubspannung τ bei jüngeren Gelen ein Niveau von ungefähr 300 Pa und bei reiferen Gelen das Niveau von ungefähr 8000 Pa.

3.5 Photoelektronenspektroskopische Ergebnisse zum Stratum corneum und zum Gel

Bei der chemischen Analyse wurde die wasserseitige Oberfläche des Stratum corneums des Pilotwales, *Globicephala melas*, mit der Geloberfläche verglichen. Untersucht wurden die Proben bei konstantem Vakuum und tiefen Temperaturen. Auf den Oberflächen beider Probenarten wurden weder Eiskristalle, noch Degradationsercheinungen in Form von austretenden Flüssigkeiten (z.B. durch Fette hervorgerufener Glanz) an der Probenoberfläche festgestellt.

Die durchgeführten photoelektronenspektroskopischen Analysen ergaben, dass die Oberflächenchemie beider Probenarten von den chemischen Elementen Kohlenstoff,

Stickstoff, Sauerstoff, Natrium, Magnesium, Silicium, Phosphor, Schwefel, Chlor, Kalium, Kalzium und Zink bestimmt wurde (Tab. 3-1). Allerdings ist bei Verwendung von Al K α oder Mg K α -Strahlung die Nachweisempfindlichkeit von Magnesium gering. Spuren von Magnesium deuteten sich durch die Mg 2p und Mg 2s Peaks bei BE \approx 50 bzw. 88 eV an. Es fiel auf, dass das Verhältnis von anorganischen Ionen in bezug auf den Kohlenstoffgehalt der Proben im Gegensatz zur Hautoberfläche an der Geloberfläche erhöht war (Tab. 3-1).

Tab. 3-1: Photoelektronenspektroskopische Untersuchung der Elementverhältnisse an der Hautoberfläche des Pilotwales, *Globicephala melas*, und der Geloberfläche des Zentrifugates aus dem Stratum corneum der Epidermis bezogen auf den Kohlenstoffgehalt der Proben (Übersichtspektren)

Elementverhältnisse	Hautoberfläche [%]	Gel [%]
[N]:[C] _{spec}	6,24	9,41
[O]:[C] _{spec}	14,24	21,29
[Na]:[C] _{spec}	0,12	0,16
[Mg]:[C] _{spec}	Spuren	Spuren
[Si]:[C] _{spec}	0,28	Spuren
[P]:[C] _{spec}	0,34	0,57
[S]:[C] _{spec}	0,35	0,59
[Cl]:[C] _{spec}	0,28	0,58
[K]:[C] _{spec}	–	0,62
[Ca]:[C] _{spec}	0,17	0,62
[Zn]:[C] _{spec}	–	0,04

Stickstoff (N), Sauerstoff (O), Natrium (Na), Magnesium (Mg), Silicium (Si), Phosphor (P), Schwefel (S), Chlor (Cl), Kalium (K), Calcium (Ca), Zink (Zn)

Um die organischen Bindungen des Kohlenstoffs zu untersuchen, wurde das Kohlenstoff C 1s Elementspektrum in sieben Komponentenpeaks zerlegt, die für die Bin-

dungszustände des Kohlenstoff charakteristisch sind (A bis G, Tabelle 3-2 mit A gesättigte Kohlenwasserstoffe, B β -shift stark elektronenziehender funktioneller Gruppen, C Amine und Ammoniumverbindungen, D Alkohole, Aldehyde, Etherkohlenstoff der Estergruppe, E Peptidbindung, F Estergruppe, G Carbonsäuren). Systematische Fehler und dämpfende Faktoren (z.B. Metallionen), die sich sowohl auf den Kohlenstoffanteil als auch auf den Stickstoffanteil beider Proben auswirken, wurden durch Quotientenbildung in Form von [N]:[C]-Verhältnissen eliminiert.

Nimmt man an, dass die Komponentenpeaks den in Tabelle 3-2 aufgeführten Bindungszuständen des Kohlenstoffs entsprechen, können aus den C 1s Elementspektren die [N]:[C]_{C 1s}-Verhältnisse nach der Formel

$$\frac{[N]}{[C]}_{C\ 1s} = \frac{[E] + ([C] - [E])}{[A] + [B] + [C] + [D] + [E] + [F] + [G]} \quad [3.1]$$

berechnet und mit den Werten der Übersichtsspektren [N]:[C] verglichen werden. Für die Hautoberfläche zeigte die Zerlegung des Kohlenstoff C 1s Spektrums ([N]:[C]_{C 1s} = 7,17 %) eine annähernde Übereinstimmung mit dem Verhältnis [N]:[C]_{spec} ([N]:[C]_{spec} = 6,24 %), das aus dem Übersichtsspektrum bestimmt wurde (vgl. Tabelle 1 und 2). Das C 1s Spektrum des Gels entsprach qualitativ dem der Hautoberfläche (Tabelle 3-2). Die Zerlegung des Kohlenstoff C 1s Spektrums des Gels ([N]:[C]_{C 1s} = 11,00 %) zeigt einen leichten Überhang an Stickstoff N im Vergleich zum Übersichtsspektrum ([N]:[C]_{spec} = 9,41%, vgl. Tabelle 3-1 und 3-2). Der höhere Stickstoffanteil der Geloberfläche spiegelte sich in einem erhöhten Komponentenpeak C wider (Amine ($-\underline{C}-NR^i$) und Ammonium ($-\underline{C}-N^+R^i_3$)) (vgl. Abb. 3-33 und 3-34). Die prozentualen Anteile der Amin- und Ammonium-Verbindungen wurde berechnet nach:

$$X_{\text{Amine/Ammonium}} = \frac{[C] - [E]}{[A] + [C] + [D] + [E] + [F] + [G]} \quad [3.2]$$

Tab. 3-2: Kohlenstoffverbindungen an der Haut- und Geloberfläche des Pilotwales, *Globicephala melas*

Verbindungen	relative Konzentrationen [%]	
	Hautoberfläche	Gel
A* gesättigte Kohlenwasserstoffe	$-\underline{C}_xH_y$	60,1 55,3
B β -Shift stark elektronenziehender funktioneller Gruppen	$R-\underline{C}-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-O-R'$ $R-\underline{C}-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-NH-R'$	10,5 10,9
C Amine, Ammoniumverbindungen	$-\underline{C}-NH_x$	7,2 11,0
D Alkohole, Aldehyde, Etherkohlenstoff Estergruppe	$-\underline{C}-OH, -\underline{C}-(O)H, -\underline{C}-O-\underline{C}-,$ $R-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-C-O-\underline{C}-R'$	11,3 11,9
E Peptidbindung	$R-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-\underline{C}-NH-R'$	3,8 2,3
F Estergruppe	$R-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-\underline{C}-O-R'$	4,3 5,9
G Carbonsäuren	$R-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-\underline{C}-OH$	2,3 2,6

*konjugierte $\underline{C}=\underline{C}$ Bindungen und $\underline{C}-S$ fielen mit diesen Komponenten zusammen. Aufgrund ihres geringen Anteils konnten sie nicht separat werden.

Der Komponentenpeak C, Amine und Ammoniumverbindungen, fiel in beiden Probenarten höher aus als der Anteil des Komponentenpeaks E (Peptidbindungen). Die relativen Anteile der anderen Komponentenpeaks waren denen der Hautoberfläche quantitativ vergleichbar.

In beiden Proben wurden Esterbindungen identifiziert. Der Esterpeak F fiel kleiner aus als der Komponentenpeak D, so dass neben dem Etherkohlenstoff der Estergruppe ($-\underline{C}-O-C=O$) auch Alkohole ($-\underline{C}-OH$) und/ oder Aldehyde ($-\underline{C}(O)H$) anwesend sein müssten. Der Anteil der nicht an Ester gebundenen $\underline{C}-O(H, R)$ Gruppen wurden berechnet nach:

$$X_{\text{Alkohole/Ether/Aldehyde}} = \frac{[D] - [F]}{[A] + [C] + [D] + [E] + [F] + [G]} \quad [3.3]$$

Zur Kontrolle der Analyse wurden die prozentualen Anteile elektronenziehender funktioneller Gruppen mit den obengenannten Einzelkomponenten verglichen; dabei zeigte sich eine Überstimmung:

$$[B] = [E] + [F] + [G] \quad [3.4]$$

Die berechneten funktionellen polaren Einheiten (Überschuss an C und D, E, F und G) und nicht-polaren Einheiten (A, B) wurden sortiert (Abb. 3-33 und 3-34). Dabei zeigte sich ein Überhang an unpolaren Gruppen an den Oberfläche der Haut und des Gels.

Ebenso wie die Kohlenstoff-Spektren wurden die Schwefel S 2p Spektren in Komponenten zerlegt, um die verschiedenen Bindungsspezies des Schwefels darzustellen. Die zwei Komponentenpeaks spalteten sich jeweils in den S 2p_{3/2} und den S 2p_{1/2} Peak (Spin-Bahn-Kopplung). Die Kopplungskonstante entsprach mit $\Delta BE = 1,18$ eV dem Literaturwert (BEAMSON und BRIGGS 1992). Die Intensitätsverhältnisse der Peaks waren mit $[S\ 2p_{3/2}]:[S\ 2p_{1/2}] = 2,095$ konstant. Die Komponente bei BE = 163,36 eV in beiden Probenarten entsprach Mercaptoverbindungen ($R-\underline{S}$) bzw. organisch gebundenen Disulfiden ($R-\underline{S}-\underline{S}-R'$). Die gefundene BE entsprach den in der

Literatur angegebene Werte für Cystein von $BE_{Lit} = 163,2 \text{ eV}$ (BEAMSON und BRIGGS 1992).

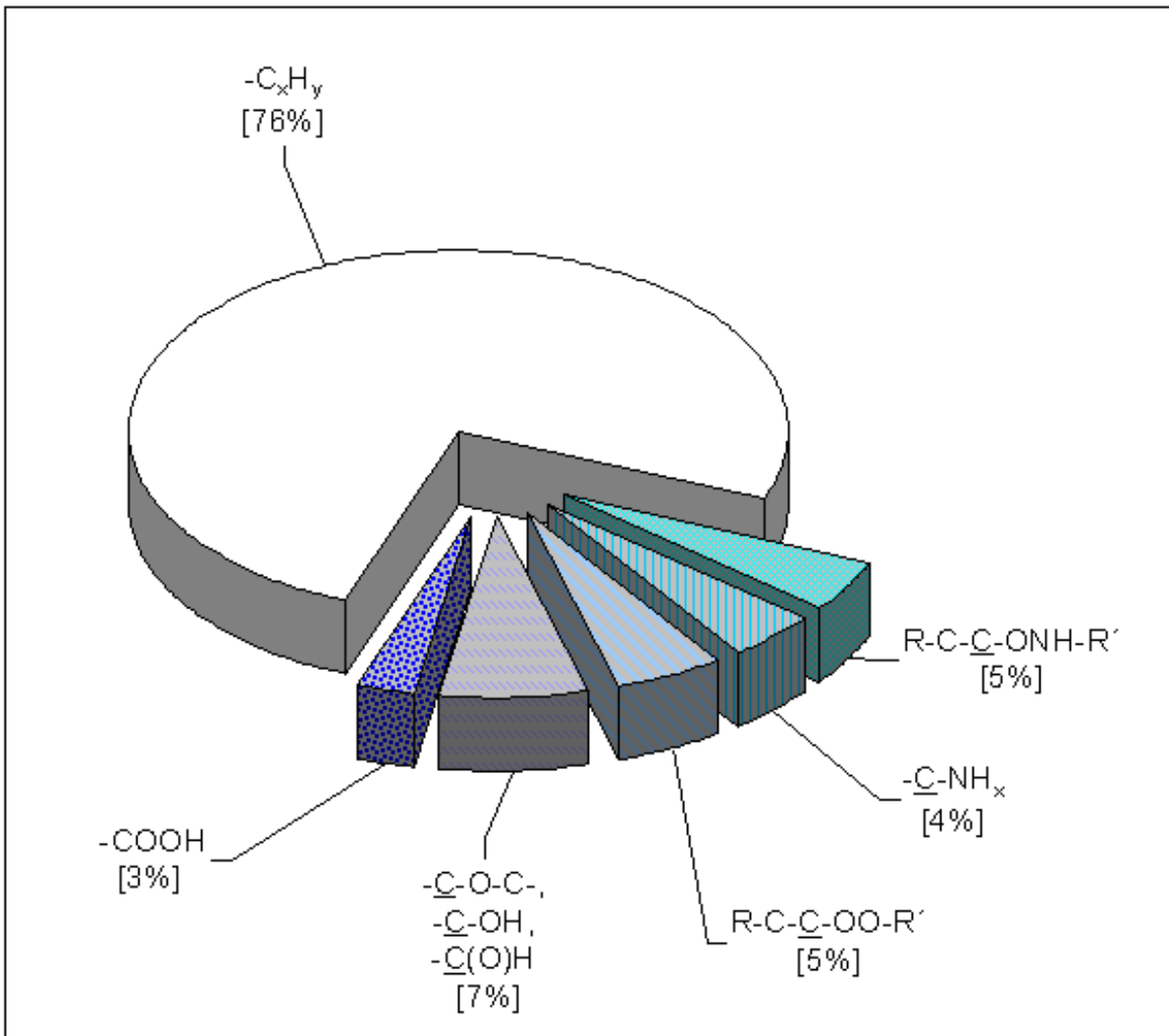


Abb. 3-33: Prozentuale Verteilung polarer (blau/ strukturiert) und nicht-polarer (weiß/ unstrukturiert) Kohlenstoffverbindungen an der Hautoberfläche des Pilotwales, *Globicephala melas*. Die Hautoberfläche war gekennzeichnet durch einen Überhang an nicht-polaren Gruppen. Auffällig war die Anwesenheit freier Amino- und Carboxyl-Gruppen als Vertreter polarer funktioneller Gruppen.

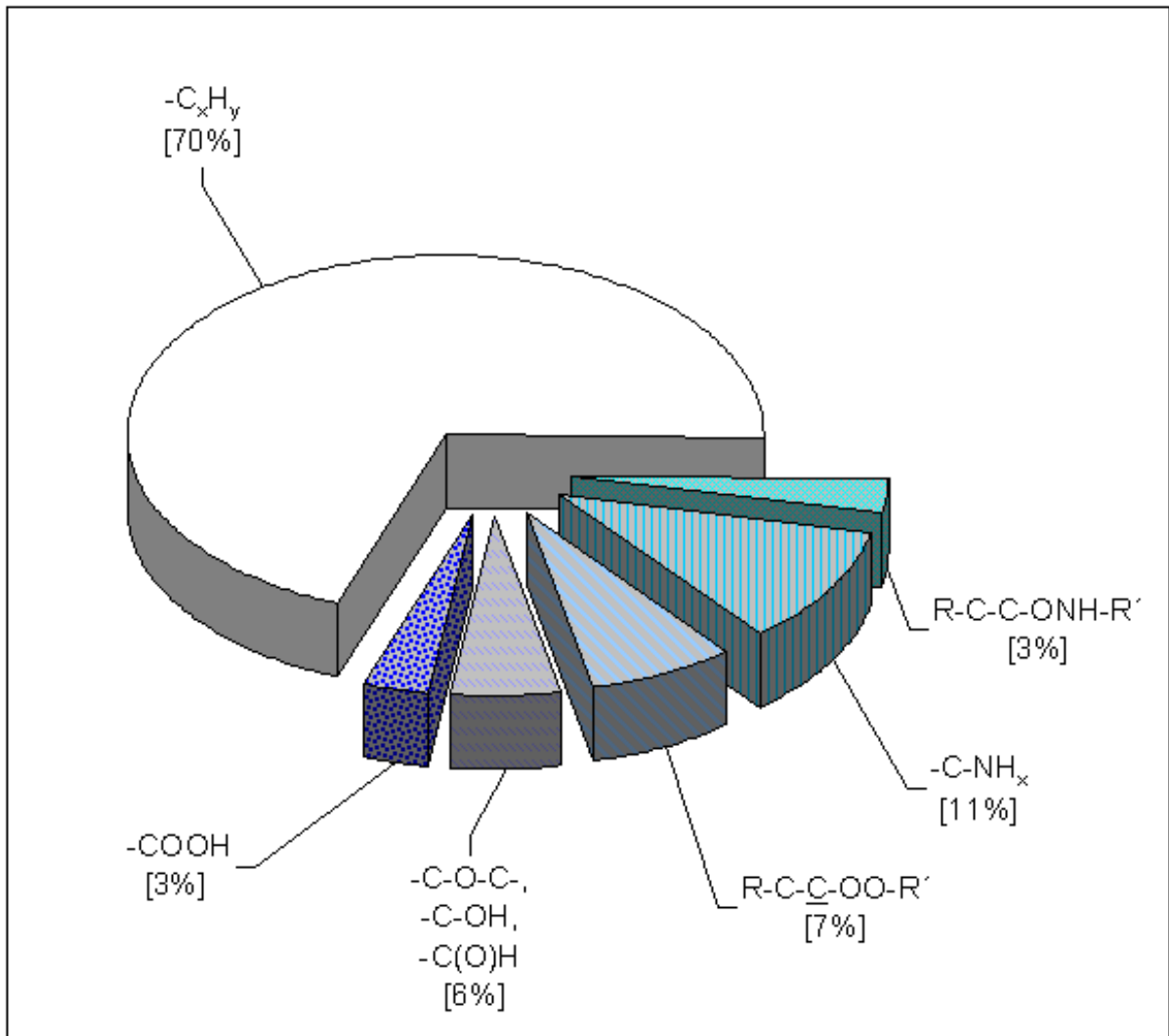


Abb. 3-34: Prozentuale Verteilung polarer (blau/ strukturiert) und nicht-polarer (weiß/ unstrukturiert) funktioneller Gruppen an der Geloberfläche des zentrifugierten Stratum corneums des Pilotwales, *Globicephala melas*. Ebenso wie die Hautoberfläche war die Geloberfläche gekennzeichnet durch einen Überhang an nicht-polaren Gruppen (vgl. Abb. 3-33). Die starke Ähnlichkeit der Geloberfläche mit der Hautoberfläche deutete daraufhin, dass die oberflächenchemischen Merkmale der Geloberfläche für die Merkmale der Hautoberfläche verantwortlich waren. Auffällig war, dass an der Geloberfläche der prozentuale Anteil freier Amino-Gruppen (Lysinoalanin-?, vgl. Abb. 3-18 und Abschnitt 2.6.2) höher ausfiel als an der Hautoberfläche.

Die BE unterschied sich von anderen Disulfiden mit deutlich höherer BE (z.B. $\text{CH}_3\text{-}\underline{\text{S}}\text{-}\underline{\text{S}}\text{-CH}_3$ BE = 164,3 eV; Butyl- $\underline{\text{S}}\text{-}\underline{\text{S}}\text{-}$ Butyl BE = 164,1 eV; Phenyl- $\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{S}}\text{-}\underline{\text{S}}\text{-CH}_2\text{-}$ Phenyl BE = 164,2 eV und Phenyl- $\underline{\text{S}}\text{-}\underline{\text{S}}\text{-}$ Phenyl BE = 164,4 eV nach TURNER et al. 1980, RIGA und VERBIST 1983, BEAMSON und BRIGGS 1992). Die zweite Komponente bei BE = 168,4 eV zeigte die Anwesenheit von Schwefel höherer Oxidationsstufen (Sulfone, Sulfit oder Sulfate). Übereinstimmungen ergaben sich beispielsweise mit den Salzen CaSO_4 $\text{BE}_{\text{Lit}} = 169,0$ eV, K_2SO_4 $\text{BE}_{\text{Lit}} = 169,1$ eV und Na_2SO_4 $\text{BE}_{\text{Lit}} = 168,8$ eV (TURNER et al. 1980), deren BE höher liegen und über S $2p_{3/2}$ und S $2p_{1/2}$ gemittelt werden. Ebenso wurden Übereinstimmung mit Cysteinsäure gefunden, deren S $2p_{3/2}$ Peak bei BE = 168 eV liegt (BEAMSON und BRIGGS 1992). Die Verhältnisse der beiden schwefelhaltigen Komponenten betragen $[\text{Sulfid}]:[\text{Sulfat}]_{\text{Hautoberfläche}} = 1,45$ und $[\text{Sulfid}]:[\text{Sulfat}]_{\text{Geloberfläche}} = 2,24$.

4 Diskussion

4.1 Elektronenoptische und histochemische Eigenschaften des Stratum corneums und des Gels

4.1.1 Bewuchskontrolle

Durch den Einsatz von Tieftemperatur-Konservierung in Verbindung mit kryorasterelektronenmikroskopischen Techniken war es erstmalig möglich, eine Bewuchskontrolle an einer chemisch unbeeinträchtigten Delfinhaut durchzuführen (BAUM et al. 2000, BAUM et al. 2002A). Bei der intensiven Absuche von Hautproben unterschiedlicher Tiere, Altersgruppen, Geschlechter, sowie von Delfinen aus verschiedenen Fängen und Sammel-Expeditionen wurden nur gelegentlich epibiontische Organismen gefunden. Ein pathologischer Befund von einem Individuum, dessen Haut nahezu vollständig von Kieselalgen bedeckt war, verdeutlicht demgegenüber das hohe Reinigungspotential der gesunden Haut. Die Ergebnisse dieser Bewuchskontrolle bestätigen den Eindruck einer geringen epibiontischen Belastung von fixierten Hautproben verschiedener anderer Delfin-Spezies (HARRISON und THURLEY 1972 und 1974, LING 1974, HALDIMAN et al. 1985, LIU et al. 1986, PFEIFFER 1992, PFEIFFER und JONES 1993, PFEIFFER und ROWNTREE 1996). Aus den Befunden wurde geschlossen, dass sich die untersuchten Pilotwale größtenteils erfolgreich gegen epibiontischen Aufwuchs wehren können. Zu den für Delfine typischen teils pathogenen Epibionten zählen Bakterien und Mikroalgen (LING 1974, HOLMES 1985, DUNN 1990, USHAKOWA 1991, GOL'DIN 1994, DENYS 1997, BAUM et al. 2000), sowie Kleinkrebse und Nematoden (DIERAUF 1990, MARINIELLO et al. 1994). Der hier beschriebene geringe Aufwuchs der Delfinhaut steht im Kontrast zu dem starken Bewuchs meerestechnischer Anlagen und Schiffsrümpfe und begründet die Annahme, dass die Delfinhaut ein geeignetes Vorbild für die Entwicklung umweltneutraler Bewuchsschutzoberflächen sein könnte.

