

Kalorische und strukturelle Umwandlungen von Lipid-Membranen: Kopplung von Wärmekapazität und Volumenexpansionskoeffizienten

Diplomarbeit

vorgelegt von
Holger Ebel

aus Berlin

angefertigt an der
Fakultät für Physik
der
Georg-August-Universität zu Göttingen

1999

Die vorliegende Diplomarbeit wurde von August 1998 bis August 1999 am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen angefertigt. Mein Dank gilt zuallererst Dr. habil. Thomas Heimburg, in dessen Arbeitsgruppe „Thermodynamik von Membranen“ ich mein Diplomprojekt verfolgen konnte. Ich danke ihm für die gute Betreuung meiner Arbeit sowie für die vielen fruchtbaren Diskussionen und Anregungen während dieser Zeit. Bei Professor Reiner Kree vom Institut für theoretische Physik der Universität Göttingen bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats dieser externen Arbeit.

Dr. Derek Marsh gewährte mir dankenswerterweise die Möglichkeit, in seinem Labor ESR-Messungen mit Spin-Labeln durchzuführen. Seiner Mitarbeiterin Brititta Angerstein danke ich herzlich für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Sehr gefreut habe ich mich über die Gastfreundschaft der Professoren Howard L. Brockman und Rhoderick E. Brown, in deren Gruppen ich am *Hormel Institute* der *University of Minnesota* Monofilm-Messungen durchführen konnte. Ich empfinde ihnen und ihren Mitarbeitern gegenüber große Dankbarkeit für die überaus freundliche Aufnahme und die engagierte Unterstützung bei meinen Messungen.

Des weiteren danke ich Matthias F. Schneider für die Mithilfe bei den Viskositätsmessungen und Professor Hansjörg Eibl, der bereitwillig sein Lichtstreugerät zur Verfügung stellte. Nicht zu vergessen sind schließlich die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Elektronik- und der Feinmechanikwerkstätten sowie der weiteren Service-Einrichtungen des Max-Planck-Instituts, die stets schnell und kompetent die Arbeit an diesem Diplomprojekt unterstützt haben.

Nicht zuletzt bin ich der Studienstiftung des deutschen Volkes für die materielle und ideelle Förderung während meines Studiums sowie für die Gewährung eines Reisestipendiums für den Aufenthalt am *Hormel Institute* und die Vorstellung meiner Arbeit auf dem Jahrestreffen der *Biophysical Society* sehr dankbar.

Göttingen, im Juli 1999

H. E.

Zusammenfassung

Für das Verständnis biologischer Membranen haben sich biophysikalische Untersuchungen an Modellsystemen als hilfreich erwiesen. Gegenstand dieser Arbeit sind Vor- und Hauptumwandlung verschiedener Lipid-Membranen. ESR-Spektroskopie mit Spin-Labeln ergab, daß auch in der Vorumwandlung Ketten-schmelzen stattfindet. Mit Densitometrie und Kalorimetrie wurde für die Hauptumwandlung unilamellarer Vesikel die Proportionalität von Volumenexpansionskoeffizienten und Wärmekapazität nachgewiesen.

$$\partial V / \partial T = \gamma_{\text{vol}} \Delta C_p$$

Bei der Vorumwandlung zeigte sich ein ähnliches Verhalten. Davon ausgehend führen theoretische Überlegungen zu einem einfachen Zusammenhang von Wärmekapazität und Elastizität im Bereich der Phasenübergänge (Heimburg, 1998). Die eingeflossene Annahme einer analogen Proportionalität von Umwandlungsfläche und -Enthalpie unterstützen Messungen von Oberflächendruck-Fläche-Isothermen an Monoschichten. Es wird vorausgesagt, daß sich die Umwandlungstemperaturen in erster Näherung proportional zum hydrostatischen Druck verschieben, während die Form der Wärmekapazitätsprofile erhalten bleibt. Dies wurde für Drücke bis 200 bar bestätigt. Sowohl für Vor- als auch Hauptumwandlung erhält man mit Densitometrie und Druckkalorimetrie für verschiedene uni- und multilamellare Lipid-Systeme übereinstimmende Proportionalitätskonstanten γ_{vol} . Viskositätsmessungen an Lipid-Dispersionen werden mit einem Modell von Heimburg zur Kopplung von strukturellen Umwandlungen der Membranen mit Ordnungsübergängen der Lipid-Ketten erklärt. Danach nimmt im Phasenübergang mit der Wärmekapazität auch die Elastizität ein Maximum an und Formumwandlungen werden wahrscheinlich. Lassen die Lösungsmittel-Wechselwirkungen diese zu, führen sie zur Aufspaltung des Wärmekapazitätsmaximums.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen eine neue Sichtweise auf Phasenübergänge in Lipid-Membranen, die mit einfachen Überlegungen zu weiteren Vor-aussagen führt, z. B. für die Schallgeschwindigkeit von Vesikel-Dispersionen (Halstenberg et al., 1998; Heimburg, 1998).

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Biomembranen und Modellmembranen	1
1.2 Anwendungen	5
1.3 Kalorische und strukturelle Umwandlungen in Membranen und Monoschichten	7
2 Experimentelle Aufbauten und Meßmethodik	13
2.1 Densitometrie mittels Oszillatortechnik	13
2.1.1 Meßprinzip und Funktionsweise	13
2.1.2 Experimenteller Aufbau und Kalibrierung	16
2.2 Differentialkalorimetrie	22
2.3 Kalorimetrie mit Hochdruckzelle	24
2.4 Viskosimetrie	26
2.5 Monofilm-Messungen	30
2.6 Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie	33
2.7 Präparation der Proben	39
3 Theorie	45
3.1 Proportionalität von Umwandlungsenthalpie und -volumen	45
3.2 Folgerungen für die Druckabhängigkeit der Wärmekapazität	49
3.3 Kopplung von kalorischen und strukturellen Umwandlungen	51
4 Ergebnisse	57
4.1 Spezifisches Volumen, Wärmekapazität und Viskosität unilamellarer Systeme	57
4.2 Wärmekapazitätsprofile bei verschiedenen Drücken	66
4.3 Oberflächendruck-Fläche-Isothermen der Monofilme	75
4.4 ESR-Spektroskopie mit Spin-Labeln	78
5 Diskussion	85
5.1 Kettenschmelzen in Vor- und Hauptumwandlung	85
5.2 Nachweis der Proportionalität von Umwandlungsenthalpie und -volumen	87

5.3	Druckabhängigkeit der Wärmekapazitätsprofile	89
5.4	Bedeutung der Monofilm-Isothermen für Membraneigenschaften .	95
5.5	Kopplung von Ordnungs- und Strukturumwandlungen	100
6	Schlußbetrachtung und Ausblick	107
	Literaturverzeichnis	111

1 Einleitung

1.1 Biomembranen und Modellmembranen

Leben in all seinen vielfältigen Formen beruht auf einer gemeinsamen Eigenschaft aller Organismen: der Bildung von kleinen abgeschlossenen Reaktionsräumen, so genannten Kompartimenten. Das bekannteste dieser Kompartimente ist die Zelle, wo, abgeschirmt von der Außenwelt durch die Zellmembran, die verschiedensten physiologischen Prozesse ablaufen. Aber auch innerhalb dieses elementaren Bausteins finden sich eine Vielzahl von weiteren Kompartimenten: z. B. Mitochondrien, Zellkern, Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum und verschiedene Vesikel. All diese Kompartimentierungen sind notwendig, um den Austausch von Signalen und Stoffen mit der Umgebung zu regulieren und so definierte Bedingungen für die empfindlichen biologischen Reaktionspfade zu schaffen.

Die hierfür benötigte Barriere wird von Membranen gebildet, deren wesentliche Bestandteile Phospholipide und Proteine sind.