4.1.2 Enzymatische Kontrolle der Desquamation

Wie von den Untersuchungen von SPEARMAN (1972), LING (1974) und MEYER et al. (1995) bekannt ist die Haut der Delfine im Gegensatz zur Haut der Fische drüsenlos. Hiervon abgeleitet wurde die Hypothese, dass die Selbstreinigungseigenschaften der Delfinhaut auf den Besonderheiten jeder einzelnen Hautzelle und ihrer näheren Umgebung beruht. In diesem Zusammenhang konzentrierte sich diese Untersuchung zum einen auf die Übergangszone (Stratum granulosum) zwischen dem lebenden Stratum spinosum und dem degenerierenden Stratum corneum und zum anderen auf das Stratum corneum der Epidermis. Das Stratum corneum ist die Abschlußschicht der Haut; in dieser Hautschicht werden durch enzymatische Abbaureaktionen Reorganisationen und Destruktionen des Zellmaterials hervorgerufen (SPEARMAN 1972, MEYER 1986, PIERARD et al. 2000, BAUM et al. 2001B). Im Zuge der Hautabschuppung, Desquamation, gehen Zellen an der Hautoberfläche verloren, deren Platz von den tieferliegenden Zellen eingenommen wird. Diese kontinuierliche Aufwärtsverlagerung ist im Stratum corneum gekennzeichnet durch strukturelle Abwandlungen der Zellen und Interzellularräume, und, wie im Fall der Delfinhaut, durch eine Zunahme an Kompaktheit des Zellverbandes sowie die Vernetzung von interzellulären makromolekularen Substanzen zur Hautoberfläche hin (BAUM et al. 2001B, siehe unten).

Wie bereits in Untersuchungen zu den chemischen Selbstreinigungsmechanismen der Delfinhaut festgestellt (BAUM et al. 2001B) beruhen diese im besonderen Maß auf der Anwesenheit eines breiten Spektrums an Gel-integrierten, hydrolytischen Enzymen. Wie von den landlebenden Säugern bekannt handelt es sich bei diesen Enzymen vor allem um Proteasen und Glykosidasen, die die Abschuppung der Hautzellen durch Spaltung der desmosomalen Haftbrücken vorbereiten (vgl. NEMANIC et al. 1983, LUNDSTROM und EGELRUD 1988, SUZUKI et al. 1996). Im Fall der Delfinhaut (BAUM et al. 2001B) werden die Enzyme zusammen mit einer Gelmatrix in den Interzellularraum der Übergangszone (dunkler Bereich in Abbildung 4-1) abgegeben. Positive Nachweisreaktionen wurden ebenso in den obersten Interzellularräumen des Stratum corneums (Abb. 4-1, Pfeile) und an der Hautoberfläche erhalten. Nach NEMANIC et al. (1983) macht sich die hydrolytische Wirkung der Proteasen und Gly-

kosidasen morphologisch durch Formveränderungen der Desmosomen bemerkbar. Dieser für landlebende Säuger gültige Befund wird durch kryorasterelektronenmikroskopische Ergebnisse an Epidermisquerschnitten für die Haut des Pilotwales bestätigt. Der Schichttiefen-bezogene Vergleich der Desmosomen innerhalb des Stratum corneums der Epidermis des Pilotwales zeigt (siehe Abb. 3-8), dass sich die Form der Interzellularbrücken von einer Stäbchenform im Übergangsbereich zu einer verhakten Form in Richtung Oberfläche veränderte und der Grad an Kompaktheit des Zellverbandes zunahm.

Die hydrolytischen Enzyme können aufgrund ihrer pH-abhängigen Umsatzgeschwindigkeit zwei größeren pH-Optima zugeordnet werden (um pH 6 und 8). In Bezug auf den pH-Wert des Meerwassers (gepuffert bei etwa pH 8) waren die an der Hautoberfläche gefundenen Esterasen und Peptidasen in ihrem optimalen pH-Bereich. Die Glykosidasen waren dagegen reaktiver bei einem pH von ungefähr 6 (Haut-interner pH-Wert um pH 6,3) und vermutlich an der Hautoberfläche weniger reaktiv.

In Bezug auf die oben beschriebenen morphologischen Veränderungen der Desmosomen sowie die beiden verschiedenen pH-Optima von Peptidasen und Glykosidasen ergibt sich ein Ablauf der Hautabschuppung, der dem von landlebenden Säugern ähnlich ist (NEMANIC et al. 1983, LUNDSTROM und EGELRUD 1988, SUZUKI et al. 1996): In den unteren Schichten des Stratum corneums spalten Glykosidasen solche Glykoproteine, die die Interzellularbrücken vor Proteasen schützen. Mit zunehmender Nähe zum Meerwasser werden Proteasen und Esterasen aktiver, die die Interzellularbrücken angreifen, wodurch sich der stoffliche Zusammenhalt der obersten Zellen verringert und eine Abschuppung ermöglicht wird.

Als Besonderheit der Delfinhaut ist zu nennen, dass die Enzyme durch eine voranschreitende Gelbildung in einer Matrix räumlich voneinander getrennt fixiert werden, die deren Abdiffusion verhindert (BAUM et al. 2001B, 2002B). Durch die Änderung des pH-Wertes in oberflächlichen Schichten wird zudem die Hydrolyse des an Glykoproteinen reichen Gels herabgesetzt. Da die Abbaureaktionen von Glykosidasen und Proteasen durch den abiotischen Faktor Meerwasser pH-Wert mitbeeinflusst werden, ordne ich dem Meerwassers pH eine schaltende Funktion zu, der sich im besonderen bei dieser Gruppe mariner Säuger auf den Ablauf der Abschuppung auswirkt.

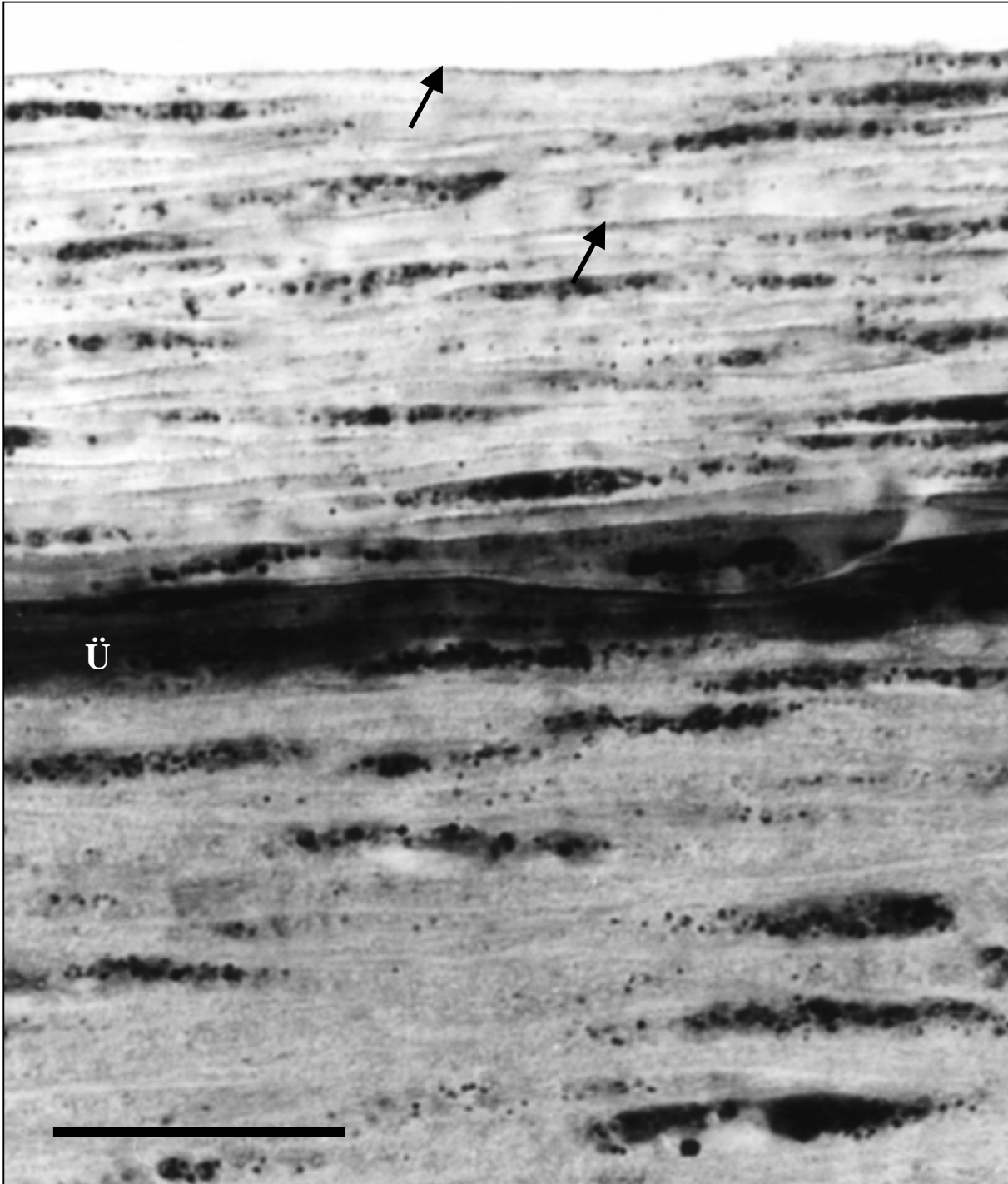


Abb. 4-1: Histochemischer Nachweis von Alanyl-Arylpeptidase Reaktionen in der oberen Epidermis des Pilotwales, *Globicephala melas* (Abbildung aus BAUM et al. 2001B). Im Stratum corneum treten Nachweisreaktionen meist interzellulär sowie an der Hautoberfläche (Pfeile) auf. Übergangszone (Ü). Maßstab 20 μm .

In Folge dieser Schaltwirkung entsteht ein hydrolytischer, mit Gel gefüllter Interzellularraum, der auch an der Hautoberfläche hydrolytisch wirksam ist (BAUM et al. 2001A, 2001B, 2002B).

In dem Bestand an hydrolytischen Enzymen wurde saure Phosphatase nachgewiesen (BAUM et al. 2001B). Dieses Enzym ist nach MEYER (1986) ein Markerenzym für eine langsame, nur schwach destruktive Verhornung des Stratum corneums, bei der epidermale Makromoleküle nur wenig abgebaut werden. Diesem langsamen und unvollständigen Abbau entspricht das häufig beschriebene elektronenoptische Eigenschaftsbild des Corneocyten der Delfinhaut in seiner sehr feinen intrazellulären Granulierung und der Anwesenheit von elektronendichten Depositen in seiner interzellulären Umgebung (vgl. GERACI et al. 1986). Dieses Eigenschaftsbild zeigt sich elektronenoptisch auch in dieser Untersuchung für das Stratum corneum des Pilotwales (Abb. 3-14 und 3-16) und wird vermutlich mechanisch durch die Kompression der Zellen der Übergangszone gegen das Stratum corneum überstützt. Diese Kompression geht vermutlich auf den hydraulischen Druck zurück, den das Stratum spinosum auf das Stratum corneum ausübt.

Die Anwesenheit der sauren Phosphatase und die Histologie der Corneocyten deuten als starken Hinweis darauf, dass die Verhornung bei Delfinen im Gegensatz zu den Angaben von BROWN et al. (1983) und HICKS et al. (1985) langsamer als bisher angenommen abläuft. Die obengenannten Autoren leiteten aus der Migrationszeit radioaktiv markierter Zellen und der Anzahl und der Flächenbedeckung der epidermalen Bildungszellen (basale Keratinocyten) im Verhältnis zur Anzahl und Flächenbedeckung der sich abgeschuppenden Zellen (Corneocyten) für den Tümmler *Tursiops truncatus* eine Abschuppungsrate von 12 Zell-Lagen pro Tag ab (entspricht dem zehn- bis zwölf-lagigen Stratum corneum dieser Delfin-Species). Diese Abschuppungsrate läßt sich in Bezug auf die hier experimentell bestimmte Gelbildungszeit bewerten (siehe Abb. 3-26). Für ein etwa zwölf-lagiges Stratum corneum mit einer Abschuppungsrate von 2 Stunden pro Zelle muß der in dieser Untersuchung befundene Übergang vom Sol zum Gel anstelle von 5,5 Stunden demnach schon innerhalb von zwei Stunden abgeschlossen sein. Dieser Zeitraum weist im Gegensatz zur gemessenen Gelbildungszeit eine Unterdeckung von etwa 2,5 Stunden auf. Bei der kritischen Analyse der von BROWN et al. (1983) und HICKS et al. (1985) durchge-

fürten Berechnung ist mir die Verwendung eines nicht weiter diskutierten geometrischen Faktors aufgefallen. Dieser skalierende Faktor bezieht sich auf die Vergrößerung des Stratum basale durch dessen Auffaltung (basal area) im Verhältnis zum nicht aufgefalteten Stratum corneum (superficial area) und wird als Multiplikator verwendet. Die Verwendung dieses Multiplikators ist unstimmtig mit der Tatsache, dass dieser Faktor bereits in der Betrachtung (ursprünglich BERGSTRESSER und TAYLOR 1977) der Flächenbedeckung von basalen Zellen zu Corneocyten enthalten ist. Da die Abschuppungsrate unter steady-state Bedingungen auf die Dauer der Zellerneuerungsrate zurückgeht, die wie von BROWN et al. (1983) auf ungefähr 13 Tagen pro Zellzyklus bestimmt wurde und damit im Rahmen anderer Säuger liegt (BERGSTRESSER und TAYLOR 1977), und sich die Abschuppungsrate von der Zellerneuerungsrate durch den Einbezug des Quotienten aus sich bildender Fläche und sich abschuppender Fläche unterscheidet (BERGSTRESSER und TAYLOR 1977), muß diese hohe Abschuppungsrate auf die geometrischen Faktoren und die Häufigkeit der basalen Zellen (sie ist in der Tat durch die Auffaltung sehr hoch) als Besonderheit der Delfinhaut zurückgeführt werden. Zieht man die Messwerte von BROWN et al. (1983) zur Rekalkulation der Abschuppungsrate heran, liegen bei *Tursiops truncatus* unterhalb einer Zelle des Stratum corneums (mit einer Fläche von $4456 \mu\text{m}^2$) 72 Zellen des Stratum basale (mit einer Fläche von $61,5 \mu\text{m}^2$), von denen etwa 7% Melanocyten ausmachen. Diese hohe Zellzahl ist auf die Auffaltung des Stratum basale entlang der dermalen Papillen zurückzuführen und erscheint aufgrund der Mehrlagigkeit des Stratum corneums ebenfalls schlüssig. Da sich diese 72 Zellen einen „Abschuppungsplatz“ teilen, durchlaufen bei einer Zellzyklusdauer von 13 Tagen pro Zelle innerhalb von 13 Tagen 72 Zellen diese Stelle. Die entsprechende Abschuppungsrate beträgt demnach 5,5 Zellen pro Tag (0,23 Zellen pro Stunde oder alle 4,4 Stunden eine Zelle). Bei einem zwölf-lagigem Stratum corneum steht zur Gelbildung deshalb ein Zeitraum von 2,2 Tagen oder 4,4 Stunden pro Zelle für den Übergang der Interzellulärsubstanz vom Sol zum Gel zur Verfügung, so dass auf der Grundlage der experimentell ermittelten Gelbildungszeit und der beobachteten Konsistenz der Interzellulärsubstanz eine Abschuppungsrate von 5,5 Zellen pro Tag noch im Rahmen rheologischer Randbedingungen liegt. Vermutlich ist dieser Wert, der sehr stark von der exakten Bestimmung der überdeckten Flächen abhängig

ist, aber dennoch zu hoch angesetzt. Da Argumente dafür gefunden werden können, dass die Abschuppung langsamer abläuft als bisher angenommen scheinen kurzfristiger wirkende Selbstreinigungseigenschaften für Delfine an Bedeutung zu gewinnen. Dieser Schutz wäre durch die an der Körperoberfläche liegenden gelintegrierten hydrolytischen Enzyme und durch Reinigen der glatten Haut durch Springen gegeben.

4.1.3 Enzymatische Bewuchskontrolle

Aufgrund ihrer erschwerten Abdiffusion in das Meerwasser können die Enzyme der Delfinhaut eine Schutzfunktion an der Hautoberfläche ausüben (BAUM et al. 2001B). Vergleichbare Ergebnisse enzymatischer Abwehrmechanismen gegen Bakterien und Pilze wurden bei Fischen beschrieben (NAKAGAWA et al. 1987, ALEXANDER und INGRAM 1992, WIRTH 1999, Firth et al. 2000). Es scheint im Rahmen des Möglichen, dass die Proteasen der Delfinhaut viele im Meerwasser schwebenden, haftfähigen, Aminosäure-haltigen Makromoleküle spalten. Eine besondere Rolle bei der Abwehr von Schleimen und Mikroorganismen kommt den Glykosidasen zu. Wird berücksichtigt, dass ein pH-Wert zwischen 6 und 7 für die Oberfläche von anhaftenden Mikroorganismen kennzeichnend ist, den DAGASTINO et al. (1991), VANDEVIVERE und KIRCHMAN (1993) und BEVERIDGE et al. (1997) auf die Anwesenheit von neutralen bis leicht sauren funktionellen Gruppen an der Oberfläche dieser Organismen zurückführen, werden durch die Besiedler pH-Werte an der Hautoberfläche erzeugt, die für die Glykosidasen im pH-Optimum liegen. Die von Mikroorganismen geschaffene Umgebung reaktiviert vermutlich solche hydrolytischen Enzyme der Delfinhaut, die im Fall einer Besiedlung durch diese Organismen deren saure Adhäsionsmoleküle zersetzen können. Dies hat zur Folge, dass sich die Fließfähigkeit dieser Makromoleküle erhöht, wodurch sich in nächster Konsequenz die Ablösung durch Luftblasen und Scherströmung erheblich verbessert. In Bezug auf das bionische Re-Design von Bewuchsschutzfarben weisen die enzymatische Untersuchungen an der Delfinhaut aus, dass Bewuchsschutzfarben, die Enzyme enthalten, vorteilhafterweise sowohl mit Peptidasen und Esterasen sowie mit Glykosidasen ausgestattet sein

sollten, um eine optimale Erhöhung der Fließfähigkeit adhäsiver biologischer Makromoleküle zu gewährleisten.

4.1.4 Gelbildung im Stratum corneum

Nach dem Konzept von GERACI et al. (1986) sind die Corneocyten der Delfinhaut von einem makromolekularen Coating umgeben. Dieses Coating ist eine Besonderheit der Haut dieser marinen Säuger und unterscheidet sich von der Haut landlebender Säuger durch die Abwesenheit von lamellären Körperchen (engl. membran-coating granules, MCG) (PFEIFFER und JONES 1993, eigene Befunde), die diese vor Feuchtigkeitsverlust schützen (GERACI et al. 1986, LANDMANN 1988). Das Coating wurde von GERACI et al. (1986) als Anpassung an den marinen Lebensraum interpretiert und beruht konzeptionell auf transmissionselektronenmikroskopischen Beobachtungen von elektrophilen, osmiophilen Depositen im Interzellularraum des Stratum corneums (HARRISON und THURLEY 1974, GERACI et al. 1986). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigen die Ergebnisse von GERACI et al. 1986 und zeigten zudem, dass die Interzellulärsubstanz von den Zellen des Stratum granulosum, d.h. der Übergangszone zwischen Stratum spinosum und Stratum corneum abgegeben wird. Mit zunehmender Nähe zur Oberfläche veränderte sich die Konsistenz der Interzellulärsubstanz. Die Konsistenzveränderung machte sich kryo-rasterelektronenmikroskopisch durch einen Dehydratisierungsgradienten sowie transmissionselektronenmikroskopisch durch eine Größenveränderung chemisch fixierter Aggregate bemerkbar, wobei die Dehydratisierung im Interzellularraum der Übergangszone höher als in den oberflächennahen Interzellularräumen ausfiel und in der Übergangszone kleinere Aggregate als an der Oberfläche auftraten. Von der Größenveränderung der Aggregate, die bei gleichem Vernetzungsgrad der interzellulären Komponenten nicht zu beobachten gewesen wären, wurde auf deren chemische Vernetzung geschlossen, die vor der Fixierung aufgetreten sein mußte. Auf dieser elektronenoptischen Vergleichsbasis ist es erstmalig möglich, die interzelluläre Gelbildung während der Alterung des Stratum corneums auf chemische Vernetzungsreaktionen zurückzuführen.

In der vorliegenden Untersuchung wurden an unbehandelten Hautproben des Pilotwales durch Gefriertrocknung strukturelle Differenzierungen des Stratum corneums und der Hautoberfläche erzeugt. Die graduelle Differenzierung des Gewebes erfolgte entlang des Wassergehaltes. Dabei erfuhren dehydratisierbare, stark wasserhaltige kolloide Bereiche noch vor vernetzten Strukturbereichen Formveränderungen, während die nicht dehydratisierbaren Fettanteile keiner Formabwandlung unterlagen. Unter Verwendung dieser Methode zeigten die Ergebnisse, dass wie oben beschrieben, die Interzellularräume der Übergangszone und des unteren Stratum corneums im Gegensatz zu den Interzellularräumen des oberen Stratum corneums und der Hautoberfläche während der Gefriertrocknung leichter Wasser abgeben. Das Dehydratisierungsverhalten der Interzellularräume der Hautoberfläche stimmte mit dem Dehydratisierungsverhalten der Interzellularräume der 5 bis 6 tieferliegenden Schichten überein. Dieses Ergebnis ist nur möglich, wenn eine sehr ähnliche stoffliche Zusammensetzung (der Anteil von Wasser, Kolloiden und Fetten) in beiden Fällen vorliegt. Unter Anwendung dieses Konsistenz-Kriteriums ist es möglich, die Herkunft der mit Gel gefüllten meerwasserseitigen Interzellularräume auf die Substanzen der Interzellularräume tieferer Schichten zurückzuführen. Da keine Konsistenzunterschiede zu den tieferliegenden interzellulären Schichten gefunden wurden, schließen die kryo-rasterelektronenmikroskopischen Ergebnisse desweiteren aus, dass der Porenraum der obersten Corneocyten mit Schleimen oder anderen Produkten des Biofoulings verunreinigt ist, weil diese Produkte mit einem anderen Wasser- und Kolloidgehalt ein vom Gel unterscheidbares Dehydratisierungsverhalten zeigen. Wird berücksichtigt, dass die Abschuppung der Zellen zu einer gleichverteilten Aufteilung der mit Gel gefüllten Interzellularräume zwischen den sich trennenden Zellen führt, dann zeigt sich, dass die hier gefundenen interzellulären Substanzen derart inniglich mit der Hautzelle verbunden sind, so dass alle Produkte, die nicht der Delfinhaut entstammen, der Haut aufgelagert bleiben und nicht in die Poren eindringen können. Dieser Befund ist auch auf der Basis der hohen Elastizität und Integrität des Gels plausibel, das in den obersten Interzellularräumen ausreift und nur unter erhöhtem Scherstress (mehr als 8×10^3 Pa bei niedrigen Frequenzen, siehe Deformations-Test 3.4, S. 65) aus dem Porenrelief der Hautoberfläche entfernt werden kann (siehe unten).