Zwei typische Phospholipide sind in Abbildung 1.1 dargestellt. Charakteristisch für alle Lipide ist der Aufbau aus einem hydrophoben und einem hydrophilen Teil. Ein Molekül mit dieser Eigenschaft bezeichnet man auch als amphiphil. In Wasser können diese Lipide je nach genauer Molekülstruktur verschiedene Aggregate oder Phasen bilden. Oft trifft man geschlossene Membranstücke an, sogenannte Vesikel. Bei den Membranen handelt es sich um Doppelschichten aus Phospholipiden, bei denen die hydrophoben Gruppen einander zugewandt sind, während die polaren Kopfgruppen mit dem Wasser wechselwirken.

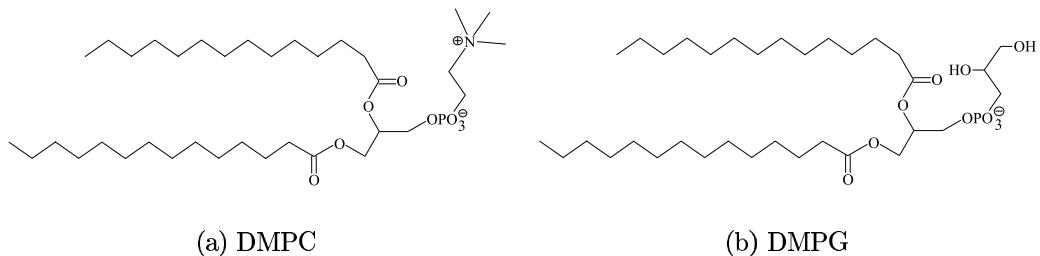


Abbildung 1.1: Strukturformeln der Lipide DMPC (a) und DMPG (b). Allen Phospholipiden gemein ist der amphiphile Charakter: Die beiden Fettsäurereste des jeweiligen Moleküls sind hydrophob, während der übrige Teil, die Kopfgruppe, polar und damit hydrophil ist. (DMPC: Dimyristoylphosphatidylcholin, DMPG: Dimyristoylphosphatidylglycerol)

Das heutige Bild einer biologischen Membran wird im wesentlichen vom *fluid mosaic model* von Singer und Nicolson (1972) bestimmt. Die Phospholipide bilden darin eine zweidimensionale Flüssigkeit, in der periphere und integrale Proteine eingebettet sind (Abb. 1.2).

Im *fluid mosaic model* dienen die Lipide nur zur Bildung einer Permeabilitätsbarriere und als Medium, das den Proteinen Halt und ausreichende Mobilität verschafft. Nur für wenige Lipide werden spezifische Wechselwirkungen mit Proteinen angenommen.

In letzter Zeit mehren sich Hinweise und Vorschläge, die auf eine Erweiterung des Modells von Singer und Nicolson abzielen. Schon länger bekannt ist, daß Biomembranen aus einer Vielzahl von verschiedenen Lipid-Sorten aufgebaut sind, die überdies noch unsymmetrisch auf die beiden Hälften der Doppelschicht verteilt sind. Läßt man Bakterien oder Hefen bei verschiedenen Temperaturen wachsen, so passen sie die Zusammensetzung ihrer Membranen den geänderten Umweltbedingungen an, so daß die Fluidität der Membranen konstant gehalten wird (Alberts et al., 1994, S. 477ff.). Selbst bei höheren Lebewesen, wie z. B. Fischen, konnte eine entsprechende Anpassung von Membranen im Gehirn an geänderte Temperaturen bzw. hohe hydrostatische Drücke beobachtet werden (Cossins und Macdonald, 1989). Allerdings geschieht hier die Anpassung nicht