Querschnitte des Glutaraldehyd-fixierten, polymerisierten Fluids, das nach Zentrifugation des Stratum corneums der Epidermis des Pilotwales gewonnen wurde, zeigten ein fein strukturiertes proteinhaltiges Netzwerk, in das viele durch Osmium stabilisierte Lipidtröpfchen eingebunden waren. Die Lipidtröpfchen waren immer von Membranen umgeben. Da Lipidtröpfchen dieser Größe im Stratum corneum der Delfinhaut typisch sind (MENON et al. 1986, PFEIFFER und JONES 1993), gehe ich davon aus, dass der Einfluß der Zentrifugation auf die Phasenverteilung von wässriger, proteinreicher und fetthaltiger Phase ausreichend schonend gewesen ist, um relevante Aussagen über das Fluid besonders im Hinblick auf dessen rheologische Eigenschaften zu ermöglichen. Ich vermute, dass die Lipidtröpfchen-ummantelnden Membranen während der Zentrifugation wesentlich zur mechanischen Stabilität der Tröpfchen beitragen und die Fusion von Lipidtröpfchen im Schwerfeld erschweren. Aus der Lage der Membranen zwischen den unmischbaren polaren und unpolaren Phasen wurde auf deren amphiphilen Charakter geschlossen. Unter der Annahme, dass das Biogel der Delfinhaut ein typisches Hydrogel ist, indem sich dreidimensionale makromolekulare Netzwerke in einer Salzlösung befinden, deutete die Anwesenheit von Membran-umschlossenen Fettröpfchen auf eine dritte Phase hin. Vermutlich sorgen die Membranen für eine stoffliche Kopplung zwischen den beiden unmischbaren Phasen. In einem solchen Multiphasen-System kann eine stoßweise eingetragene hohe Energie, wie sie beispielsweise während der Zentrifugation auftritt, auf mehrere Phasen verteilt werden. Bei Delfinen scheint sich ein Multiphasen-System als Anpassung an hohe mechanische Stressereignisse wie beispielsweise Sprünge entwickelt zu haben: In Form eines viskoelastischen Körpers, stabilisiert über lokale Gelstrukturen, dämpft das Multiphasen-System durch stofflich determinierte mechanische Kopplung die hohen mechanischen Belastungen (vergleiche rheologische Ergebnisse, Abschnitt 3.4).

Bei den topologischen Untersuchungen wurden neben den Lipidtröpfchen (0,1 bis 5 μm) in der interzellulären Gelmatrix ausgedehnte Lipidareale (bis zu 300 μm) an der Hautoberfläche (Abb. 3-2) gefunden, die sich bei der Gefrierätzung nicht dehydratisieren liessen. Hinweise auf eine mehrphasige Gelmatrix liessen sich ebenso aus den rheologischen Untersuchungen und den oberflächen-chemischen Analysen ableiten (siehe unten). Da die biologische Bedeutung der topologischen und chemi-

schen Heterogenität vermutlich nicht ausschließlich mit den rheologischen Eigenschaften in Zusammenhang steht, erwarte ich von weitergehenden Untersuchungen zur „Biophilie“ und „Biophobie“ einen wertvollen Wissenszuwachs in Bezug auf die Selbstreinigungseigenschaften der Delfinhaut.

4.1.5 Topologische Bewuchsschutzkontrolle

Die untersuchte Hautoberfläche war neben der Anwesenheit eines interzellulären Gels von den topologischen Besonderheiten der Zelloberflächen geprägt. Im Vergleich zu den Ergebnissen von GUCINSKI (1986), der eine durchschnittliche Rauigkeit der Hautoberfläche von 0,9 bis 8,7 μm aus Untersuchungen von Polysulfid-Replicas (Dental-Wachs) an der Haut des Tümmlers *Tursiops truncatus* und des Schwertwales *Orcinus orca* mit Hilfe eines Perthometer Rauigkeit-Analysators bestimmte, zeigte die Zelloberfläche der äußeren Hautzellen des Pilotwales kryorasterelektronenmikroskopisch lediglich nanorraue laterale Erhebungen von unter 0,03 μm . Strukturgebend waren kleine regelmäßige Spitzen, die von einem Gelmedium umgeben waren (vgl. BAUM et al. 2002). Die Rauigkeit der Zelloberfläche ließ sich durch Gefriertrocknung, chemische Fixierung und Trypsinierung auf das 10-fache erhöhen. Das resultierende in der Aufsicht honigwabenförmige Relief mit einer Tiefe von 0,3 μm (durch eine rasterkraftmikroskopische Untersuchung an chemisch fixierter Haut bestätigt, unveröffentlicht) wurde durch seine Unverdaulichkeit mit Trypsin (WALSH und CHAPMAN 1991) als Relief der desmosomalen Glykoproteine identifiziert. Dieses Netzwerk bildete annähernd hexagonale Poren, die zu 90 % der Größenfraktion von 0,1 bis 0,2 μm^2 angehörten. Der Vergleich dieser engen Porengrößenverteilung mit der Größe von Mikroorganismen und Mikroalgen, die bis auf wenige Ausnahmen größer als 0,2 μm^2 sind, zeigte, dass die Anheftung solcher Organismen auf die Spitzen oder die Ränder des Netzwerkes beschränkt bleiben müssen und damit eine wesentliche Erleichterung der Abreinigung auf der Basis reduzierter Kontaktflächen an der Hautoberfläche des Pilotwales eintritt (BAUM et al. 2002A). Neben der engen Porengrößenverteilung ist eine große Ähnlichkeit der Porengeometrie mit der hexagonalen Honigwabenform vorhanden, von der sich das desmosomale Relief der Corneocyten durch die Verlagerung der Porenränder in die

Tiefe unterscheiden. In Bezug auf die Verringerung der Kontaktfläche kann diese Unterstrukturierung (vgl. Abb. 3-6) als zusätzliche Option angesehen werden, durch die eine Anheftung auf wenige Kontaktpunkte mit dem harten Substrat der Desmosomen (im Vergleich zum Gel) beschränkt wird (siehe Abb. 3-6 und 4-2). Das Nanorelief stellt eine Schutzstufe auf topologischer Basis dar, die auch dann erhalten bleibt, wenn durch zu starke mechanisch Belastung Gel aus dem Porenraum entfernt wird.

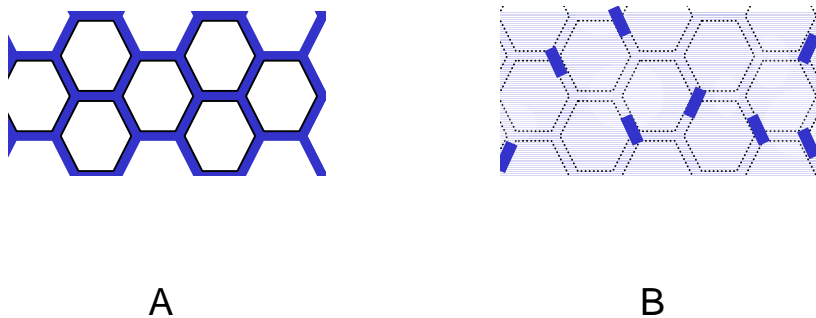


Abb. 4-2: Größenausschluß von marinen Mikroorganismen durch Porenbildung zur Verminderung von Kontaktflächen. Aufsicht auf eine honigwabenhähnliche Strukturierung (A). Die Reduktion der Kontaktfläche an der Oberfläche des Corneocyten wird durch die Verlagerung der Ränder in die Tiefe verstärkt (B). Das Muster B ist kennzeichnend für die Delfinhaut ohne Gelfüllung. Die Gelfüllung der (wasserseitigen) interzellulären Poren enthält intakte Enzyme. Diese Enzyme verdauen marine adhäsive Stoffe und erhöhen deren Fließfähigkeit. Durch die Kombination von porenformender Substanz (Nanorelief) und porenfüllender chemisch aktiver Substanz (Gel) werden Nischen für Schleime und Biofouler ausgeschlossen.

Es ist im Vergleich zu den Delfinen auffällig, dass auch Fische und Wasserpflanzen eine glatte Bedeckung der Körperoberfläche aufweisen. Bei Fischen verhindern die mukoiden und an Glykoproteinen reichen dünnen Schleimschichten den direkten Kontakt von Biofoulern mit dem Körper. Diese Schleimbarriere wird von desmosomalen Erhebungen von 2 - 10 µm auf der Oberfläche der Keratinocyten gehalten

(BEREITER-HAHN et al. 1979, MITTAL et al. 1995, WIRTH 1999). Damit zeigen die Oberflächen der Keratinocyten der Fische und der Delfine einen vergleichbaren kompositen Aufbau aus Stoffen unterschiedlicher Konsistenz. Vermutlich spiegeln sich die Unterschiede in der Elastizität der körperdeckenden Gele in Form der Porentiefe wieder (je steifer das Gel ist, desto höher ist sein Grip in kleineren Poren). Die Elastizität des Gels wiederum könnte von der Höhe der Belastung (Schwimmen versus Springen), dem Grad der Umströmung und der Körpermasse abhängig sein. Diese dynamischen Einflußgrößen lassen sich auch auf sessile Wasserpflanzen übertragen, deren Belastung aufgrund der Standorttreue geringer ausfällt und deren Schleimhüllen nicht durch besondere Porenreliefe an der Körperoberfläche gehalten werden (Abb. 4-3). Es ist deshalb zu vermuten, das sich vergleichbare, analoge Eigenschaften der Körperbedeckung mehr als einmal in der Evolution entwickelt haben (siehe Fische, Delfine und Wasserpflanzen wie beispielsweise bei der Kanadischen Wasserpest *Elodea canadensis* (Abb. 4-3)). Da mikrorauere Erhebungen wie von Insekten und Pflanzen bekannt bei Delfinen durch die Störung der laminaren Grenzschicht einen negativen Einfluß auf die hydrodynamische Effizienz haben können, haben sich vermutlich nicht wie bei Fischen mikrorauere sondern nanorauere Oberflächen als Biogel gefülltes Nanorelief in dieser Säugergruppe entwickelt.

Nach Nachtigall (2000) suchen Mikroorganismen Nischen in der Grenzschicht laminarer Strömungen als Habitate auf. Solche Nischen fehlen an der Hautoberfläche der Delfinhaut und deren Abwesenheit kann ein Grund für die geringe Organismendichte sein. In Hinblick auf die Scherkräfte, die für eine Abreinigung erforderlich sind und besonders in Nischen gering ausfallen (SCHLICHTING und GERSTEN 1997, NACHTIGALL 2000) sowie den hydrodynamischen Vorzügen einer laminaren Grenzschicht, ergab sich in dieser Untersuchung ein Zusammenhang zwischen den spezifischen und hydrodynamischen nanorauen Strukturen und den hydrodynamischen Bedürfnissen und dem Schwimm- und Sprungverhalten von Delfinen. Es wurde vermutet, dass die Reinigung durch Delfin-typisches Sprungverhalten induzierbar ist, aber nicht per se durch Schwimmen stattfindet. Diese Einschränkung trägt der biologischen Bedeutung Rechnung, laminare Umströmung und Bewuchsminderung optimal miteinander zu verbinden.

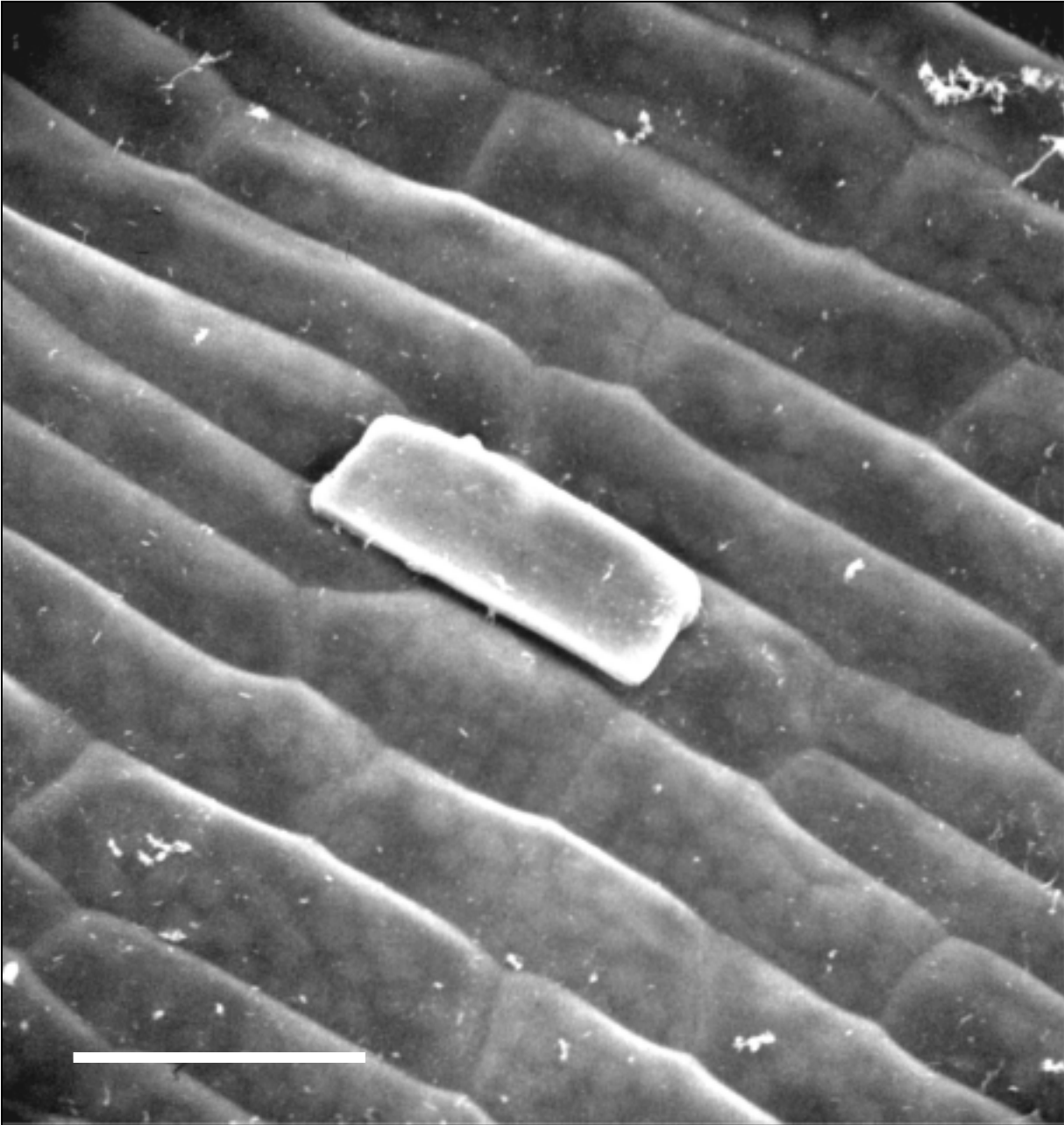


Abb. 4-3: Kryo-rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von der Blattoberfläche der kanadischen Wasserpest, *Elodea canadensis*. Vergleichbar mit der Delfinhaut findet sich auch hier eine gelbedeckte Oberfläche. Im Gegensatz zur Delfinhaut weist die Blattoberfläche keine Mikro- oder Nanostrukturierungen auf. Maßstab 10 μm . (Dr. Ralf Stelzer, Christof Baum)

Es ist bei dieser Ausführung zu beachten, dass die Poren der Delfinhaut real mit einem Zymogel gefüllt sind. Die Gelfüllung der Poren wird von mir als Hinweis darauf gedeutet, dass eine Abwehr von Kontaminationen, die kleiner als Biofouling-Organismen ausfallen, wegen ihrer molekularen Größe nicht mehr ausreichend durch topologische Strukturierungen möglich ist. An deren Stelle tritt die obengenannte chemisch basierte Verteidigung.

Obwohl noch nichts über die Dynamik der Anheftungs-Abtragvorgänge bekannt ist, ist dieser sterische Größenausschluss und die damit verbundene Abwesenheit von Mikronischen eine wesentliche Voraussetzung für die Reinigungsvorgänge, die mit Hilfe von Luftblasen und Scherströmungen während der Delfinsprünge erzeugt werden. In Analogie zur Hautreinigung mittels Luftblasen bei Delfinen findet dieser Mechanismus praktische Anwendung beispielsweise bei der Vorreinigung von Computer-Grundbausteinen (Wavern) oder der Gebißreinigung (z.B. Correga-Tabs) (vgl. SUAREZ et al. 1999, SUAREZ 2001). In Versuchen mit künstlichen Oberflächen, die wie die Delfinhaut glatt waren, zeigte die Autorin, dass nach mehreren Passagen von Luftblasen etwa 80% aller Oberflächen-adsorbierten Partikel (Polystyren-Kügelchen, Kolloide und Mikroorganismen) unabhängig von der Benetzbarkeit der Oberfläche entfernt wurden. Dabei führte der starke desorptive Charakter der Luftblasenreinigung zur Verdünnung von Biofoulern. Ich vermute deshalb, dass die aus den Ergebnissen von SUAREZ (2001) abgeleiteten Reinigungsfähigkeiten von Luftblasen neben dem Abtrag der Organismen auch die Verdünnung von Signalmolekülen wie beispielsweise Lactonen unterstützen, die Bakterien zur Initiation der Koloniebildung verwenden (siehe FLEMMING und WINGENDER 2001), und damit zusätzlichen Schutz gegen Aufwuchs bieten. Im Hinblick auf den Wirkmechanismus der Luftblasenreinigung beschrieb SUAREZ (2001), dass an hydrophilen (wasserliebenden) Oberflächen die Kontaktzeit zwischen Testpartikel und Luftblase sowie deren kinetische Energie die Reinigung beeinflusste und der Kontakt mit Luftblasen an hydrophoben (wasserabweisenden) Oberflächen zur Entnetzungen der Oberfläche führte. Diese Entnetzung verstärkte die Verdünnung der Wasserschicht zwischen Partikel und Luftblase und verbesserte ihren desorptiven Charakter. An beiden Oberflächenarten überwand die kinetische Energie der Luftblase das elektrostatische Potential der adsorbierten Testpartikel.

4.1.6 Axiom der Kontaktflächenreduktion

Eine Verkleinerung der effektiven Anheftungsmöglichkeiten für Verschmutzungen ist beispielsweise von Insekten und Pflanzen bekannt (WAGNER et al. 1996, BARTHLOTT und NEINHUIS 1997). Bei diesen Lebewesen vermindern mikrorauhe, wachshaltige Erhebungen von 1-10 μm die Anzahl von Kontaktpunkten für Kontaminationen.

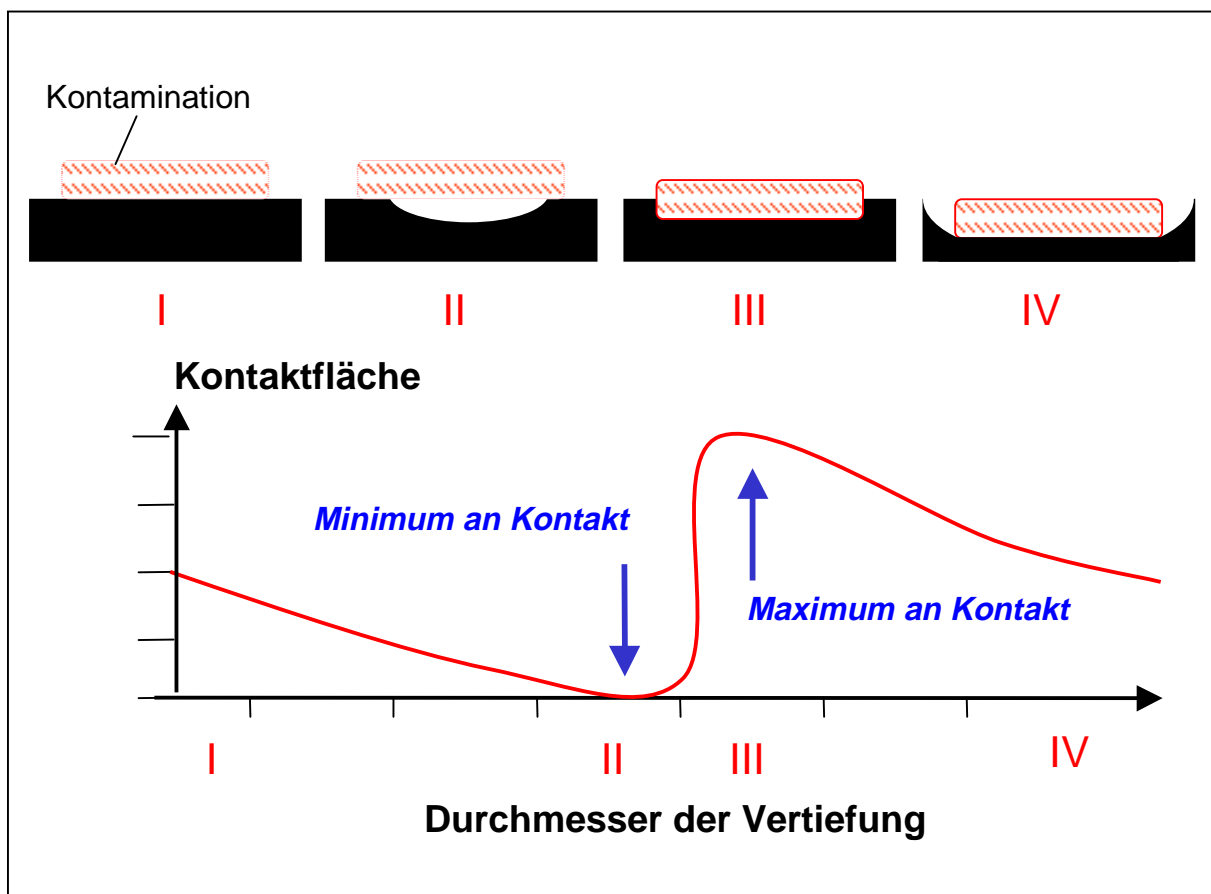


Abb. 4-4: Theoretische Ableitung minimaler und maximaler Kontaktflächen in Abhängigkeit vom Durchmesser einer Vertiefung (I-IV) unterhalb der Auflagefläche einer partikulären Kontamination. Die hier diskutierte Verringerung von Kontaktflächen für Biofouler ($< 0,2 \mu\text{m}^2$) als eine „bio-relevante Anpassung“ einer Porengeometrie folgt aus der Überlegung, dass gerade dort ein Minimum an Kontakt entsteht, wo wenig Unterstützungspunkte für einen Organismus existieren.

Aufgrund der Häufigkeit von Kontaktflächenreduktionen bei verschiedenen biologischen Oberflächen kann von ihrer großen biologischen Bedeutung ausgegangen werden. In Abhängigkeit der Partikelgrößenverteilung kontaminierender Teilchen vermindert die topologische Skalierung einer schmutzbelasteten Oberfläche in Form von Vertiefungen (Größenausschluss) die Kräfte, die zur Überwindung der Adhäsion solcher partikulären Kontaminationen bei ihrer Ablösung erforderlich sind (Minimum an Kontakt, Abb. 4-4, vgl. EDWARDS und RUTENBERG 2001). Aus der Untersuchung an der Delfinhaut geht hervor, dass die Porigkeit der Oberfläche auf ein Minimum an Kontakt selektiert wurde. Der stärkste Hinweis hierfür ist die enge Häufigkeitsverteilung der Poren, die zu 90% unterhalb der Größe von marinen Biofoulern liegen. Ebenso ist zu beachten, dass die geometrischen Abmessungen der Poren nicht in die Nähe eines maximalen Kontaktes liegen dürfen (und bei Delfinen auch nicht liegen).

Dieses Untersuchungsergebnis halte ich für sehr wichtig für die Entwicklung von umweltneutralen Bewuchsschutzfarben. In Bezug auf die Größe der abzuwehrenden Organismen oder Partikel kann als grobe Annäherung zur topologischen Optimierung einer Oberfläche mit kontaktreduzierten Eigenschaften folgender Zusammenhang angenommen werden: hexagonale Porenweite etwa 0,45 Partikelgröße (ergibt maximal drei Unterstützungslinien) und Porentiefe etwa 0,3 Partikelgröße (ergibt ein instabiles Gleichgewicht für einen Eindringling). Andererseits kann im Hinblick auf eine bionische Verbesserung selektiver Anreicherungsprozesse eine Partikelgrößen-spezifische Vertiefung gefunden werden, die ein Maximum an Kontakt aufweist (vgl. Abb. 4-4): hexagonale Porenweite etwa 1,05 Partikelgröße und Porentiefe etwa 1,05 Partikelgröße.

4.1.7 Glykokonjugate im Stratum corneum

Die Substanzen, die histochemisch im Interzellularraum des Stratum corneums der Epidermis des Pilotwales untersucht wurden, waren reich an sauren Glykokonjugaten. Die Anwesenheit von Glykokonjugaten im Interzellularraum entsprach den Ergebnissen, die aus der Signaldifferenz zwischen dem UV-Signal und dem 10-fach höheren RI-Signal während der säulenchromatographischen Trennung des Zentrifu-

gates ermittelt wurden. Die Befunde stimmen mit Untersuchungsergebnissen von SPEARMAN (1972) und KNOSPE (1989) überein, die mit der Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) neutrale Glykoproteine in den Interzellularräumen von Stratum spinosum, Stratum granulosum (Übergangszone) und Stratum corneum nachwiesen. Von beiden Autoren wurde zudem ein Anstieg der Acidophilie zum Stratum corneum hin beschrieben, was mit dem für das Fluid des Stratum corneums bestimmten Haut-internen pH-Wert von 6,3 korreliert. Zudem ist von marinen sowie landlebenden behaarten Säugern bekannt, dass Spaltprodukte von epidermalen Glykoproteinen die Häufigkeit bakterieller Hautbesiedler reduzieren (MEYER et al. 2000, MEYER et al. 2001).

4.1.8 Thiol-Gruppen im Stratum corneum

In Übereinstimmung mit dem histochemischen Nachweis freier Thiol-Gruppen in der Delfinhaut von SPEARMAN (1972, Dihydroxy-Dinaphtyl-Disulfid-Methode) und KNOSPE (1989, Plumbit-Reaktion) konnte in dieser Untersuchung gezeigt werden, dass der Gehalt an freien Thiol-Gruppen im oberen Anteil des Stratum spinosums ansteigt, im Stratum granulosum die höchste Konzentration erreicht und im Stratum corneum abnimmt. Dieser Aspekt, der Ergebnissen von Landsäugetern entspricht (MEYER 1986, MEYER und SCHLESINGER 1991), wurde hier durch die Markierung von Thiol-Gruppen mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Eosin-5-maleimid für die Haut des Pilotwales, *Globicephala melas*, bestätigt. Aus der besonders deutlichen Färbung des Stratum granulosums (Übergangszone) (Abb. 3-18) ist zu schliessen, dass eine kovalente Vernetzung, die ebenso aus dem Strukturwandel der Interzellulärsubstanz abzuleiten ist, sich möglicherweise auf der Basis von Thiol-Gruppen/ Disulfid-Brücken vollzieht. Es ist zur Zeit unklar, um welche Substanzen es sich handelt. In Frage kommen aber in erster Linie Fillagrine und Keratin-Polypeptide, die den Hauptbestandteil der Proteine in der Epidermis ausmachen und über inter- und intramolekulare Disulfid-Brücken vernetzen. Die meist helikalen Keratin-Polypeptide kommen in phosphorylierter oder glykosilierter Form vor und sind dimerisch, trimerisch und tetramerisch aggregiert (SKERROW 1984). Es ist zudem bekannt, dass im Stratum corneum neben Disulfid-Brücken auch Vernetzungen dieser Proteine über ϵ -

(γ -Glutamyl)-Lysin-, Lanthionin- und Lysinoalanin-Bindungen vorliegen (SKERROW 1984, FUKUYAMA und EPSTEIN 1984), die ebenfalls positiv mit Eosin-5-maleimid reagieren können (vgl. COBB und BETH 1990).

4.2 Vielwinkel-Laserstreulicht-photometrische Untersuchung des Gels

4.2.1 Dispersität des Gels

Mit Hilfe von Vielwinkel-Streulicht-Photometrie in Verbindung mit Größenausschlusschromatographie war nachzuweisen, dass das zentrifugierte Stratum corneum des Pilotwales Aggregate enthält, die an Größe mit der Zeit zunehmen.

Wie der Vergleich der Detektorsignale (UV und RI) zeigte, fiel die Proteinkonzentration um eine Zehnerpotenz niedriger aus als die detektierte Gesamtmasse. Dieses Ergebnis ist als Hinweis auf eine Mischung von zucker- und fetthaltigen Substanzen sowie deren Proteinkonjugate zu deuten. Ich vermute zudem, dass neben den histochemisch nachgewiesenen sauren Glykokonjugaten auch Lipide, im besonderen nicht-polare Glykosyl-acylceramide auftreten (MENON et al. 1986). Diese Ceramide umgeben in der Haut landlebender Säuger interzelluläre Membransysteme (membran-coated granules, MCGs), die vor Flüssigkeitsverlust schützen (LANDMANN 1980, WERTZ 1984) und in der Delfinhaut als Ummantelung von Lipidtropfen zu finden sind (MENON et al. 1986, PFEIFFER und JONES 1993, vgl. Ergebnisse 3.4).

Es war auffällig, dass die Absorption für ultraviolettes Lichtes in der Fraktion von 4-6 kD überproportional erhöht war. Dieses Absorptionsmaximum ist vermutlich auf die dem Zentrifugat fargebenden Phaeomelanine zurückzuführen, die als Cystein- und Tryosin-haltige orange-rote Chromophore eine starke Absorption für UV-Licht aufweisen (KOLB et al. 1997, DONOIS et al. 1998).

Die sieben durch Säulenchromatographie getrennten Fraktionen lassen sich einem breiten Molmassenspektrum zuordnen ($\leq 10^7$ g·mol⁻¹ und $\geq 10^3$ g·mol⁻¹) und belegen, dass das Zentrifugat ein polydisperses Fluid mit uneinheitlicher, zeitabhängiger Molmassenverteilung darstellt. Mit steigendem Probenalter wurde eine Erhöhung der Molmassen beobachtet; doch besonders auffällig war dabei der Verlust einer 20-30 kD Fraktion, deren Vielfaches mit zunehmender Versuchszeit entstand. Die Beob-

achtung legt nahe, dass es sich dabei um Di- Tri-, und Polymere der Fraktion von 20-30 kD handelte. Eine solche Molmassendispersion ist von Keratin-Polypeptiden bekannt (ACHTSTAETTER et al. 1986).

Die Aggregation und die damit verbundene Zunahme an Molmasse wurde nicht nur bei den beschriebenen, schwach verdünnten (1:10), sondern auch bei stark verdünnten Lösungen (1:500) beobachtet, wobei die Aggregation keiner Sättigung unterlag. Aus diesem Befund ist zu folgern, dass die Aggregation, wie auch makroskopisch zu beobachten, zu immer größeren Aggregaten führt. Die Bildung von Aggregaten steht damit im Einklang gelkinetischer Experimente, bei denen ein Anstieg von strukturierenden Elementen mit der Zeit gemessen wurde. Obwohl Molmassen nicht direkt mit den physikalischen Parametern verglichen werden können, ist ihr zeitabhängiger Anstieg ein hinreichendes Kriterium für die Bildung der oben genannten Aggregate. Es ist zu vermuten, dass sich wegen der hohen Selbstaffinität diejenigen mechanischen Eigenschaften des Fluids entwickeln, die in den rheologischen Untersuchungen ein hohes Maß an Elastizität bewirkten.

Bei den ersten und bis heute einzigen rheologischen Untersuchungen einer Delfinhaut-Meerwasser-Suspension suchten SOKOLOV et al. (1969) mit Hilfe eines Ostwald Viskometers nach Polymeren, die den Wasserwiderstand herabsetzen. Im Gegensatz zu ihren ursprünglichen Vermutungen fanden die Autoren keine Hinweise auf Polymere, die einen Einfluß auf die Dehnviskosität des Meerwassers haben (vgl. KLEIN 2000). Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen überein. Hierbei ist aus den oben beschriebenen Aggregationsexperimenten abzuleiten, dass das aggregative und rheologische Verhalten von verdünnten Komponenten mit einer Partikelbildung und nicht mit dem Aufbau von gut löslichen hydrokolloiden Makromolekülen einhergeht. Zu diesen gelösten Makromolekülen, die den Wasserwiderstand herabsetzen, zählen beispielsweise die Glykokonjugate der schleimigen Hautsekretionen der Fische (HOYT 1975, WIRTH 1999).

4.2.2 Aggregationskinetik des Gels

Der exponentielle Anstieg der Molmassen und die oben beschriebene allmähliche Aggregation aus kleinen Elementen zu Vielfachen zeigen, dass die Aggregation

mutmaßlich mit den Bildung von kleinen Zentren beginnt. Dabei ist die kontinuierliche Vergrößerung der Zentren wahrscheinlich. Bei den Experimenten stiegen in doppelt-logarithmischer Auftragung die Gyrationradien linear mit den steigenden Molmassen an (Abb. 3-25). Die doppelt-logarithmische Auftragung der Gyrationradien gegen die Molmassen enthält Informationen über die molekularen Konformationen (der detektierten Moleküle) vergleichbar mit dem Kuhn-Mark-Houwink-Plot der Nullviskosität gegen das Molekulargewicht (siehe KULICKE 1985, WYATT 1993, WYATT TECHNOLOGY DEUTSCHLAND 1994). In beiden Fällen entspricht die Steigung der Geraden der Konformation der Aggregate, wobei eine Steigung von 0,33 bei sphärischen Molekülen auftritt, eine Steigung von 0,5 - 0,6 linearen Molekülen mit statistischer Anordnung entspricht und eine Steigung von 1 bei stabförmigen Molekülen gefunden wird. Der hier gefundene Wert von 0,46 entspricht damit eher kompakten Aggregaten als statistisch angeordneten Polymeren (siehe auch BAUM et al. 2002B). Es ist aber bei dieser Betrachtung zu bedenken, dass diese Aussagen streng genommen nur für Proben Gültigkeit besitzen, deren (Poly-)Dispersität mit der Zeit gleichbleibend ist. Die hier aus zeitabhängigen Dispersitäten abgeleitete Geradensteigung schränkt das Gewicht dieser analytischen Aussage ein, weil sich die Dispersität bei Polymerisationsreaktionen stetig ändert und die Messwerte nicht wie üblich aus einer einzigen Messung entnommen werden können. Andererseits wären Messungen aus Verdünnungsreihen zur Vereinzelnung von Aggregaten kein Wissensgewinn zur obengenannten Analyse, weil die Gefahr besteht, dass auch hier unspezifische Vernetzungsreaktionen die Konformation der Moleküle und deren Aggregate verschleiern (vgl. WYATT TECHNOLOGY DEUTSCHLAND 1994), bzw. Vernetzungsreaktionen nicht mehr auftreten und deshalb der Rückschluss auf die Art der Polymerisation nicht mehr gegeben ist. Aufgrund der gefundenen Linearität gehe ich allerdings davon aus, dass trotz eines methodischen Vorbehaltes eine adequate Beschreibung der Konformation der Aggregate als kompakte Moleküle vorliegt.

Durch die Zugabe von L-Cystein reduzierten sich in Abhängigkeit von der Konzentration die anfänglichen Molmassen der Aggregate (Abb. 3-24). Ich schliesse daraus, dass L-Cystein eine Umkehr der Aggregation hervorruft, indem vormals präformierte Aggregate zerstört werden. Diese chaotrope Wirkung führe ich auf das milde Oxidationspotential von L-Cystein auf freie (Lysinoalanin-Gruppen ?) Thiol-Gruppen (Thiol-

Gruppen erhaltend) und Disulfid-Brücken (Brücken spaltend) zurück, so dass es möglich ist, dass L-Cystein während der Aggregatbildung die Löslichkeit der Reaktanten beeinflusste. Weitere Untersuchungen könnten zeigen, inwieweit die Rekonstitution von Aggregaten von der Bildung von Disulfid-Brücken abhängig ist. Ich vermute, dass Disulfid-Brücken-Bildungen aus freien Thiolen (Lysinoalanin-Bindungen ?) zu den primären Reaktionen der interzellulären Gelbildung des Stratum corneums der Delfinhaut gehören. Im Zusammenhang mit den rheologischen Befunden, die das typische Verhalten von kovalent vernetzten Polymeren zeigten, ist anzunehmen, dass im besonderen Maße Keratin-Polypeptide an den Reaktionen beteiligt sind (vgl. STEINERT 1983). Desweiteren vermute ich, das L-Cystein mit den reaktiven, Thiol-Gruppen enthaltenden Gelbildnern in diesem Experiment reagierte, weshalb keine überproportionale Beschleunigung des Massenaufbaus zu beobachten war (je mehr freigesetzte Reaktanten, desto schneller der Massenaufbau). Diese Beschleunigung ist bei gelkinetischen Messungen an unbeeinflussten Proben zu beobachten (vgl. beschleunigte Strukturbildung in verdünnten im Gegensatz zu unverdünnten Lösungen unter dem Gesichtspunkt der Liberation reaktiver Komponenten, Abb. 3-28).

4.3 Rheologische Eigenschaften des Gels

Nach dem Konzept von GERACI et al. (1986) sind die Corneocyten der Delfine von einem makromolekularen Coating umgeben. In den eigenen elektronenoptischen Untersuchung nachzuweisen ist, dass dieses Coating während der Reifung der Corneocyten interzelluläre Aggregate bildet, deren Morphologie dem auspolymerisierten zentrifugierten Fluid gleicht. In dieser Arbeit erfolgte erstmalig die Untersuchung dieses Fluids mit rheologischen Methoden. Aus den Entsprechungen zwischen elektronenoptischen und rheologischen Eigenschaftsbildern des interzellulären Fluids ergibt sich als zentrales Kennzeichen für das Stratum corneum der Haut des Pilotwales, *Globicephala melas*, der Übergang der Interzellulärschicht vom Sol in ein Gel, das zu einem multi-phasischen, viskoelastischen Körper ausreift.

Dabei sind die Befunde der unverdünnten Proben maßgeblich für die Bewertung der biologischen Eigenschaften dieses Fluids und seiner Bedeutung für die Hautoberfläche, weil in den elektronenoptischen Untersuchung der Beginn aggregativer, struktu-

reller Veränderungen auf die obersten 5 bis 6 interzellulären Schichten des Stratum corneums zurückgeführt werden kann. Einerseits stehen diese Schichten nicht in direktem Kontakt mit dem Meerwasser und unterliegen somit keinem Verdünnungseffekt, andererseits ist das kovalent vernetzte Gel in Meerwasser nicht löslich. Daraus leite ich ab, dass die Eigenschaften der unverdünnten Proben den Eigenschaften der Gelbedeckung der Hautoberfläche entsprechen.

4.3.1 Reproduzierbarkeit rheologischer Messungen

Identische Gelkinetiken wurden unter stress-kontrollierten und deformations-kontrollierten Bedingungen erhalten, was darauf hindeutet, dass die Gelbildung von der Art der Belastung unabhängig ist.

In Bezug auf die „Frische“ der Proben, die zwischen ein bis fünf Stunden nach Eintritt des Todes genommen wurden, gehe ich aufgrund des reduzierten Stoffwechsels dieser Schicht, der mehrere Stunden nach dem Tod der Tiere anhält (BROWN et al. 1983), davon aus, dass keine wesentlichen Unterschiede in der „Frische“ der Proben bestehen.

Für alle Untersuchung wurde eine standardisierte Probenhandhabung verwendet. Das Zeitintervall vor den Messungen betrug etwa 15 Minuten und gewährleistete eine vergleichbare Vorlaufzeit bei allen Messungen, die im Verhältnis zur Meßzeit von mehreren Stunden gering ausfiel. Die Probenvorbereitung umfaßte die Zentrifugation bei konstanter Geschwindigkeit und Dauer.

Für alle gelkinetischen Messungen gilt, dass die Zentrifugationsgeschwindigkeit (1500, 3000 und 4000 U·min⁻¹) Einfluß auf die Lage der cross-over points nimmt (vgl. Abb. 3-29), während ein Einfluß unterschiedlicher Stress-Vorgaben (0,07 Pa, 0,1 Pa und 0,27 Pa) innerhalb des linear viskoelastischen Bereiches nicht deutlich wird. Je höher die Zentrifugationsgeschwindigkeit ausfällt, desto früher ereignet sich der cross-over point bei gleicher Konzentration. Wird berücksichtigt, dass die Probenkonzentration durch die unterschiedlichen Zentrifugationsgeschwindigkeiten nicht beeinflusst wird (Abb. 3-27), ergeben sich zwei Schlußfolgerungen: Erstens wirkt sich eine höhere Zentrifugationsgeschwindigkeit beschleunigend auf die Gelbildung aus. Vermutlich handelt es sich hierbei um einen rein mechanisch-induzierten Liberati-

onseffekt reaktiver Komponenten, der zur Zerstörung präformierter Aggregate führt. Diese Schlußfolgerung wird durch die Tatsache unterstützt, dass zweitens die Zentrifugation unter den geringstmöglichen Zentrifugalkräften nicht zu einer selektiven Anreicherung von beispielsweise besonders reaktiven oder unreaktiven Komponenten führt, weil keine Abhängigkeiten von der Zentrifugationsgeschwindigkeit bei konzentrationsbezogenen Betrachtungen der cross-over points nachzuweisen sind. Damit kann für diese und für weitere Untersuchungen an diversen Zentrifugaten diverser Delfinarten begründet werden, dass der Einfluß der Probenaufbereitung im Hinblick auf den Faktor Zentrifugationsgeschwindigkeit unter milden Bedingungen keinen Einfluß auf die Konzentration der Proben nimmt und die Probenkonzentration das wichtigere Gütekriterium für Vergleichsmessungen darstellt.

Die Gelkinetiken waren bei allen Aliquots einer Probe reproduzierbar. Aufgefallen ist mir lediglich, dass die Konzentrationen der unverdünnten Proben mitunter variierte. Dies führe ich im wesentlichen auf die Kondensation von Raumfeuchte auf den abgeraspelten Proben während der Zentrifugation zurück, die nicht kontrolliert werden konnte. Kondensierte Raumfeuchte führt zur Verdünnung und wirkt sich auf die konzentrationsempfindliche Gelbildungskinetik aus (vgl. 3-27).