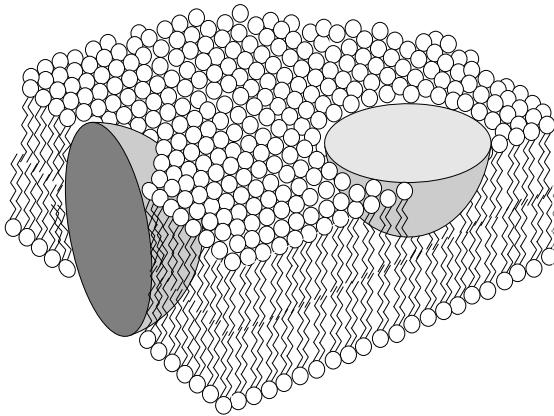


Abbildung 1.2: Bild einer Biomembran nach dem *fluid mosaic model* (nach Singer und Nicolson, 1972). In der von den Lipiden gebildeten zweidimensionalen Flüssigkeit sind die Proteine eingebettet. Diese können durch die Membran hindurchreichen (integrale oder Transmembran-Proteine) oder sich nur an bzw. teilweise in der Oberfläche befinden (periphere Proteine).

für alle Organe in gleicher Weise, was auf eine Art „Kosten-Nutzen-Analyse“ der Fische hindeutet. Die genaue Struktur der Lipid-Membran scheint also für die zugehörigen Lebewesen eine wichtige Rolle zu spielen.

Weiterhin diffundieren nicht alle Proteine frei in der Membran, manche bewegen sich auf bestimmten Pfaden und bei wieder anderen findet sogar gerichteter Transport statt. Dies deutet auf eine funktional relevante Heterogenität von Biomembranen hin (Jacobson et al., 1995).

Ein zusätzlicher Aspekt ist die Architektur von Membranen, also ihre äußere Erscheinung. Diese hängt von einer ganzen Anzahl von Eigenschaften der Membran und ihrer Umgebung ab. Kinnunen (1991) zählt unter anderem auf: Membranpotential, Ca^{2+} -Konzentration, pH-Wert, Lipid-Zusammensetzung, Zelle-Zelle-Kopplungen, Zytoskelett und extrazelluläre Matrix.

Selbst wenn man das Bild einer Biomembran nur auf die Rollen von Lipiden und Proteinen reduziert, ergibt sich ein komplexeres Bild als es das *fluid mosaic model* widerspiegelt. So sind für eine Reihe von Proteinen funktional wichtige Wechselwirkungen mit ihrer Umgebung in der Lipid-Membran beschrie-

ben worden, z. B. für Phospholipase A₂, Protein Kinase C, den Acetylcholin-Rezeptorkanal und Gramicidin A (für eine kurze Übersicht siehe Mouritsen und Jørgensen, 1998).

Gegenwärtig wird vor allem die Rolle der Heterogenität von Biomembranen diskutiert. Mikrodomänen aus Sphingolipiden und Cholesterol scheinen hier eine Rolle für das Anlagern von Proteinen und die Signaltransduktion zu spielen (Simons und Ikonen, 1997). Auch Transportvorgänge mit Hilfe von Vesikeln sollen von diesen *rafts* genannten Domänen beeinflußt werden (Verkade und Simons, 1997).

Die experimentellen Befunde der letzten Jahre geben die Richtung zu einer Modifizierung des *fluid mosaic models* vor, die die detailliertere Struktur von Biomembranen mit ihren Heterogenitäten berücksichtigen muß. Der physikalischen Erforschung von Membranen kommt dabei eine wichtige Rolle zu, da mit der Betrachtung der Lipide einer Membran als Ensemble der statistischen Physik neue Eigenschaften dem Verständnis zugänglich werden. Allein schon wegen des Vielteilchen-Charakters einer Membran aus vielen verschiedenen Lipiden folgt eine laterale Heterogenität dieser Lipid-Doppelschicht, wie sie für ein weitergehendes Modell als wichtig angesehen wird (Mouritsen und Jørgensen, 1998). Auch die Wechselwirkung von Lipiden und Proteinen scheint weniger nach dem Schema chemischer Reaktionen abzulaufen, als vielmehr auf der Veränderung physikalischer Randbedingungen im Umfeld der Proteine, wie z. B. dem lateralen Druck (Cantor, 1997) zu beruhen. Ebenso sind bei den *rafts* und der Ausbildung dieser Mikrodomänen physikalische Eigenschaften nicht ohne Bedeutung (Brown, 1998).