In dieser Untersuchung wurden die Probenkonzentrationen mit dem Bradford Assay colorimetrisch gegen das Glykoprotein Ovalbumin bestimmt sowie aus den Signalen des Refraktionsindex-Detektors extrapoliert, wobei letztere Methode bevorzugt wurde. Dies hat seinen Grund in der nicht bekannten Konjugationsrate des colorimetrisch bestimmten komplexierten Farbstoffes, dessen Bindung zudem auf die äußeren Bereiche der Aggregate beschränkt sein dürfte und deshalb zu Fehlinterpretationen der Konzentration von an Glykokonjugaten reichen Proben führen kann. Andererseits muß berücksichtigt werden, dass die differentielle Bestimmung von Konzentrationen aus RI-Signalen auf der Kenntnis eines Substanz-spezifischen Brechungsindex-Inkrementes beruht. Da dieses nicht gegeben war, wurde in Kauf genommen, dass das Inkrement für Proteine (siehe 2.7.1) möglicherweise zu einem systematischen Fehler führte. Allerdings zeigte sich eine gute Übereinstimmung in den Ergebnissen zwischen beiden Methoden, die in dieser Untersuchung zur Konzentrationsbestimmung eingesetzt wurden. Es erscheint mir sinnvoll, für zukünftige Untersuchungen nach gelspezifischen Markern zu suchen. Dies wäre auch vor dem Hinter-

grund einer Vergleichbarkeit der Gelkinetiken von Gelen verschiedener Delfinarten eine verlässliche Basis. Ich schlage vor, dass die Konzentrationsbestimmung beispielsweise immunologisch (20-30 kD Fraktion) in Verbindung mit der Messung der optischen Aktivität der Proben vorgenommen wird.

4.3.2 Gelbildung und Strukturaufbau des Gels

Der Verlauf der Gelbildungskinetik konnte in drei Abschnitte (I-III) geteilt werden (Abb. 3-26):

- I. Liberationsphase. Zu Beginn der Gelbildung lagen bei den unverdünnten Sollen schwankende Messwerte der Module und des Strukturfaktors f vor. Da diese Undulationen bei verdünnten Proben (ab einer Verdünnung von 1:10) nicht zu beobachten waren und bei diesen der cross-over point früher erreicht wurde als bei unverdünnten Proben (aber ebenso wie bei den unverdünnten Proben Strukturbildungen auftraten) entsprechen die Messwertschwankungen Gleichgewichtsreaktionen zwischen desaggregierenden und reaggregierenden gelbildenden Subsystemen, die auf der Basis sterischer Effekte zur Freigabe (Liberation) vernetzender Komponenten führen.
- II. Gelbildungsphase. In der nächsten Phase, in der der Cross-over point enthalten war, bildeten sich bis zu einer Verdünnung von 1:20 viskoelastische Gele, deren Fähigkeit zur Speicherung freier Energie stetig anstieg.
- III. Gelreifungsphase. Besonderes Kennzeichen der Gelbildung der unverdünnten Interzellulärsubstanz ist in der dritten Phase eine Reifung des Gels zum viskoelastischen Körper. Während dieser Reifung nähert sich der Verlustmodul G'' durch einen starken Anstieg an den ebenfalls steigenden Speichermodul G' an. Ich leite daraus ab, dass die Interzellulärsubstanz des Stratum corneum der Epidermis des Pilotwales bei steigender struktureller, elastischer Integrität ein sehr guter Dämpfer ist, dessen rheodestruktive Toleranz gegenüber Belastungen erhöht wird, indem, wie die Messwerte zeigen, im Verhältnis von etwa 1:2 Energie über viskoses Fließen dissipiert oder elastisch gespeichert wurde.

Eine Gelbildung kann auf der Basis von real und formal kompartimentierten Mikro-umgebungen als diskrete Zeitreihe sequentieller und paralleler Reaktionen beschrieben werden (FLEISCHER, unveröffentlicht): Als vorteilhaft erwies sich für deren Beschreibung dabei die Normalisierung der Messwerte in dimensionslose Eigenschaftsfaktoren, die für die Extrapolation der Gelbildung auf ihren Beginn oder die Anpassung an allgemeine Reaktionsmodelle eingesetzt werden können (vgl. Abb. 3-28). Im Gegensatz zum Phasenverschiebungswinkel δ ,

$$\delta = \arctan \left(\frac{G''}{G'} \right) \quad [4.1]$$

der sowohl das viskose als auch das elastische Verhalten angibt, zeigt der Strukturfaktor f die rein elastische und strukturierende Evolution der Gelbildungsvorgänge an. Diese Evolution des Strukturfaktors f , der von den realen Messwertunterschieden zwischen unterschiedlichen Verdünnungen befreit ist, zeigte für die Gelbildungskinetiken des Pilotwales, *Globicephala melas*, unverdünnter Proben und Verdünnungen bis 1:1 einen sigmoiden Verlauf, dem ich kooperative Interaktionen gelbildender Subsysteme zuordne. Ein sigmoider Charakter der Strukturbildung beschreibt, dass die Gelbildung unverdünnter Proben in der Liberationsphase einerseits einer Initialisierung reaktiver Komponenten bedarf und andererseits die Reaktion der Komponenten exponentiell neue reaktive Komponenten hervorbringt, die in der Evolution der Strukturbildung umgesetzt werden, bis schließlich eine Sättigung einsetzt. Der sigmoide Verlauf spricht deshalb für eine Gelbildung, die von kleinen Reaktionszentren ausgeht, die schließlich miteinander in der Gelreifungsphase vernetzen (in Übereinstimmung mit den Vielwinkel-Laserstreulicht-photometrischen Ergebnissen). Ich vermute, dass die Strukturbildung auf der Basis einer Phasentrennung, die später als Multiphase (vgl. Abb. 3-19) durch chemische Vernetzung physikalisch stabil bleibt, Agglomerate sterisch beeinflusst, Affinitätszentren und Bindungstellen freilegt und auf deren Interaktivität verstärkend zurückwirkt. Da der Liberationseffekt in unverdünnten Proben schwächer ausfallen sollte (in verdünnten Lösungen liegen die bereits freien interagierenden Formen vor), kann postuliert werden, dass der evoluti-

ve Verlauf der Strukturbildung bei unverdünnten Proben exponentiell verläuft. Diese Annahme wird durch die Kurvenverläufe verdünnter Proben bestätigt (Abb. 3-28). Zusätzlich zeigten die durchgeführten rheologischen Untersuchung zur Deformierbarkeit des Gels (siehe unten, Abb. 3-32), dass in jungen Gelen zeitgleich Scherverzähungen und pseudoplastisches Verhalten auftreten, wobei letzteres mit der Zeit verloren geht. Da pseudoplastisches Verhalten auf Desaggregationen von Makromolekülen (wie beispielsweise Entschlaufung oder Phasentrennung) und Scherverzähung auf sich spannenden elastischen Elementen beruht, gehe ich davon aus, dass sich im Laufe der Gelreifungsphase teilvernetzte Aggregate in vernetzte Agglomerate umwandeln. Ebenso verdeutlicht der eindrucksvolle Anstieg der dissipativen Speicher in der Gelbildungsphase (nach dem Cross-over point) die Zunahme der sich immer stärker trennenden Phasen, deren strukturelle Einheit im Fall der Deformationsexperimente bei Überschreiten einer maximalen Deformation abrupt verloren ging und sich nicht wieder aufbauen konnte.

4.3.3 Rheologisch-biochemische Eigenschaften des Gels

Wie aus den Voruntersuchungen zur Probenentnahme zu schliessen, war das Gelbildungspotential des abgeriebenen Stratum corneums Sauerstoff empfindlich, weil nur unter Vakuum (oder Tieftemperatur-Konservierung bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) der Sol-Charakter des Fluids erhalten blieb. Eine derartige reduzierte Umgebung ist im Bereich der Übergangszone zu erwarten, deren Sauerstoffversorgung durch deren Abstand von Blutgefäßen vermindert ist, während sich relativ dazu oxische Verhältnisse an der dem Meerwasser zugewandten Seite der Haut aufbauen. Aus den ersten Versuchen ging desweiteren hervor, dass aus lediglich oberflächlich abgeschürften Hautflächen kein gelbildendes Fluid zu erhalten ist (die Gelbildung ist in diesen Schichten bereits abgeschlossen). Die Empfindlichkeit der Reaktionen gegenüber der Anwesenheit von Sauerstoff gab Anlass zu der begründeten Vermutung, dass bei der Gelbildung Redox-Prozesse involviert sind, die unter anderem Vernetzungsreaktionen von Sauerstoff-empfindlichen (Thiol-)Gruppen hervorrufen.

Die mechanischen Spektren, die von dem Gel aufgezeichnet wurden (Abb. 3-30 und 3-31) zeigten, dass der Speichermodul G' und der Verlustmodul G'' über zwei Dekade-

den unabhängig von der Frequenz waren und die Werte von G' ein bis zwei Zehnerpotenzen über G'' lagen. Diese Eigenschaften bestätigen, dass das Gel, welches aus dem Stratum corneum des Pilotwales gewonnen wurde, die Eigenschaften eines kovalent vernetzten Gels aufwies (vergleiche FERRY 1980). Aufgrund der starken Vernetzung wird vermutet, dass die sich vernetzenden Komponenten Thiol-Gruppen tragen und in hoher Konzentration im Gel vorliegen, um die gemessene hohe Elastizität zu erzeugen. Diese beiden Eigenschaften treffen beispielsweise auf Keratine zu, deren Polypeptide Hauptbestandteile der Epidermis sind (STEINERT 1983). Bei den Netzwerkeigenschaften von heteropolymeren Keratinfilament-Aggregaten wurde zudem die Eigenschaft der Scherverzähung beschrieben (MA et al. 1999). Im Gegensatz zu den in vitro Präparationen von heteropolymeren Keratinfilament-Aggregaten (MA et al. 1999), wurden bei dieser Untersuchung weder im Interzellularraum des Stratum corneums oder im Gel Anzeichen von Filament-Aggregaten gefunden. Die Abwesenheit von kleineren Aggregaten im Gel könnte deshalb auch wegen des ausgeprägten pseudoplastischen Verhaltens (siehe unten) auf kleinere Elemente hindeuten, die, wie oben diskutiert, agglomerieren. Die Anwesenheit von interzellulären Agglomeraten anstelle von Filament-Aggregaten erklärt die rheologisch gemessene Versteifung des Gels in Kombination mit einer Erhöhung der inneren Beweglichkeit. Aus den mechanischen Spektren geht hervor, dass das Gel eine hohe Elastizität aufweist und die elastischen Elemente bei Frequenzen unterhalb von $\omega \geq 0.62 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$ keine wesentliche Aktivierung mehr erfahren, so dass auch der Strukturfaktor f unterhalb dieser Frequenz nur geringfügig abfiel (nicht gezeigt) während der Verlustmodul leicht anstieg. Da die aufgeprägte Energie also dissipiert, ohne die elastische Phase zu belasten oder zu zerstören, führe ich die beobachtete Energiewandlung auf die Anwesenheit einer dritten viskosen Phase zurück. Der Schluß wird durch die Überlegung gestützt, dass für ein zweiphasiges System aus elastischem Netzwerk und wassergefülltem viskosem Zwischenraum eine Aktivierung der viskosen Phase nicht ohne die Aktivierung der elastischen möglich ist. Eine dritte Phase tritt im Gel in Form Membran-ummantelter Lipidtröpfchen auf.

4.3.4 Mechanische Belastbarkeit des Gels

In den mechanischen Spektren ist eine belastungssensitive Frequenz auffällig, bei der ein Anstieg des Verlustmoduls G'' vorliegt (Abb. 3-31). Diese Frequenz stimmt mit derjenigen Frequenz überein, mit der die Gelbildung untersucht wurde. Diesen Dämpfungseffekt deute ich als Hinweis auf einen belastungsorientierten optimierten Zustand der Gelbildung, der im Vergleich zu anderen Frequenzen bei gleicher struktureller Integrität ein erhöhtes Maß an Belastung sowohl elastisch speichern als auch in Scherwärme dissipieren kann. Vermutlich liegt bei der Dämpfung eine Resonanz belasteter Struktureinheiten vor. Die Dämpfungsfähigkeit verliert sich bei älteren, ausgereiften und belastungsresistenteren Gelen. Weitere Untersuchungen zur Frequenzabhängigkeit solche Dämpfungseffekte sind vor dem Hintergrund ihrer biologischen Bedeutung sinnvoll. Ich gehe davon aus, dass die mechanische Belastung, die Delfine während ihrer Bewegung erzeugen, durch die erhöhte Dämpfungsfähigkeit des Gels in ihrer rheodestruktiven Wirkung für das Gesamtsystem abgemildert werden. Vergleichbare Dämpfungseffekte, die einen Einfluß auf einen interzellulären Strukturaufbau nehmen, sind von den Kollagen-Proteoglykan-Aggregaten der Chondrocyten des hyalinen Knorpels bekannt (SUH et al. 1995, BUSCHMANN et al. 1995, ZHU et al. 1996).

Unklar ist zur Zeit die Auswirkung der Frequenz von $\omega = 20 - 30 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ auf die Belastbarkeit und die Stabilität des Gels. Bei dieser Frequenz waren die Messwerte der Module und des Strukturfaktors f vermindert. Ich vermute, dass bei dieser Frequenz ein weiterer Resonanzfall eintritt, bei dem die viskose fetthaltige Phase in eine Schwingung gerät, die die Dissipation von Energie im Meßintervall nicht erlaubt und deshalb die vernetzte elastische Phase überlastet. Dieses Phänomen zeigt zum einen, dass die hohe strukturelle Einheit des Gels auf dem synergistischen Zusammenspiel der drei oben genannten Phasen beruht und zum anderen, dass ein solcher Resonanzfall die Rheodestruktion der Struktur begünstigen kann. Es muß dann vermutet werden, dass bei einer solchen Resonanzfrequenz die Abschuppung der Zellen erleichtert wird.

Aus den Deformationsversuchen geht hervor (Abb. 3-32), dass das Gel über einen weiten Deformationsbereich als solches belastbar ist und hohe Schubspannung auf-

nehmen kann, bevor es bei einer Deformation von $\gamma = 75\%$ zerstört wird. Wie für kovalent vernetzte Gele typisch (FERRY 1980) wird der linear viskoelastische Bereich bei einer Deformation um $\gamma = 1\%$ verlassen. Da die aufgeprägten Belastungen im Experiment für mehrere Minuten auf das Gel ohne Schaden ausgeübt werden können, nehme ich an, dass ein Gel mit diesen Eigenschaften an der Hautoberfläche des Pilotwales Belastungen während der Sprung- und Beschleunigungsphasen widerstehen kann.

4.3.5 Biologische Bedeutung des Gels

Die hohe Belastbarkeit und der Einschluß von Lipiden stehen im klaren Gegensatz zu den biochemischen und rheologischen Eigenschaften von Gelen und Kolloiden aus gelösten organischen Substanzen und Glykokonjugaten epibiontischer Biofilme (ALUWIHARE et al. 1997, CHIN et al. 1998, STOODLEY et al. 1999, MORENO et al. 2000). Im Meerwasser finden sich gelöste adhäsive amphiphile Polysaccharide, die von Algen freigesetzt werden und Kolloide und Gelpartikel bilden (CHIN et al. 1998, PASSOW 2000). Die Gelbildung dieser besonderen Fraktion der gelösten organischen Substanzen im Meer (engl., dissolved organic matter, DOM) ist konzentrationsabhängig und eine Eigenschaft der Polysaccharide, die vor allem aus sulfatierten Acyl-Heteropolysacchariden bestehen (ALUWIHARE et al. 1997, ALUWIHARE und REPETA 1999). Die Transformation der kleinen gelösten Moleküle ($\geq 2 \mu\text{m}$) in absinkende Gelpartikel ($\leq 2 \mu\text{m}$) ist vermutlich ein wichtiger Schritt im Kreislauf der gelösten organischen Substanzen (PASSOW 2000). Solche Kolloide belegen geladene und ungeladene Oberflächen von Organismen oder Unterwasserkonstruktionen und reichern sich dort zu einem dünnen Film an (engl., conditioning layer), der als „biologisierte“ Oberfläche das Substrat für den Biofouling-Prozess darstellt. Mikrofouling-Organismen nehmen Kontakt zu diesem Film auf und wachsen zu einem schleimigen an Polysacchariden reichen Biofilm aus (TOSTESON 1984, RAMUS und KENNEY 1989, WAHL 1989, VANDEVIVERE und KIRCHMAN 1993, SUTHERLAND 1994, COOKSEY und WIGGLESWORTH-COOKSEY 1995, BERVERIDGE et al. 1997, STOODLEY et al. 1999). Solche Biofilme haben adhäsive und schützende Aufgaben für die Biofilm-integrierten Organismen (FLEMMING und WINGENDER 2001).

Im Vergleich zu der hohen Belastbarkeit des Gels aus dem zentrifugierten Stratum corneum zeigen Algenexsudate und bakterielle Biofilme elastischen Moduli, die zwischen 20 - 40 Pa variieren (NIJENHUIS 1997, STOODLEY et al. 1999, PICIOREANU et al. 2000) und damit 1 - 2 Zehnerpotenzen unterhalb der Moduli des porenfüllenden Gels an der Hautoberflächen des Pilotwales, *Globicephala melas*, liegen (bis zu 2000 Pa in dieser Untersuchung). Eine rheologische Besonderheit von Biofilmen ist, dass sie unter Stressbelastung Biomasse akkumulieren und sich unterhalb dieser Belastung wie viskoelastische Körper verhalten (Übergang von Bingham Körper in Fluide). Beim Überschreiten dieser Bildungsbelastung durch äußeren rheodestruktiven Stress aber auch durch das zunehmende Eigengewicht gehen sie in viskoelastische Fluide über und zerreißen (RIELLY 1997, STOODLEY et al. 1998 und 1999).

Ich vermute deshalb, dass aufgrund der Belastungsunterschiede vor und während des Springens die Fließgrenzen für akkumulierte Polymere (im Einklang mit ihrem in dieser Untersuchung beobachteten seltenen Auftreten an der Delfinhaut) periodisch überschritten werden. Im Gegensatz zu den Biofilmen liegt die mechanische Belastbarkeit des Gels wegen seiner starken Vernetzung deutlich höher. Aus der Anwesenheit des Gels in den Poren der Corneocyten gehe ich davon aus, dass der Unterschied in der Belastbarkeit zwischen Biofilm und Gel groß genug ist, um Schleime und mit Schleim befestigte Biofouler während des Springens von der Haut zu entfernen, ohne dabei das Gel zu schädigen. Diese bisher unbekannte Eigenschaft ist besonders vor dem Hintergrund der Selbstreinigung von Vorteil. Erstens kann die Selbstreinigung durch Verhalten gesteuert werden und zweitens ist durch das Gel gewährleistet, dass auch solche Stoffe, die nicht sterisch von der Oberfläche auszuschliessen sind, durch Scherung und den Kontakt mit Luftblasen abgetragen werden. Desweiteren garantiert die strukturelle Integrität der Delfinhautoberfläche vor und während des Springens, dass im Gel eingeschlossene Enzyme nicht von der Hautoberfläche abdiffundieren, sondern an der Hautoberfläche hydrolytisch gegen die Schleime wirksam werden können, um deren Fließfähigkeit zu erhöhen. Deshalb verstärkt die Kombination aus Gel und Enzymen, Zymogel, sowie die durch das Gel induzierte oben beschriebenen Glättung der Haut und die damit verbundenen Abwesenheit von Nischen, die Selbstreinigungsfähigkeit der Hautoberfläche des Pilotwa-

les. Anhand der rheologischen Befunde wird deutlich, dass die wichtigsten Selbstreinigungseigenschaften der Delfinhaut durch die Gelbildung ermöglicht werden.

4.4 Oberflächenchemische Eigenschaften der Hautoberfläche und des Gels

Im Rahmen dieser Untersuchung waren die oberflächenchemischen Merkmale der Hautoberfläche des Pilotwales von Interesse und ihr Zusammenhang mit den Produkten aus dem Interzellularräumen des Stratum corneums. Mittels Photoelektronenspektroskopie für die chemische Analyse konnten oberflächenchemische Merkmale der Hautoberfläche und der Geloberfläche untersucht werden, deren Habitus in den oben beschriebenen elektronenoptischen Untersuchungen charakterisiert wurde. Da die Hautoberfläche von einem Gel bedeckt ist, welches das etwa 300 nm tiefe Porenrelief der desmosomalen Verbindungen ausfüllt, war es wegen der Informationstiefe der photoelektronenspektroskopischen Analyse von ca. 8 nm möglich, das Gel an der Hautoberfläche chemisch zu charakterisieren. Die chemische Zusammensetzung der Hautoberfläche des Pilotwales wurde zusätzlich mit der Zusammensetzung der Oberfläche des *in vitro* Gels verglichen, das aus dem Zentrifugat des Stratum corneums hervorgegangen war. Der qualitative und quantitative Vergleich der auf Kohlenstoff C bezogenen Elementverhältnisse zeigt, dass nur geringe Unterschiede zwischen der mit Gel bedeckten Hautoberfläche und Oberfläche des *in vitro* Gels bestanden. Aus dem Ergebnis wurde geschlossen, dass die chemische Zusammensetzung der Hautoberfläche von der Zusammensetzung des Gels bestimmt wird. Es ist zudem davon auszugehen, dass Bereiche der Hautoberfläche nicht von den Spuren aus dem Biofouling-Prozess überlagert sind.

In dieser Untersuchung wurden Differenzen in den [N]:[C]-Verhältnissen zwischen Übersichtsspektren und Elementsspektren gefunden. Diese liegen aber im Rahmen statistischer Fehler, die aufgrund der unterschiedlichen Energieauflösung und daraus resultierenden Problemen beim Abzug des Spektrenuntergrundes bei den verschiedenen Spektren auftreten können. Außerdem beeinflussend sind unterschiedliche Bindungszustände des Kohlenstoffs, die sich aufgrund der Energieauflösung des Spektrometers einer Separation im Elementspektrum entziehen. Dies gilt insbesondere für die Differenzierung primärer ($-\underline{\text{C}}-\text{NH}_2$), sekundärer ($-\underline{\text{C}}-\text{NHR}$) und tertiärer

Amine ($-\underline{\text{C}}-\text{NR}_2^j$). Ebenso wurden Differenzen in den [N]:[C]-Verhältnissen zwischen Hautoberfläche und Geloberfläche gefunden. Der erhöhte N-Anteil des Gels im Vergleich zur Hautoberfläche (Tab. 3-2) wird auf einen geringeren Anteil an flüchtigen Kohlenwasserstoffen (als Reifezeichen des Gels) oder die Segregation von hydrophoben Gruppen ($-\text{CH}_2-$ Kettenabschnitte) an der Hautoberfläche im Gegensatz zu den hydrophilen Gruppen (z.B. den Aminen) im Gel zurückgeführt.