Für biophysikalische Untersuchungen von Lipid-Membranen wählt man meist Modellsysteme aus, die nur aus wenigen verschiedenen Lipiden und Proteinen bestehen. In dieser Arbeit werden nur Modellmembranen behandelt, die aus ein oder zwei verschiedenen Lipid-Sorten aufgebaut sind. Auch wenn solche Modellsysteme gegenüber einer Biomembran in starker Weise vereinfacht sind, lassen sie doch Schlüsse auf die Eigenschaften von in der Natur vorkommenden Membranen zu.

nen zu. Biomembranen, bei denen allein die Anzahl der verschiedenen Lipide in die Dutzende geht, sind für physikalische Betrachtungen einfach zu komplex, als daß sich an ihnen direkt und reproduzierbar prinzipielle Eigenschaften wie zum Beispiel Phasenumwandlungen untersuchen ließen.

Diese Arbeit versucht, einen Beitrag zum Verständnis der Lipid-Membranen im Bereich von Phasenübergängen zu leisten. Es ist bekannt, daß bei Temperaturen nahe eines Übergangs, die oft im Bereich physiologischer Temperaturen liegen, in der Membran Domänen verschiedener Lipid-Phasen auftreten. Die Wechselwirkung von Lipiden und Proteinen hängt vom Zustand der Lipide ab, und die Proteine beeinflussen umgekehrt die Übergänge der sie umgebenden Lipide (Heimburg und Marsh, 1996). Darüberhinaus können sich die (lokalen) mechanischen Eigenschaften von Membranen bei Phasenumwandlungen erheblich ändern. Die Kenntnis thermodynamischer Größen und ihrer Zusammenhänge bei diesen Übergängen ist deshalb ein Schritt hin zu einer besseren Beschreibung biologischer Membranen.

1.2 Anwendungen

Die Erforschung von Modellmembranen hat inzwischen für zahlreiche Anwendungen Bedeutung erlangt. Von diesen sollen einige hier kurz aufgezählt werden, bei denen biophysikalische Eigenschaften eine Rolle spielen. Damit soll verdeutlicht werden, daß selbst Messungen an scheinbar einfachen Systemen sich schnell als relevant für praktische Probleme erweisen können.

Vesikel werden im pharmakologischen Kontext auch als Liposome bezeichnet. Sie werden dort zum gezielten Transport von verschiedenen Stoffen in Organismen eingesetzt. Zum Beispiel können sie Medikamente transportieren (Eibl und Kaufmann-Kolle, 1995) oder Kontrastmittel für bildgebende Verfahren (Göni et al., 1986). In der Gentechnologie dienen sie entsprechend dem Transport von Erbsubstanz (Göni et al., 1986). Für alle diese Verwendungen ist die Stabilität der

Liposome entscheidend und ihre Fähigkeit, unter bestimmten Bedingungen die in ihnen enthaltenen Substanzen wieder freizugeben. Zum Beispiel treten bei Temperaturen nahe der „Hauptumwandlung“ der Membran – einem Ordungsübergang, der im nächsten Abschnitt beschrieben wird – vermehrt Liniendefekte auf, die zusammen mit den Grenzlinien zwischen den Phasen für eine höhere Permeabilität sorgen (Mouritsen und Jørgensen, 1998). Kennt man nun die Zusammenhänge, die zu einer Veränderung der Übergangstemperatur führen, so kann man entsprechend Lipide synthetisieren bzw. spezielle Lipid-Mischungen verwenden, um Liposome mit einer bestimmten Umwandlungstemperatur herzustellen. Liegt diese beispielsweise etwas über der Körpertemperatur, so kann durch Erwärmung von einzelnen Organen die lokal begrenzte Ausschüttung eines Wirkstoffs ausgelöst werden. Eine Übersicht zur Bedeutung der Membranstruktur für die Arzneimittelforschung findet sich bei Mouritsen und Jørgensen (1998).