Bei der Analyse beider Probenarten fiel auf, dass die Probenoberflächen von einer chemischer Heterogenität (in etwa 70 % unpolare Gruppen und 30 % polare Gruppen) geprägt waren. Innerhalb der polaren Gruppen wurden größere Unterschiede im Gehalt von Aminen und Ammonium gefunden. Der in beiden Proben nachzuweisende leichte Überschuss an Stickstoff N (als Differenz zwischen $[\text{N}]:[\text{C}]_{\text{C } 1\text{s}}$ und $[\text{N}]:[\text{C}]_{\text{spec}}$ in Tab. 3-2) ist wahrscheinlich (hydrophilen) sekundären Aminen bzw. stickstoffhaltigen Ringen (z.B. in Tryptophan, Histidin) und freien Aminogruppen (z.B. $-\underline{\text{C}}-\text{NH}_2$, wie Lysin, vgl. 4.1.8 und 4.2.2) zuzuordnen. In beiden Proben wurden Esterbindungen identifiziert. Der Esterpeak F fiel kleiner als der Komponentenpeak D aus (Alkohole, Ether, Aldehyde, Etherkohlenstoff der Estergruppe). Die hier gemessenen chemisch heterogenen Kohlenstoff-Bindungen wurden in Form eines Multiphasen-Systems sowie durch die Anwesenheit von Glykokonjugaten und chemisch vernetzenden Gruppen aus den rheologischen Messungen, den biochemischen Analysen und morphologische Darstellungen abgeleitet. Um tiefergehende Einsichten über den Einfluß der chemisch heterogenen Kohlenstoff-Bindungen auf die Benetzbarkeit der Delfinhautoberfläche zu erhalten, sind Messungen von dynamischen Kontaktwinkeln geplant. Es ist zu vermuten, dass sich aufgrund des hydratisierten Charakters des Gels eine gute Benetzbarkeit der Hautoberfläche (mit geringer Hysterese) mit wässrigen Medien entwickeln wird.

Die chemische Heterogenität und die Anwesenheit eines nicht unbeträchtlichen Anteiles an polaren Gruppen wie beispielsweise freien Aminen steht im Kontrast zu den niedrigen kritischen Oberflächenspannungen von $20 - 30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ und den daraus abgeleiteten Niedrigenergie-Oberflächen (engl., low-surface energy surfaces), die GUCINSKI et al. (1984) und GUCINSKI (1986) für die Hautoberflächen des Tümmers *Tursiops truncatus* und des Schwertwales *Orcinus orca* bestimmten. Zu diesen Messungen ist anzumerken, dass kritische Oberflächenspannungen durch Benet-

zungen von Obeflächen mit Flüssigkeitstropfen bekannter Oberflächenspannung gewonnen werden und die Autoren zum diesem Zweck die Delfinhaut außerhalb des Wassers untersuchen mußten. Ich vermute, dass die Bestimmung der Oberflächenspannungen der Delfinhaut als kritische Oberflächenspannung (an Luft) sich nicht auf die Benetzbarkeit der Delfinhaut unter Wasser übertragen läßt. Meine Zweifel beruhen auf der Einsicht, dass die in dieser Arbeit demonstrierte (kryo-raster-elektronenmikroskopische Befunde) hautbedeckende dünne Gelschicht schnell austrocknet. Dieses hat zur Folge, dass sich aus dem vormals hydratisierten (hydrophilen) Gel an der Hautoberfläche nach dem Austrocknen aufgrund der Seggregation hydrophober Seitenketten zur hydrophoben Luft hin eine nicht native hydrophobe Oberfläche entwickelt, deren kritische Oberflächenspannung niedriger ist als im hydratisierten Zustand (SEDEV et al. 1996). Hinweise auf die Seggregationsfähigkeiten des Gels an der Hautoberfläche wurden auch in der vorliegenden chemischen Analyse gefunden (siehe oben). Zudem ist die Möglichkeit gegeben, dass während der Benetzung der Delfinhaut mit hydrophoben Stoffen Lipidtröpfchen penetriert werden und sich dadurch die Form des benetzenden Tropfens, aus der der Kontaktwinkel bestimmt und die Oberflächenspannung berechnet wird, verändert.

Es war auffällig, dass der Metallanteil an der Geloberfläche im Verhältnis zur Hautoberfläche deutlich höher ausfiel (Tab. 3-1). Im besondern wurde eine hohe Konzentration an Kalium gefunden, das in intakten, von Membranen separierten Zellen ein Indikator für das intrazelluläre Kompartiment ist (WEISS und JELKMANN 1990). Im Gegensatz dazu ist Natrium ein Indikator für den Interzellularraum. Da allerdings in einem Stratum corneum wegen der enzymatischen Degradation Membranen fehlen, ist eine definitive Zuordnung zu einem der beiden Kompartimente nicht möglich. Das Ergebnis wurde jedoch von mir als Hinweis darauf gedeutet, dass durch den Zentrifugationsprozess auch intrazelluläre Verbindungen in das Zentrifugat übergehen. In Bezug auf die vergleichbare organische Zusammensetzung von Hautoberfläche und Geloberfläche erscheint diese Vermischung jedoch von untergeordneter Bedeutung zu sein. Andererseits könnte während des Aufenthaltes im Schwerfeld die Vermischung durch Zentrifugation den Übertritt von Intrazellulärschubstanz in den Interzellularraum durch hydraulische Vorgänge während der Verhornung des Stratum corneums (Abb. 3-15) lediglich verstärkt haben.

Obwohl die relativen Anteile der Komponentenpeaks der Kohlenstoff assoziierten organischen Verbindungen von Hautoberfläche und Geloberfläche quantitativ vergleichbar war, fiel mir auf, dass das Verhältnis von anorganischen Ionen im Gegensatz zur Hautoberfläche an der Geloberfläche erhöht war. Diese relativen Konzentrationsunterschiede von Salz-bildendenden Elementen (Tab. 3-1, Natrium-Ionen, Phosphat, Sulfat, Chlorid, Kalium-Ionen, Calcium-Ionen) an der Hautoberfläche und der Geloberfläche, deute ich als Hinweis auf Diffusionsvorgänge von anorganischen Ionen. An der Hautoberfläche war die Konzentration von Kalium im Verhältnis zum Kohlenstoff der Probe unterhalb der Nachweisgrenze, wobei sich Kalium aufgrund der Nähe des K 2p Peaks zum C 1s schlecht nachweisen lässt. Dieser Befund deutet darauf hin, dass Kalium an der Hautoberfläche der Diffusion unterliegt und im Austausch mit dem Meerwasser steht. Die Kalium-Konzentration des Meerwassers ist mit 300 mg l^{-1} im Gegensatz zur Natrium-Konzentration mit $10\,721 \text{ mg l}^{-1}$ gering (DIETRICH et al. 1975). Weitere Hinweise für Diffusionsvorgänge an der Hautoberfläche sind aus dem Verhältnis der schwefelhaltigen Komponenten zu entnehmen. Unter der Annahme, dass Sulfide (-SH oder -S-S-) nur Protein-gebunden auftreten, deutet die geringere Konzentration der Sulfate an der Hautoberfläche im Verhältnis zur Geloberfläche auf deren Abgabe an das Meerwasser hin ($[\text{Sulfid}]:[\text{Sulfat}]_{\text{Hautoberfläche}} = 1,45$ und $[\text{Sulfid}]:[\text{Sulfat}]_{\text{Geloberfläche}} = 2,24$). Nach DIETRICH et al. (1975) liegt der Schwefel-Gehalt des Meerwassers bei etwa 900 mg l^{-1} . Aus den Ergebnissen ist ableitbar, dass die Interzellulärsubstanz hyperten zum Meerwasser ist. Diesem Befund wird eine Bedeutung im Hinblick auf den Wasser- und Ionen-Haushalt der Delfinhaut beigemessen. Weitere Untersuchungen zum Ionen-Haushalt der Delfinhaut sollen klären, inwieweit die Gelbildung (als Ionentauscher) ein an das marine Medium angepasster Schutz gegen einen transcutanen Wasserverlust ist. Aufgrund der Anwesenheit von Silicium an der Hautoberfläche und seiner Abwesenheit an der Geloberfläche (Tab. 3-1) vermutet ich, dass Silicium in Form von Silikationen aus dem Meerwasser oder den Schalen von Diatomeen zu dem Signal führte. Silicium als Silikat ist mit einem Schwankungsbereich (Diatomeenblüten reduzieren den freien Silikat-Gehalt im Meerwasser) zwischen $0 - 10 \text{ mg l}^{-1}$ ein typischer Mikronährstoff des Meerwassers (DIETRICH et al. 1975).

Die photoelektronenspektroskopische Analyse ergab ein [Ca]:[P]-Verhältnis der Hautoberfläche von 1,08. Dieser Messwert entspricht in etwa den Messwerten, die ich im Rahmen meiner Diplomarbeit durch eine energie-disperse Röntgen-Analyse (EDXA) für das Stratum corneum des Weißseitendelfins *Lagenorhynchus acutus* [Ca]:[P] = $0,97 \pm 0,32$ ermitteln konnte (BAUM 1997).

Die Anwesenheit von Zink im Gel (Tab. 3-1) führe ich auf die Anwesenheit Zinkhaltiger Proteine (z.B. Fillagrine, Enzyme) zurück. Aus der Gruppe der Enzyme kommen vor allem Serin-Proteasen in Betracht, die bei einem Enzymassay im Stratum corneum der Epidermis des Pilotwales, *Globicephala melas*, gefunden wurden (BAUM et al. 2001B). Die Bedeutung von Serin-Proteasen im Interzellularraum des Stratum corneum steht im Zusammenhang mit der Abschuppung von Hautzellen, bei der die desmosomalen Haftbrücken zwischen den Zellen enzymatisch gelöst werden (siehe 4.1.3).

Die hier diskutierte oberflächenchemische Analyse zeigt, dass die Oberfläche der Delfinhaut durch unpolare und polare Bindungen gekennzeichnet ist (BAUM et al. 2002, in Vorbereitung). In diesem Zusammenhang ist das Be- und Entnetzungsverhalten an polaren und unpolaren Oberflächen für die Selbstreinigung der Hautoberfläche durch Scherströmung und Luftblasen von Bedeutung. Ich vermute, dass wie von SUAREZ (2001) an künstlichen hydrophoben Oberflächen bestätigt der Kontakt mit Luftblasen neben der temporären Entnetzung und Reinigung der Oberfläche der Delfinhaut auch zur Ausbildung eines temporären über eine größere Fläche betrachtet mikronisierten Luftpolsters führt. Dieser Effekt könnte sich zusätzlich wie von Pinguinen, die im Spurt Luftbläschen aus ihrem Gefieder entlassen, bekannt (BANNASCH 1995), positiv auf die Verminderung des Reibungswiderstandes nach abgeschlossenem Wiedereintritt ins Wasser im Anschluss an einen Sprung auswirken. Für die Reinigung von polaren Oberflächen durch Luftblasen ist nach SUAREZ (2001) die kinetische Energie der Luftblasen und deren Kontaktzeit mit der Oberfläche entscheidend. Untersuchungsergebnisse von COWLING et al. (2000), ENOTO et al. (2000), GOTTENBOS et al. (2001) und PASMORE et al. (2002) deuten daraufhin, dass weiche, hydrophile Oberflächen sich sehr gut gegen die Anfänge des Biofouling, den Aufbau der „conditioning layer“, bewahren, während ihre Antifoulingeigenschaften bei längerer Besiedlung nachlassen. Im Gegensatz dazu sinkt bei längerer

Besiedlung die Retention von Bakterien auf hydrophoben Oberflächen unter Scherstress oder nach Kontakt mit Luftblasen (BOS et al. 2000). Aufgrund der geringen Belastung durch Biofouler und der Abwesenheit von aufgelagerten Polymeren an der Delfinhaut gehe ich davon aus, dass einerseits die kinetische Energie der Luftblasen und deren Kontaktzeit an den polaren Bereichen der Delfinhaut und andererseits der Grad der Entnetzung an den unpolaren Bereichen hoch genug ist, um die Reinigungseffekte in beiden Gebieten zu gewährleisten. Die vermute deshalb, dass an der Delfinhaut eine optimale Verteilung chemisch heterogener Bereiche vorliegt, so dass die zu unterschiedlichen Zeiten bevorzugt Bewuchs-reduzierenden Oberflächencharakteristika sowohl zu Beginn als auch in einer späteren Phase des Biofouling zur Geltung kommen (Baum et al. 2002, in Vorbereitung).

Da bei dieser Art der Reinigung feste, flüssige und gasförmige Phasen eine Rolle spielen, ergeben sich Parallelen zum "Lotus-Effekt" (BARTHLOTT und NEINHUIS 1997). Der "Lotus-Effekt", der bei Pflanzen bewirkt, dass anorganische, organische und biologische Stäube (z.B. Sporen von Mikroorganismen) durch Beregnung von der Blattoberfläche entfernt werden können, beruht auf zwei Oberflächenkennzeichen des Blattes. Generell zeigen Oberflächen mit "Lotus-Effekt" Mikrostrukturierungen im Bereich von 1 – 30 µm (hydrophobe feste Phase), die die Kontaktpunkte für die Staubpartikel reduzieren. Die Zwischenräume dieser Mikrostrukturen sind von Luft umgeben (hydrophobe gasförmige Phase). Desweiteren sind diese Erhebung hydrophob (bei Pflanzen bestehen sie aus Wachskristallen). Rollt nun ein Wassertropfen (hydrophile flüssige Phase) über eine derartig gestaltete Oberfläche, werden die aufgelagerten Stäube an der Tropfenoberfläche festgehalten und mitgeführt. Das Wasser dringt dabei nicht in die Mikrostrukturen ein, weil erstens die Mikrostrukturen hydrophob sind und zweitens die sie umgebende Luft eine hydrophobe Sperrschicht aufbaut. Vergleicht man eine Oberfläche mit "Lotus-Effekt" mit der Delfinhaut so wird deutlich, dass im Fall der polaren Zonen an der letzteren inverse Verhältnisse vorliegen. Eine nanoraue (glatte) polare Oberfläche als feste Phase wird von einer hydrophilen flüssigen Phase umgeben, die mit Luftblasen (gasförmige, hydrophobe Phase) gespült wird. Aufgrund der fehlenden Mikrostrukturierungen (die Luftblasen erreichen deshalb die Nanostrukturierungen) findet der Kontakt mit der Oberfläche oder dem Bewuchs statt. Weitere Untersuchungen an biologischen Oberflächen sollen klären,

ob die Kombination von Strukturierung und oberflächenchemischen Merkmalen auf ein allgemeines Reinigungsprinzip darstellen, dessen Kenntnis mir zur Entwicklung sich selbstreinigender Oberflächen wichtig erscheint, wobei der "Lotus-Effekt" der landlebenden Lebewesen und der "Inverse Lotus-Effekt" bei aquatischen Organismen sicherlich die beiden Extreme darstellen. Adaptive Variationen der Kennzeichen Topologie und Benetzbarkeit sind in Hinblick auf ein aktives (z.B. Springen) oder passives (z.B. Beregnung) Reinigungsverhalten, die Größe der zu entfernenden Partikel (z.B. Stäube oder Organismen) oder deren Partikelchemie zu erwarten.

4.5 Resumée

Die mit bloßem Auge makellos saubere Haut der Delfine hat mich dazu bewogen, tiefergehende Untersuchung zu den Grundlagen ihrer Selbstreinigungsmechanismen durchzuführen. Im Laufe der Untersuchung hat sich aufgrund der geringen Belastung durch Biofouling-Organismen herausgestellt, dass die Haut des Pilotwales, *Globicephala melas*, ein biologisch effizientes Anti-Bewuchssystem aufweist und damit ein bionisches Vorbild für umweltneutrale Bewuchsschutzfarben sein könnte.

Im Stratum corneum des Integumentes der Delfine kooperieren mehrere Schutzfunktionen, die in Verbindung mit der Erzeugung von Luftblasen und Scherströmung während des Springens zur Selbstreinigung der Haut beitragen (Abb. 4-5). Die aus den Ergebnissen abgeleiteten topologischen, biochemischen und physikalischen Reinigungskomponenten stören meiner Meinung nach schon frühzeitig den Aufbau eines Biofilms. Neben dem Abtrag von Organismen kann auch deren Verdünnung von entscheidendem Vorteil sein. Hierbei entkoppelt beispielsweise die Verdünnung von Bakterienkolonie-initierenden Lactonen (FLEMMING und WINGENDER 2001) trotz der Anwesenheit von Mikroorganismen diese von deren Vermögen, Kolonien zu bilden.

Der epidermale Verhornungsprozess, der langsamer abläuft als bisher angenommen, reguliert die Abschuppungsrate von Hautzellen (50 x 80 µm) und Zellcluster (100 x 300 µm). Die Abschuppung von Hautzellen wirkt sich förderlich auf die Selbstreinigung der Hautoberfläche aus, indem Besiedler in der Größe dieser Schuppen und

Cluster von der Hautoberfläche entfernt werden. Zudem sind der Delfinhautoberfläche besondere Nanostrukturen eigen, die sich von dem kompositen, mit Gel gefüllten desmosomalen Porenrelief der Einzelzelle ableiten. Die enge Porenverteilung mit Porengrößen unterhalb der Größe mariner Biofouling-Organismen bewirkt, dass der Kontakt dieser Organismen auf die Spitzen oder die Ränder dieses Porenreliefs beschränkt bleibt. An der somit glatten Hautoberfläche fehlen Nischen, in denen sich Biofouling-Organismen vor dem Abtrag durch Scherströmung und dem Kontakt mit Luftblasen verstecken können. Dieses topologische Abwehrsystem, das auf Größenausschluss beruht, wird durch die Füllung der Poren mit einem Gel in Form eines viskoelastischen Zymogel um biochemisch und physikalisch wirksame Komponenten erweitert, so dass auch die Abwehr von adhäsiven Polymeren möglich ist, die kleiner als die Poren ausfallen und sich nicht durch sterische Abwehrmechanismen beseitigen lassen.

Die in das Gel eingebundenen hydrolytischen interzellulären Enzyme führen nicht nur zur Trennung der Zellen von der Hautoberfläche, sondern sind auch hilfreich bei der Spaltung von Adhäsionsmolekülen in kleinere und fließfähigere Einheiten, so dass sich deren Abtrag durch Scherströmung und Kontakt mit Luftblasen wesentlich erleichtert. Neben den Enzymen enthält das Stratum corneum gelbildende saure und neutrale Glykoproteine, deren enzymatische Abbauprodukte vermutlich wie bei behaarten Säugern die Abwehr von Mikroorganismen verstärken.

Als bisher unberücksichtigte, physikalische Reinigungskomponente bildet das makromolekulare Coating, das sich im Interzellularraum des Stratum corneums vom Sol zum Gel wandelt, die stoffliche Grundlage für die glatte Hautoberfläche. Zudem ist die gelierte Form der Interzellulärschicht in einem weiten Bereich mechanischer Belastungen stabil. Durch das hohe Maß an Selbstaffinität verhindert die Aggregation der interzellulären Substanzen deren Verdünnung im Kontakt mit Meerwasser und bildet die stoffliche Grundlage für den Einschluss von Enzymen. In seiner Eigenschaft als kovalent vernetztes Multiphasen-System werden durch die Gelbildung hohe Stressresistenzen und Dämpfungseigenschaften gegenüber mechanischer Energie erzeugt, die ein Auswachsen des Gels aus der Poren der Corneocyten erschweren.

Die Höhe der mechanischen Belastbarkeit unterscheidet das Gel der Delfinhaut von den weniger belastbaren mukoiden Schleimen von Biofilmen. Dieser Gradient in der

Rheodestruktivität ist in Hinblick auf die Anwesenheit von Scherströmung und Luftblasen während des Springens bedeutsam für die Selbstreinigungsfähigkeit, weil aufgrund dieses Gradienten Schleime im Gegensatz zum Gel der Delfinhaut bei geringerer mechanischer Belastung einen Einbruch an struktureller Integrität erleiden.

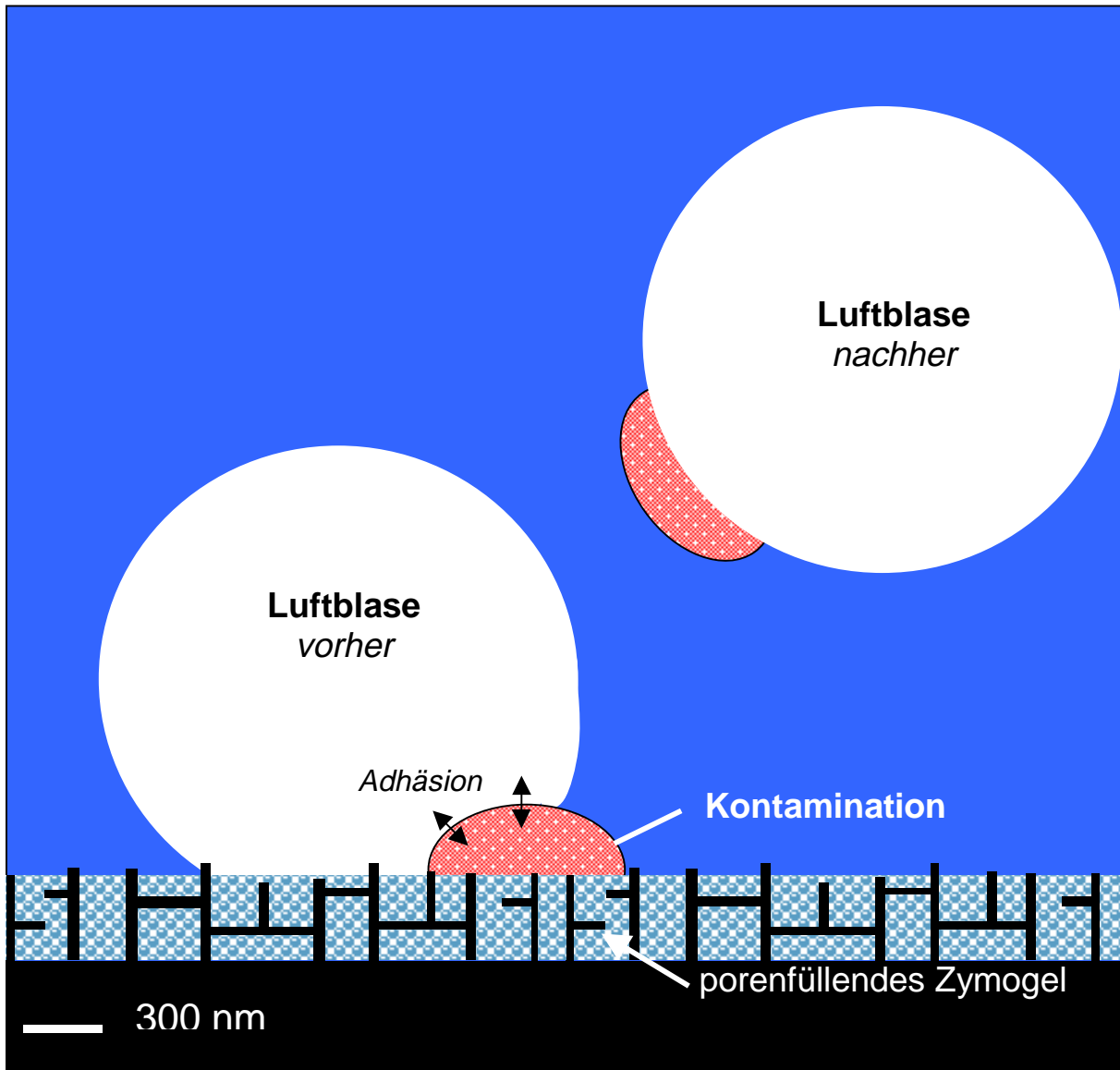


Abb. 4-5: In der hier entwickelten Modellvorstellung zu den Reinigungsvorgängen an der Delfinhaut kommen Kontaminationen auf der von Gel geschützten Oberfläche zu liegen. Luftblasen und erhöhte Scherströmung, die während der Sprungphase erzeugt werden, erreichen diese Kontaminationen und führen zu ihrem Abtrag.

4.6 Ableitung bioanaloger Kennzeichen der Delfinhaut

Von der derzeitigen Diskussion über den Einsatz giftiger Bewuchsschutzfarben motiviert wurde in dieser Untersuchung ein bionischer Ansatz verfolgt, der sich die Haut der Delfine zum Vorbild für umweltneutrale Bewuchsschutzfarben nimmt. Aus den Befunden, die eine wesentliche Bedeutung der makromolekularen Ummantelung der Corneocyten in Verbindung mit nanotopologischen Kennzeichen hervorheben, waren bioanaloge Merkmale abzuleitenden, die für technische Entwicklungen von Bedeutung sein können (Tab. 4-1). Eine Kombination von Oberflächenmerkmalen und Aeration mit Luftblasen erscheint vor dem Hintergrund der Untersuchungsergebnisse eine begründeter Lösungsweg, um den Schiffsbetrieb umweltverträglicher zu gestalten.

Die in ihrer Ursache-Wirkung zu erfassenden Merkmale der Delfinhaut sollen hierbei als Optimierungsschritte für ein bionisches Re-Design bestehender Antifouling-Beschichtungen verstanden werden.

Tab. 4-1: Ableitung bioanaloger Kennzeichen der Delfinhaut für ein bionisches Re-Design bestehender Antifoulings in Verbindung mit Aeration

Delfinhaut	Bioanaloge Kennzeichen	Effekt
Kontunierliche Abschuppung (zeitliche Qualität)	self-polishing	Abtrag nanoskaliger Verunreinigungen
Abschuppung in Form von flachen Zellen und Zellverbänden (räumliche Qualität)	self-fragmentation	Abtrag mikroskaliger Verunreinigungen
Nachwachsen der Haut	ageing	Erneuerung der Oberfläche
Nanorraue Oberfläche	contact reduction	Abwesenheit von Nischen
Gel	smoothing plastifying shock-absorbing	Verminderung der Rauigkeit Erhöhung der Deformierbarkeit Erhöhung der Streßresistenz bei gleichbleibender struktureller Integrität
Heterogene Oberflächenchemie	binding unspecific binding	enthält Wirkstoffe in einer Matrix Geringe Selektivität für adhäsive Stoffe
Enzyme, Defenseine? antimikrobielle Polypeptide?	biochemical defending	Hydrolyse von Verunreinigung, Wachstumshemmer

5. Literaturverzeichnis

1. **ABARZUA, S.; S. JAKUBOWSKI (1995):** Biotechnological investigation for prevention of biofouling. I. Biological and biochemical principles for the prevention of biofouling. Mar. Ecol. Prog. Ser. 123, 301-312
2. **ABDUL-HAQQ, A.J.; W.T. SHIER (1991):** Ichyocrinotoxins and their potential use as shark repellents. J. Toxicol.: Toxin Rev. 10, 289-320
3. **ABEND, A.G.; T.D. SMITH (1999):** Review of distribution of the long-finned pilot whale (*Globicephala melas*) in the North Atlantic and Mediterranean. NOAA Tech. Memo. NMFS-NE. 117, 22
4. **ACHTSTAETTER, T.; M. HATZFELD; R.A. QUINLAN; D.C. PARMELEE; W.W. FRANKE (1986):** Separation of cytokeratin polypeptides by gel electrophoretic and chromatographic techniques and their identification by immunoblotting. Methods Enzymol. 134, 355-371
5. **ALEXANDER, J.B.; G.A. INGRAM (1992):** Non-cellular non-specific defense mechanisms of fish. Annu. Rev. Fish Dis. 2, 249-279
6. **ALUWIHARE, L.I.; D.J. REPETA (1999):** A comparison of the chemical characteristics of oceanic DOM and extracellular DOM produced by marine algae. Mar. Ecol. Prog. Ser. 186, 105-117
7. **ALUWIHARE, L.I.; D.J. REPETA; R.F. CHEN (1997):** A major biopolymeric component to dissolved organic carbon in surface sea water. Nature 387, 166-169
8. **BANNASCH, R. (1995):** Hydrodynamics of penguins - an experimental approach. In: Advances in Penguin Biology. DANN, P.; I. NORMAN; I. REILLY (Hrsg.), Surrey Beatty, Sydney.
9. **BARTHLOTT, W.; C. NEINHUIS (1997):** Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. Planta 202, 1-8
10. **BAUM, C. (1997):** Calcium in der Epidermis des Weißseitendelphins *Lagenorhynchus acutus* (Gray, 1828) in Histochemie, semiquantitativer energiedisperser Röntgenmikroanalyse (EDXA) und Mikroradiographie. Diplomarbeit, Universität Bremen/ Universität Wien
11. **BAUM, C.; R. STELZER; W. MEYER; L.-G. FLEISCHER; D. SIEBERS (2000):** A cryo-scanning electron microscopic study of the skin surface of the pilot whale *Globicephala melas*. Aquat. Mamm. 26, 7-16

12. **BAUM, C.; L.-G. FLEISCHER; W. MEYER; D. SIEBERS, R. STELZER (2001A):** Gelation kinetics of the gel collected from the corneocytes of the pilot whale, *Globicephala melas*. *Zoology (Jena)* 104 [Suppl. IV], 53
13. **BAUM, C.; W. MEYER; D. ROESSNER; L.-G. FLEISCHER, D. SIEBERS (2001B):** A zymogel enhances the self-cleaning abilities of the pilot whale (*Globicephala melas*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 130, 835-847
14. **BAUM, C.; W. MEYER; R. STELZER; L.-G. FLEISCHER, D. SIEBERS (2002A):** Average nanorough skin surface of the pilot whale (*Globicephala melas*, *Delphinidae*): considerations on the self-cleaning abilities based on nanoroughness. *Mar. Biol.* 140, 653-657
15. **BAUM, C.; L.-G. FLEISCHER; D. ROESSNER; W. MEYER, D. SIEBERS (2002B):** A covalently cross-linked gel derived from the epidermis of the pilot whale, *Globicephala melas*. *Biorheology* 39 (6), im Druck
16. **BAUM, C.; F. SIMON; W. MEYER; L.-G. FLEISCHER; D. SIEBERS; J. KACZA; J. SEEGER (2002):** Surface properties of the skin of delphinids. 11th Int. Con. Mar. Cor. Biofoul., San Diego, *in Vorbereitung, Sonderband BIOFOULING*
17. **BEAMSON, G.; D. BRIGGS (1992):** High resolution of organic polymers, The Sienta ESCA 300 Database, J. Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapur
18. **BECKER, K. (1998):** Detachment studies on microfouling in natural biofilms with different surface tension. *Int. Biodeter. Biodegrad.* 41, 93-100
19. **BEREITER-HAHN, J.; M. OSBORN; K. WEBER; M. VOETH (1979):** Filament organization and formation of microridges at the surface of fish epidermis. *J. Ultrastruct. Res.* 69, 316-330
20. **BERGSTRESSER P.R.; J.R. TAYLOR (1977):** Epidermal turnover time- a new examination. *Br. J. Dermatol.* 96: 503-509
21. **BEVERIDGE, T.J.; S.A. MAKIN; J.L. KADURUGAMUVA; Z. LI (1997):** Interactions between biofilm and the environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 20, 291-303
22. **BLOCH, D.; G. DESPORTES; R. MOURITSEN; S. SKAANING; E. STEFANSSON (1993):** An introduction to studies of the ecology and status of the long-finned pilot whale (*Globicephala melas*) of the Faroe Islands, 1986-1988. *Rep. Int. Whal. Commn (Special Issue)* 14, 1-32
23. **BOS, R.; H.C. VAN DER MEI; J. GOLD; H.J. BUSSCHER (2000):** Retention of bacteria on substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Let.* 189, 311-315

24. **BUSCHMANN, M.D.; Y.A. GLUZBAND; A.J. GRODZINSKY; E.B. HUNZIKER (1995):** Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/ agarose culture. *J. Cell Sci.* 108, 1497-1508
25. **BROWN, W.R.; J.R. GERACI; B.D. HICKS; D.J. St.AUBIN; J.P. SCHROEDER (1983):** Epidermal cell proliferation in the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus*. *Can. J. Zool.* 61, 1587-1590
26. **CHIN, W.C.; M.V. ORELLANA; P. VERDUGO (1998):** Spontaneous assembly of marine dissolved organic matter into polymer gels. *Nature* 391, 568-572
27. **COBB, C.E.; A.H. BETH (1990):** Identification of the Eosin-5-maleimide reaction site on the human erythrocyte anion-exchange protein: overlap with the reaction sites of other chemical probes. *Biochemistry* 29, 8283-8290
28. **COOKSEY, K.E.; B. WIGGLESWORTH-COOKSEY (1985):** Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: a review. *Aquat. Microb. Ecol.* 9, 87-96
29. **COWLING, M.J.; T. HODGKIESS; A.C.S. PARR; M.J. SMITH; S.J. MARRS (2000):** An alternative approach to antifouling based on analogues of natural processes. *Sci. Total Environ.* 258, 129-137
30. **DAGASTINO, L.; A.E. GOODMAN; K.C. MARSHALL (1991):** Physiological responses induced in bacteria adhering to surfaces. *Biofouling* 4, 113-119
31. **DENYS, L. (1997):** Morphology and taxonomy of epizoic diatoms (*Epiphialina* and *Tursiocola*) on a sperm whale (*Physeter macrocephalus*) stranded on the coast of Belgium. *Diatom Res.* 1, 1-18
32. **DEY, S.; T.S. BASU BAUL; B. ROY, D. DEY (1989):** A new rapid method of air-drying for scanning electron microscopy using tetramethylsilane. *J. Microsc.* 156, 259-261
33. **DIERAUF, L.A. (1990):** Marine mammals parasitology. In: *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease, and Rehabilitation*. DIERAUF, L.A. (Hrsg.). CRC Press, Boca Raton, Florida, 89-96
34. **DIETRICH G.; K. KALLE; W. KRAUSS; G. SIEDLER (1975):** Allgemeine Meereskunde. Eine Einführung in die Ozeanographie. 3. Neubearbeitete Auflage, Gebrüder Borntraeger, Berlin, 87-95
35. **DONOIS, E.; V. DEL MARMOL; A. TAIEB; G. GHANEM; J.-E. SURLEVE-BAZAILLE (1998):** Quantification of eumelanin and pheomelanin. *Analyt. Quant. Cytol. Histol.* 20, 275-287

36. **DUNN, L. J. (1990):** Bacterial and mycotic diseases of cetaceans and pinnipeds. In: CRC Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, disease, and rehabilitation. DIERAUF, L.A. (Hrsg.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 73-87
37. **ELIAS, P.M.; G.K. MENON; S. GRAYSON; B.E. BROWN; S.J. REHFELD (1987):** Avian sebokeratinocytes and marine mammals lipokeratinocytes: structural, lipid biochemical, and functional considerations. *Am. J. Anat.* 180, 161-177
38. **EDWARDS K.J.; A.D. RUTENBERG (2001):** Microbial response to surface microtopography: The role of metabolism in localized mineral dissolution. *Chem. Geol.* 180, 19-32
39. **EMOTO, K.; Y. NAGASAKI; M. IJIMA; M. KATO; K. KATAOKA (2000):** Preparation of non-fouling surface through the coating with core-polymerized block polymer micelles having aldehyde-ended PEG shell. *Coll. Surf. B: Biointerfaces* 18, 337-346
40. **FERRY, J.D. (1980):** Viscoelastic Properties of Polymers, John Wiley New York
41. **FLEMMING H.-C., J. WINGENDER (2001):** Biofilme- die bevorzugte Lebensform der Bakterien. *BIUZ* 3, 169-180
42. **FIRTH, K.J.; S.C. JOHNSON; N.W. ROSS (2000):** Characterization of proteases in the skin mucus of Atlantic salmon (*Salmo salar*) infected with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) and in whole-body louse homogenate. *J. Parasitol.* 86, 1199-1205
43. **FUKUYAMA, K.; W.L. EPSTEIN (1984):** Keratohyalin. In: Biology of the Integument, 2 Vertebrates, Chapt. 36, BEREITER-HAHN, J.; A.G. MATOLTSY; K.S. RICHARDS (Hrsg.), Springer Berlin, 739-751
44. **DA GAMA, B.A.P.; R.C. PEREIRA, A.G.V. CARVALHO, R. COUTINHO; Y. YONESHIQUE-VALENTIN (2002):** The effects of seaweed metabolites on biofouling. *Biofouling* 18, 13-20
45. **GERACI, J.R.; D.J. St. AUBIN; B.D. HICKS (1986):** The epidermis of odontocetes: a view from within. In: Research on Dolphins. Part 1. BRYDEN, M.M.; R. HARRISON (Hrsg.), Clarendon Press, Oxford, 3-21
46. **GOL'DIN, E.B. (1994):** The black sea bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and overgrowing microalgae: some aspects of interrelations. In: Proceedings of the First International Symposium on the Marine Mammals of the Black Sea, Istanbul, Turkey, 24-27

47. **GOTTENBOS, B.; D.W. GRIJPMAN; H.C. VAN DER MEI; J. FEIJEN; H.J. BUSSCHER (2001):** Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering gram-positive and gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 48, 7-13
48. **GUCINSKI, H.; R.E. BAIER; A.E. MEYER; M.S. FORMALIK; R.W. KING (1984):** Surface microlayer properties affecting drag phenomena in seawater. In: *Proceedings of the 6 th Marine Corrosion Congress, Athens, Greece*, 1-24
49. **GUCINSKI, H. (1986):** Correlation of biophysical surface characteristics with hydrodynamic properties of adhesive biofilms. Dissertation, Universität New York, Buffalo, USA
50. **HALDIMAN, J.T.; W.G. HENK; R.W. HENRY; T.F. ALBERET; Y.Z. ABDELBAKI; D.W. DUFFIELD (1985):** Epidermal and papillary dermal characteristics of the bowhead whale (*Balaena mysticetus*). *Anat. Rec.* 211, 391-402
51. **HARRISON, R.J.; K.W. THURLEY (1972):** Fine structural features of delphinid epidermis. *J. Anat.* 111, 498-500
52. **HARRISON, R.J.; K.W. THURLEY (1974):** Structure of the epidermis in *Tursiops*, *Delphinus*, *Orcinus* and *Phocoena*. In: *Functional Anatomy of Marine Mammals*. Vol. 2. HARRISON, R.J. (Hrsg.), Academic Press, London, 45-72
53. **HICKS, D. B.; D.J. St. AUBIN; J.R. GERACI; W.R. Brown (1985):** Epidermal growth in the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. *J. invest. Dermatol.* 85, 60-63
54. **HOLMES, R.W. (1985):** The morphology of diatoms epizoic on cetaceans and their transfer from *Cocconeis* to new genera, *Bennettela* and *Epipellis*. *Br. phycol. J.* 20, 43-57
55. **HOYT, J.W. (1975):** Hydrodynamic drag reduction due to fish slimes. In: *Swimming and Flying in Nature*. Vol. 2. THEODORE, Y.; C.J. BROKAW; C. BRENNEN (Hrsg.) Plenum Press, New York, 653-672
56. **KLEIN, J. (2000):** Smart polymer solution, *Nature* 405, 745-747
57. **KNOSPE, C. (1989):** Zur Wasseranpassung der Walhaut. *Anat. Histol. Embryol.* 18, 193-198
58. **KOLB, A.M.; E.G.W.M. LENTJES; N.P.M. SMIT; A. SCHOTHORST; B.J. VERMEER; S. PAVEL (1997):** Determination of pheomelanin by measurement of aminohydroxyphenylalanine isomers with high performance liquid chromatography. *Analyt. Biochem.* 252, 293-298

59. **KULICKE, W.-M. (1985):** Fließverhalten von Stoffen und Stoffgemischen. Hüthig und Wepf, Basel
60. **LANDMANN, L. (1988):** The epidermal permeability barrier. *Anat. Embryol.* 178, 1-13
61. **Long-finned Pilot Whale (*Globicephala melas*) (2002):** Fact File <http://www.gn.apc.org/whales/dolphin8.shtml>
62. **LING, J.K. (1974):** The integument of marine mammals. In: *Functional Anatomy of Marine Mammals*. Vol. II/2. HARRISON, R.J. (Hrsg.), Academic Press, London, 1-44
63. **LIU R.J.; R.J. HARRISON, K.W. THURLEY (1986):** Characteristics of the skin of *Neophocoena phocaenoides* from Changjinang (Yangtse River), China. In: *Research on Dolphins*. BRYDEN, M.M.; R.J. HARRISON (Hrsg.), Clarendon Press, Oxford, 23-31
64. **LUNDSTROM, A.; T. EGELRUD (1988):** Cell shedding from human plantar skin in vitro: evidence of the its dependence on endogenous proteolysis. *J. Invest. Dermatol.* 91, 340-343
65. **MAC FARLANE, A.G.J. (1967):** *Engineering Systems Analysis*, G.G. Harrap & Co London
66. **MAMMOTO, A.; N. MASUMOTO; M. TAHARA; M. YONEDA; T. NISHIZAKI; K. TASAKA; A. MIYAKE (1997):** Involvement of a sperm protein sensitive to sulfhydryl-depleting reagents in mouse sperm-egg fusion. *J. Exp. Zool.* 278, 178-188
67. **MARINIELLO, L.; S. CERONI; D. DI-CAVE; R. CARLINI (1994):** Metazoan parasites of *Stella coeruleoalba*. *Parasitologia* 36, 88
68. **MENON, G.K.; S. GRAYSON; B.E. BROWN; P.M. ELIAS (1986):** Lipokeratinocytes of the epidermis of a cetacean (*Phocoena phocoena*). *Cell Tiss. Res.* 244, 385-394
69. **MEYER, W. (1986):** *Die Haut des Schweines (The Porcine Integument)*. Schlütersche Verlagsanstalt, Hannover
70. **MEYER, W.; C. SCHLESINGER (1991):** Electron microscopical demonstration of thiols and disulphides in the porcine epidermis. *Histochem. J.* 23, 419-425
71. **MEYER, W.; K. NEURAND; M. KLIMA (1995):** Prenatal development of the integument in Delphinidae (Cetecea: Odontoceti). *J. Morphol.* 233, 265-287

72. **MEYER W.; M. BOLLHORN; M. STEDE (2000):** Aspects of general antimicrobial properties of the skin secretion in the Common seal (*Phoca vitulina*). Dis. Aquat. Org. 41, 77-79
73. **MEYER W, K. NEURAND, A. TANYOLAC (2001):** General anti-microbial properties of the integument in fleece producing sheep and goats. Small Ruminant Res. 41, 181-190
74. **MITTAL, A.K.; T.K. GARG; M. VERMA (1995):** Surface architecture of the Indian catfish, *Bagar bagarius* (Hamilton) (Sisoridae, Siluriformes). Jpn. J. Ichthyol. 42, 187-191
75. **MOULDER J.F.; W.F. STICKLE; P. SOBOL; K.D. BOMBEN; J. CHASTAIN (1992):** PHI-Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy. Perkin-Elmer Corp., Eden Prairie, 60-61
76. **MOORE K.S.; S. WEHRLI; H. RODER; M. ROGERS; J.N. FORREST; D. McCRIMMON; M. ZASLOFF (1993):** Squalamine: An aminosterol antibiotic from shark. Proc. Nat. Acad. Sci. 90, 1354-1358
77. **MORENO, J.; M. ANGELS VARGAS. J.M. MADIEDO; J. MUNOZ; J. RIVAS, M.G. GUERRENO (2000):** Chemical and rheological properties of an extracellular polysaccharide produced by the cyanobacterium *Anabaena* sp. ATCC 33047. Biotechnol. Bioeng. 67, 283-290
78. **NACHTIGALL, W. (2000):** Leben in der Grenzschicht. BIUZ 30, 148-157
79. **NAKAGAWA, H.; N. ENOMOTO; M. ASAKAWA (1987):** Occurrence of glycosidases and enzymatic properties of N-acetylhexoaminidases in the external mucous material of various fish. Nippon Suisan Gakkaishi Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 53, 1039-1054
80. **NEMANIC, M.K.; J.S. WHITEHEAD; P.M. ELIAS (1983):** Alterations in membrane sugars during epidermal differentiation: visualization with lectins and role of glycosidases. J. Histochem. Cytochem. 31, 887-897
81. **NIJENHUIS TE, K. (1997):** Thermoreversible networks-viscoelastic properties and structure of gels. Adv. Polym. Sci. 130, 1-252
82. **PASMORE, M.; P. TODD; B. PFIEFER; M. RHODES; C.N. BOWMAN (2002):** Effect of polymer surface properties on the reversibility of attachment of *Pseudomonas aeruginosa* in the early stages of biofilm development. Biofouling 18, 65-71
83. **PASSOW, U. (2000):** Formation of transparent exopolymer particles, TEP, from dissolved precursor material. Mar. Ecol. Prog. Ser. 192, 1-11