Lipide können auch selbst als Medikamente eingesetzt werden, z. B. als Anti-Tumor-Wirkstoffe (Eibl und Kaufmann-Kolle, 1995). Wie sie wirken, ist allerdings noch unklar, wobei es erste Anzeichen gibt, daß sich die entsprechenden Lipide in die Zellmembran von Tumorzellen einbauen und dadurch zum Absterben dieser Zellen führen könnten (Saran et al., 1996).

Für den Wirkmechanismus von generellen Anästhetika wie Chloroform vermutet man einen Einfluß auf die Eigenschaften der Lipid-Membran und damit indirekt auf die an der Reizweiterleitung beteiligten Proteine. Röntgen- und Neutronenstreuung konnten zwar keine Beeinflussung der Membranstruktur durch generelle Anästhetika nachweisen (Franks und Lieb, 1978), jedoch zeigten Wärmekapazitätsprofile von Modellmembranen eine Verringerung der Kooperativität durch diese Klasse von Betäubungsmitteln. Interessant ist dabei, daß eine Erhöhung des hydrostatischen Drucks um etwa 100 bar den Effekt der Anästhetika kompensieren konnte (Mountcastle et al., 1978).

Weitere Anwendungen von Phospholipiden, z. B. als Polymere, Biomaterialien oder sogar im Bereich der molekularen Elektronik, sind bei Gōni et al. (1986)

beschrieben.

1.3 Kalorische und strukturelle Umwandlungen in Membranen und Monoschichten

Kalorische Umwandlungen in Membranen

Sowohl Bio- als auch Modellmembranen zeigen in ihren Wärmekazitätskurven Maxima, die von Phasenübergängen mit latenten Wärmen verursacht werden (Mabrey und Sturtevant, 1978). Diese Übergänge finden oft nahe bei Temperaturen statt, bei denen auch physiologische Vorgänge ablaufen. Betrachtet man die molekulare Struktur von Phospholipiden näher (vgl. Abb. 1.1), so fällt bei den Kohlenwasserstoff-Ketten auf, daß diese um jede ihrer C–C-Bindungen drehbar sind. Dabei gibt es abhängig vom Drehwinkel drei Energieminima, wovon zwei bei gleicher Energie liegen. Hat der Winkel den zum absoluten Energieminimum gehörigen Wert, spricht man von einer *Trans*-Konformation. Die beiden anderen Einstellmöglichkeiten heißen *Gauche*[–]- bzw. *Gauche*⁺-Konformation. Sind alle Drehwinkel der C–C-Bindungen im absoluten Energieminimum, so befindet sich die Kette im gezickzackten, sogenannten *All-trans*-Zustand (vgl. Abb. 1.1). Allerdings gibt es nur einen solchen Zustand niedrigster Energie, der darum als geordneter Zustand bezeichnet wird. Bei leicht erhöhter Energie können einige Bindungen auch einen der beiden anderen Winkel einnehmen, so daß die Anzahl der möglichen Konformere mit der Energie schnell ansteigt.

Bei Temperaturerhöhung wird der Grundzustand der *All-trans*-Konfiguration immer mehr gestört, bis schließlich nahezu beliebige Kombinationen der drei Rotationswinkel gleichberechtigt auftreten. Dieser Übergang von geordneten zu ungeordneten Ketten ist mit einer großen latenten Wärme verbunden und wird auch anschaulich als „Kettenschmelzen“ bezeichnet. Wegen der verbundenen starken Enthalpie-Erhöhung wird dieser Übergang hier als „kalorischer“ Übergang bezeichnet, im Gegensatz zu „strukturellen“ Umwandlungen, bei denen sich die