84. **PEARSE, A.G.E. (1968):** Histochemistry. Theoretical and Applied. 3. revidierte Ausgabe, Vols 1 und 2, Churchill-Livingstone, Edinburgh
85. **PFEIFFER, C.J. (1992):** Cellular structures of terminal baleen in various mysticete species, *Aquat. Mamm.* 18, 67-73
86. **PFEIFFER, C.J.; F.M. JONES (1993):** Epidermal lipid in several cetacean species: ultrastructural observations. *Anat. Embryol.* 188, 209-218
87. **PFEIFFER, C. J.; V.J. ROWNTREE (1996):** Epidermal ultrastructure of the southern right whale calf (*Eubalaena australis*). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 28, 277-286
88. **PICIOREANU, C.; M.C. VAN LOOSDRECHT; J.J. HEIJNEN (2000):** Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotech. Bioeng.* 72, 207-218
89. **PIERARD G.E.; V. GOFFIN; T. HERMANNNS-LE; C. PIERARD-FRANCHIMONT (2000):** Corneocyte desquamation (Review). *Int. J. Mol. Med.* 6, 217-221
90. **RAMUS, J.; B.E. KENNEY (1989):** Shear degradation as a probe of microalgal exopolymer structure and rheological properties. *Biotech. Bioeng.* 34, 1203-1208
91. **RIELLY, C.D. (1997):** Food rheology. In: *Chemical Engineering for the Food Industry*. FRYER, P.J.; D.L. PYLE; C.D. RIELLY (Hrsg.), Blackie A&P, Chapman and Hall, 195-233
92. **RIGA, J.; J.-J. VERBIST (1983):** The disulphide group in organic compounds: conformational dependence of core and valence sulphur electronic levels by X-ray photoelectron spectroscopy. *J. Chem. Perkin Trans. II* 10, 1545-1552.
93. **SCHLICHTING H.; K. GERSTEN (1997):** Grenzschicht-Theorie. 9. Auflage. Springer, Heidelberg
94. **SEDEV, R.V.; J.G. PETROV; A.W. NEUMANN (1996):** Effect of swelling of polymer surface an advancing and receding contact angles. *J. Coll. Int. Sci.* 180, 36-42
95. **SKERROW, D. (1984):** Epidermal α -keratin: structure and chemical composition. In: *Biology of the Integument, 2 Vertebrates*, Chapt. 31, BEREITER-HAHN, J.; A.G. MATOLTSY; K.S. RICHARDS (Hrsg.), Springer Berlin, 621-643
96. **SMITH, T.G.; D.J. St. AUBIN, M.O. HAMMILL (1992):** Rubbing behavior of belugas, *Delpinapterus leucas*, in a high Arctic estuary. *Can. J. Zool.* 70, 2405-2409

97. **SOLTANI, M. (1998):** Review of the literature relating to the antibacterial properties of piscine skin mucus. *J. Faculty Vet Med.* 53, 31-34
98. **SPEARMAN, R.I.C. (1972):** The epidermal stratum corneum of the whale. *J.Anat.* 113, 373-381
99. **St. AUBIN, D. J.; T.G. SMITH; J.R. GERACI (1990):** Seasonal epidermal molt in beluga whales, *Delphinapterus leucas*. *Can. J. Zool.* 68, 359-367
100. **STEINERT P.M. (1983):** Epidermal keratin: filament and matrix. In: *Stratum corneum*. MARKS, R., G. PLEWIG (Hrsg.) Springer Berlin, 25-38
101. **STOODLEY, P; Z. LEWANDOWSKI; J.D. BOYLE; H.M. LAPPIN-SCOTT (1998):** Oscillation characteristics of biofilm streamers in turbulent flowing water as related to drag and pressure drop. *Biotechnol. Bioeng.* 57, 536-544
102. **STOODLEY, P; Z. LEWANDOWSKI; J.D. BOYLE; H.M. LAPPIN-SCOTT (1999):** Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: an *in situ* investigation of biofilm rheology. *Biotechnol. Bioeng.* 65, 83-92
103. **SUAREZ, C.G.; J. NOORDMANS; H.C. VAN DER MEI; H. BUSSCHER (1999):** Detachment of colloidal particles from collector surfaces with different electrostatic charge and hydrophobicity by attachment to air bubbles in parallel plate flow chamber. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 1, 4423-4427
104. **SUAREZ, C.G. (2001):** Air-bubble-induced detachment of colloidal particles and microorganisms from surfaces. Dissertation, Universität Groningen, Niederlande
105. **SUH, J.K; Z.F. LI, SL.-Y. WOO (1995):** Dynamic behavior of a biphasic cartilage model under cyclic compressive loading. *J. Biomechanics.* 28, 357-364
106. **SUTHERLAND, I.W. (1994):** Structure-function relationship in microbial exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 12, 393-448
107. **SUZUKI, Y.; J. NOMURA; J. KOYAMA; I. HORII (1996):** The role of proteases in stratum corneum: involvement in stratum corneum desquamation. *Arch. Dermatol. Res.* 286, 249-253
108. **TOSTESON, T.R. (1984):** The regulation and specificity of marine microbial surface interactions. In: *Biotechnology of Marine Polysaccharides*. Abschnitt 3. CLOWELL, R.P.; E.R. PARISIERS; A.J. SIMSKEY (Hrsg.), Hemisphere Publishing Corporation Washington, 77-114

109. **TURNER, N.H.; J.S. MURDAY; D.E. RAMAKER (1980):** Quantitative determination of surface composition of sulfur bearing anion mixtures by Auger electron spectroscopy. *Anal. Chem.* 52, 84-92
110. **USHAKOV, N.A. (1991):** Microbiological examination of the skin and vaginal mucus of the Amazon freshwater dolphin *Inia geoffrensis* in relation to the physiological state of animal. *Proc. U.S.S.R. Acad. Sci. Biol.* 6, 943-949
111. **VANDEVIVERE, P.; D.J. KIRCHMAN (1993):** Attachment stimulates exopolysaccharides synthesis by a bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3280-3286
112. **WAGNER, T.; C. NEINHUIS, W. BARTHLOTT (1996):** Wettability and contaminability of insect wings as a function of their surface sculpture. *Acta Zool.* 77, 213-225
113. **WAHL, M. (1989):** Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 58, 175-189
114. **WAHL, M. (1997):** Natürliche Verteidigungssysteme gegen Aufwuchs. *DGM-Mitteilung* 4, 8-12
115. **WAHL, M.; K. KRÜGER; W. FENICAL (1994):** Chemical control of bacterial epibiosis on ascidians. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 110, 45-57
116. **WALSH, A.; S.J. CHAPMAN (1991):** Sugar protect desmosome and corneosome glycoproteins from proteolysis. *Arch. Dermat. Res.* 283, 174-179
117. **WERTZ, P.W. (1984):** Lipids of keratinizing tissues. In: *Biology of the Integument*, 2 Vertebrates, Chapt. 42, BEREITER-HAHN, J.; A.G. MATOLTSY; K.S. RICHARDS (Hrsg.), Springer Berlin, 815-822
118. **WEISS, C.; W. JELKMANN (1990):** Funktionen des Blutes. In: *Physiologie des Menschen*. 24. Auflage. SCHMIDT, R.F.; THEWS, G. (Hrsg.), Springer Berlin, 424
119. **WIRTH, U. (1999):** Vergleichende Untersuchungen zur Struktur und Funktion der Hautschichten bei Fischen unter besonderer Berücksichtigung von Hautsekreten. Dissertation, Universität Hannover, Deutschland
120. **WYATT, P.J. (1993):** Lightscattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analyt. Chim. Acta* 272, 1-40
121. **WYATT TECHNOLOGY DEUTSCHLAND (1994):** Eine kurze Einführung in die Ausschlußchromatographie-Vielwinkelstreulichtdetektor-Technik mit dem Dawn-F. Wyatt Technology Deutschland GmbH

122. **ZHU, W.; J.C. IATRIDIS; V. HLIBCZUK; A. RATCLIFFE; V.C. MOW (1996):** Determination of collagen-proteoglycan interactions *in vitro*. J. Biomechanics 29, 773-783

Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Publikationen:

BAUM, C.; R. STELZER; W. MEYER; L.-G. FLEISCHER; D. SIEBERS (2000): A cryo-scanning electron microscopic study of the skin surface of the pilot whale *Globicephala melas*. Aquat. Mamm. 26, 7-16

BAUM, C.; W. MEYER; D. ROESSNER; L.-G. FLEISCHER, D. SIEBERS (2001B): A zymogel enhances the self-cleaning abilities of the pilot whale (*Globicephala melas*). Comp. Biochem. Physiol. A 130, 835-847

BAUM, C.; W. MEYER; R. STELZER; L.-G. FLEISCHER, D. SIEBERS (2002A): Average nanorough skin surface of the pilot whale (*Globicephala melas*, *Delphinidae*): considerations on the self-cleaning abilities based on nanoroughness. Mar. Biol. 140, 653-657

BAUM, C.; L.-G. FLEISCHER; D. ROESSNER; W. MEYER, D. SIEBERS (2002B): A covalently cross-linked gel derived from the epidermis of the pilot whale, *Globicephala melas*. Biorheology 39(6), *im Druck*

Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Tagungsbeiträge:

BAUM, C.; L.-G. FLEISCHER; W. MEYER; D. SIEBERS, R. STELZER (2001A): Gelation kinetics of the gel collected from the corneocytes of the pilot whale, *Globicephala melas*. Zoology (Jena) 104 [Suppl. IV], 53

BAUM, C.; F. SIMON; W. MEYER; L.-G. FLEISCHER; D. SIEBERS; J. KACZA; J. SEEGER (2002): Surface properties of the skin of delphinids. 11th Int. Con. Mar. Cor. Biofoul., San Diego, *in Vorbereitung, Sonderband BIOFOULING*

Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangenes Patent:

Stiftung Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung Bremerhaven (**Baum, C.; L.-G. Fleischer; W. Meyer; D. Siebers**): Biozidfreie Antifouling-Beschichtung mit „Lotus-Effekt“ für Unterwasserflächen, eingereicht April 2001

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1:	Eine Pilotwal-Gemeinschaft (Färör-Inseln)	3
Abb. 3-1:	Oberflächenhabitus der Haut des Pilotwales, 100 μm	25
Abb. 3-2:	Oberflächenhabitus der Haut des Pilotwales, 100 μm	26
Abb. 3-3:	Bewuchskontrolle an der Hautoberfläche des Pilotwales	27
Abb. 3-4:	Dehydratisierungsmuster an der Hautoberfläche, 100 μm	28
Abb. 3-5:	Oberflächenhabitus der Hautoberfläche, 10 μm	29
Abb. 3-6:	Gelbedeckung der Hautoberfläche, 1 μm	30
Abb. 3-7:	Gefrierbruch der chemisch unbehandelten Hautoberfläche, 10 μm	32
Abb. 3-8:	Gefrierbruch durch die obere Epidermis, 10 μm	33
Abb. 3-9:	Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des Porenreliefs	34
Abb. 3-10:	Rasterelektronenmikroskopische Darstellung des trypsinierten Porenreliefs	35
Abb. 3-11:	Rauigkeit eines Celluloseacetat-Filters	36
Abb. 3-12:	Spektrum der Porenverteilung	37
Abb. 3-13:	Transmissionselektronenmikroskopischer Querschnitt durch die Übergangszone (Stratum granulosum)	39
Abb. 3-14:	Transmissionselektronenmikroskopischer Querschnitt durch die Übergangszone (Stratum granulosum), Detail	40
Abb. 3-15:	Transmissionselektronenmikroskopischer Querschnitt durch die Übergangszone (Stratum granulosum), Detail	41
Abb. 3-16:	Transmissionselektronenmikroskopische Ansicht des oberen Interzellularraumes des Stratum corneums	42

Abb. 3-17:	Histochemische Darstellung saurer Glykokonjugate im oberen Anteil der Epidermis des Pilotwales	43
Abb. 3-18:	Histochemische Darstellung von Thiol-Gruppen im oberen Anteil der Epidermis des Pilotwales	44
Abb. 3-19:	Transmissionselektronenmikroskopischer Querschnitt durch das Gel	46
Abb. 3-20:	Kryo-rasterelektronenmikroskopische Ansicht der Geloberfläche vor der <u>in vitro</u> Polymerisation	47
Abb. 3-21:	Kryo-rasterelektronenmikroskopische Ansicht der Geloberfläche nach der <u>in vitro</u> Polymerisation	48
Abb. 3-22:	Gelpermeationschromatographische Auftrennung des zentrifugierten Stratum corneums	50
Abb. 3-23:	Gelpermeationschromatographische Auftrennung des zentrifugierten Stratum corneums zu verschiedenen Versuchszeiten	51
Abb. 3-24:	Zeitabhängiger Anstieg der Molmassen verdünnter Stratum corneum Lösungen	53
Abb. 3-25:	Lineare Abhängigkeit der Gyrationradien und der Molmassen	54
Abb. 3-26:	Stress-kontrollierte Gelkinetik des unverdünnten Zentrifugates	56
Abb. 3-27:	Konzentrationsabhängigkeit der Cross-over points von diversen unverdünnten und verdünnten Proben des zentrifugierten Stratum corneums	58
Abb. 3-28:	Strukturfaktoren von Gelkinetiken unterschiedlicher Verdünnungen	59
Abb. 3-29:	Abhängigkeit der Cross-over points von der Zentrifugationsgeschwindigkeit	61
Abb. 3-30:	Frequenz-Test. Speichermodul G'	62
Abb. 3-31:	Frequenztest. Verlustmodul G''	63
Abb. 3-32:	Deformations-Test	64
Abb. 3-33:	Prozentuale Verteilung polarer und unpolarer Gruppen an der Oberfläche der Haut des Pilotwales	70
Abb. 3-34:	Prozentuale Verteilung polarer und unpolarer Gruppen an der Oberfläche des Gels	71

Abb. 4-1:	Histochemischer Nachweis von Alanyl-Arylpeptidase Reaktionen in der oberen Epidermis des Pilotwales	76
Abb. 4-2:	Reduktion von Kontaktpunkten durch honigwabenförmige Vertiefungen	84
Abb. 4-3:	Kryo-rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Blattoberfläche der kanadischen Wasserpest	86
Abb. 4-4:	Theoretische Ableitung von Kontaktflächen zur Verkleinerung oder Vergrößerung von Kontaktpunkten	88
Abb. 4-5:	Modellvorstellung zur Selbstreinigung an der Hautoberfläche des Pilotwales	112

Tabellenverzeichnis

Tab. 3-1:	Photoelektronenspektroskopische Ergebnisse zu den Elementverhältnissen an der Haut- und Geloberfläche	66
Tab. 3-2:	Photoelektronenspektroskopische Ergebnisse zu den Kohlenstoff-Verbindungen der Haut- und Geloberfläche	68
Tab. 4-1:	Ableitung bioanaloger Kennzeichen als Vorbild umweltneutraler Bewuchsschutzfarben	114

„Selbstreinigungseigenschaften der Haut des Pilotwales, *Globicephala melas*“
 von Dipl. Biol. Christof Baum

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden mit optischen, chemischen und physikalischen Methoden ermittelte Ergebnisse über die Struktur-Funktions-Beziehungen der Hautoberfläche des Pilotwales beschrieben. Folgende Verfahren wurden angewendet: Histochemie in Verbindung mit Lichtmikroskopie (LM), Kryo-Rasterelektronenmikroskopie (Kryo-REM), Rasterelektronenmikroskopie (REM), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), Vielwinkel-Laser-Streulicht-Photometrie (engl., multi-angle laserlight scattering, MALLS), Photoelektronenspektroskopie für die chemische Analyse (ESCA) und Rheologie. Die experimentellen und theoretischen Untersuchungen hatten zum Ziel, die Strukturen und Eigenschaften der Haut haarloser mariner Säuger als Trenn- und Austauschfläche zwischen Organismus und Umwelt sowie ihre Funktion als Barriere gegenüber dem permanenten Besiedlungsdruck durch Biofouling-Organismen zu charakterisieren.

Kryo-rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass nur gelegentlich Aufwuchs an der Hautoberfläche des Pilotwales zu finden ist. Die Hautoberfläche von Pilotwalen wies eine laterale Rauigkeit unter 30 nm auf. Die strukturgebenden Rauigkeiten resultierten aus einem Porenrelief desmosomaler Glykoproteine mit Porengrößen um etwa $0,2 \mu\text{m}^2$, das mit einem Gel gefüllt war. Die biochemische Untersuchung des Stratum corneums ergab, dass die an Glykoproteinen reiche Interzellulärsubstanz Aggregate bildet. Die Aggregate bildeten sich als Vielfache aus einer Fraktion von 20-30 kD Glykoproteinen. Die chemische Oberflächenanalyse der Haut und des interzellulären Gels zeigten die Anwesenheit von unpolaren und polaren Gruppen. Zu den polaren Gruppen zählten freie Amino-Gruppen. Die chemische Analyse bestätigte, dass die chemische Zusammensetzung der Hautoberfläche wesentlich von der Zusammensetzung des Gels determiniert wird, welches die Poren der Interzellularräume ausfüllt. Die durch Zentrifugation angereicherte Interzellulärsubstanz des Stratum corneums erwies sich in rheologischen Experimenten unter mechanisch periodisch-harmonisch oszillierenden Belastungen als gelbildend. Die Geleigenschaften nach Beendigung der Strukturbildung entsprachen mit Speichermodulen $G' < 1200 \text{ Pa}$ und Verlustmodulen $G'' > 120 \text{ Pa}$ (bei fallender und steigender Frequenz ω zwischen 43,98 und $0,13 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ und einem Scherstress von $\tau = 15 \text{ Pa}$, $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$) chemisch kovalent vernetzten Gelen hoher Elastizität. Die Meßergebnisse an der Delfinhaut weisen gegenüber nicht-kovalent vernetzten Schleimen und Biofilmen, wie sie unter anderem aus Biofoulingprozessen bekannt sind, eine deutlich höher Elastizität und Stessunempfindlichkeit auf.

Basierend auf der Bildung eines viskoelastischen Gels im Interzellularraum des Stratum corneums bilden sich so bei der natürlichen Abschilferung von Hautzellen (Desquamation) an der Hautoberfläche des Pilotwales immer wieder neue Oberflächen mit lateralen Rauigkeiten unter 30 nm. Aus den Ergebnissen wird geschlossen, dass Schleime wegen der höheren Stressresistenz des Gels das Gel nicht aus den Poren verdrängen können und die Hautoberfläche in einem großen physikalischen Belastungsbereich eine viskoelastische ebene Fläche darstellt. Diese Ebene weist nur wenig Kontaktpunkte für Biofoulingorganismen auf und bietet wegen der Abwesenheit von Mikronischen gute Vorraussetzungen, Biofouler durch Scherströmungen oder Luftblasen während des für Delfine typischen Sprungverhaltens zu entfernen.

„Self-cleaning abilities of the skin of the pilot whale, *Globicephala melas*“

by Dipl. Biol. Christof Baum

Abstract

The skin surface of pilot whales was studied employing morphological and histochemical methods (C-SEM, SEM, TEM, LM), combined with biochemical analyses (MALLS and XPS), and rheological measurements, with emphasis on the interrelationship between structured and functional properties of the skin of dolphins. In the course of this study, these interrelationships were correlated to the function of the integument of hairless marine mammals as segregating layer and interphasis between the organism and its environment, and, in particular, as barrier against biofouling organisms.

The morphological results obtained during this investigation showed that the surface of the pilot whale skin exhibited negligibly low concentrations of epibiotic organisms. The smooth skin surface displaying the lateral roughness of less than approximately 30 nm was covered by a film of alternating hydrophilic and hydrophobic sectors ranging from approximately 0.1 to 200 μm in diameter. The texture of the skin surface was dominated by honeycomb-like pores formed by remnants of desmosomal junctions. The pores (ranging from 0.1 to 1.2 μm^2) were filled by a gel smoothing the skin surface. The results of the biochemical and histochemical studies showed that glycoconjugate-rich and proteinaceous aggregates accumulated in the intercellular spaces of the stratum corneum. Aggregates including multiples of fractions of 20-30 kD glycoproteins were, in addition, covalently cross-linked by thiol-groups, indicating the agglomeration of the intercellular components. Employing photoelectron-spectroscopical analyses, the skin surface and the intercellular gel displayed free amino groups and esters of lipids and aminoacids. In addition, the results obtained clearly demonstrated that the chemistry of the skin surface was considerably based on the specific components of the gel filling the pore reliefs of intercellular spaces. Rheological experiments were designed applying periodic-harmonic oscillating loads to the fluidal intercellular components extracted from the stratum corneum of the pilot whale by mild centrifugation. The results of the rheological experiments showed that the fluid transformed from sol to viscoelastic jelly solid. In the mechanical spectrum of the gel, the plateau region of the storage modulus G' (< 1200 Pa) and the loss modulus G'' (> 120 Pa) were independent from frequency ranging from $\omega = 43.98$ to $0.13 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$ (shear stress $\tau = 15 \text{ Pa}$, temperature $T = 20^\circ\text{C}$), indicating high elastic performance of a covalently cross-linked viscoelastic gel. Concerning the chemical cross-linked agglomeration and the high resistance against shear stress, the gel of the pilot whale contrasted to the soft mucilaginous biofilms known from the biofouling process.

Based on the formation of the gel within the intercellular spaces of the stratum corneum, the continuous natural desquamation process regenerates the smooth skin surface with low lateral roughness of approximately 30 nm. As concluded from the higher shear resistance the gel smoothing the skin surface cannot be substituted by mucus. Since the skin surface exhibits only few contact areas and microniches, which biofoulers might adhere to or hide in, settlements of fouling organisms is prevented by contacts to liquid-air interfaces of air-bubbles or high shear water flow during the dolphin jumping and thus, biofoulers are successfully removed from the skin surface.