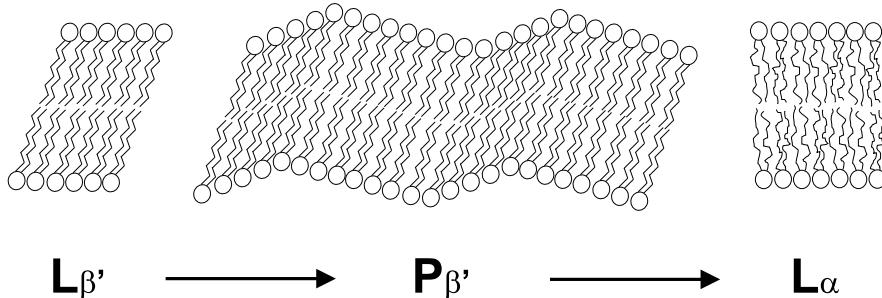


Abbildung 1.3: Molekularer Aufbau von $L_{\beta'}$ -, $P_{\beta'}$ - und L_{α} -Phase. Bei niedrigen Temperaturen liegt die Lipid-Doppelschicht in der $L_{\beta'}$ -Phase vor. Die Ketten sind geordnet und leicht geneigt gegenüber der Membrannormalen. Erhöht man die Temperatur, geht die Membran in die $P_{\beta'}$ -Phase über, in der die Membranoberfläche eine gerippte Struktur aufweist (Vorwandumwandlung). Bei noch höheren Temperaturen ist die Membran schließlich in der L_{α} -Phase wieder planar, und die Ketten liegen in vielen gleichberechtigten Konformationen vor (Hauptumwandlung).

Form der Membranen bei nur geringen Einflüssen auf die latente Wärme ändert.

Bis jetzt wurde nur ein Lipid-Molekül bzw. ein Ensemble nicht-wechselwirkender Lipide betrachtet. Dieses hat einen breiten, kontinuierlichen Übergang. Bei Lipid-Membranen beobachtet man hingegen überaus scharfe Umwandlungsmaxima. Das liegt daran, daß die Lipide nicht unabhängig voneinander schmelzen, sondern dies kooperativ tun. Im Grenzfall unendlich kooperativen Verhaltens (eines unendlich großen Systems) bedeutet dies, daß entweder alle Lipide im geordneten oder alle im ungeordneten Zustand sind. Dann erhält man ein unendlich scharfes Umwandlungsmaximum, da sich bei einer Temperatur alle Lipide gleichzeitig umwandeln.

Das Phasenverhalten der in dieser Arbeit untersuchten Lipid-Membranen ist in Abbildung 1.3 schematisch veranschaulicht. Dabei wird der allgemein akzeptierten Darstellung gefolgt, wie sie z. B. bei Sackmann (1995b) zu finden ist. Die Lipid-Membranen zeigen zwei Maxima der Wärmekapazität, welche den beiden Übergängen aus Abbildung 1.3 entsprechen. Diese Übergänge bezeichnet man als Vorwandumwandlung ($L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$) und Hauptumwandlung ($P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$).

Bei nicht zu niedriger Temperatur kurz vor der Vorumwandlung liegen die aliphatischen Ketten der Lipid-Moleküle im geordneten *All-trans*-Zustand vor. Die Lipide selbst sind dabei leicht gegen die Membrannormale geneigt. Diese Phase wird als $L_{\beta'}$ -Phase bezeichnet. Mit der Vorumwandlung bildet sich die sogenannte *Ripple*-Phase aus, die sich von der $L_{\beta'}$ -Phase durch eine unsymmetrisch gerippte Oberfläche unterscheidet (vgl. Abb. 1.3). Die *ripples* haben eine Periode von 10...15 nm und eine Amplitude von etwa 2 nm, während die Membrändicke unverändert bei 4...5 nm bleibt (Rappolt und Rapp, 1996; Woodward und Zasadzinski, 1996). Wird die Temperatur weiter erhöht, schmelzen schließlich die Ketten vollständig und die L_{α} -Phase wird angenommen, in der die Lipide mit parallel zur Membrannormalen stehenden, ungeordneten Fettsäureresten eine planare Membran bilden.

Die Tieftemperatur-Phasen $L_{\beta'}$ und $P_{\beta'}$, in denen die Kohlenwasserstoff-Ketten der Lipide geordnet vorliegen, werden oft auch „Gel“-Phasen genannt. Die Hochtemperatur-Phase L_{α} wird demgegenüber dann als „fluid“ oder „flüssig-kristallin“ bezeichnet.

Vor- und Hauptumwandlung unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Kinetik. Während die Vorumwandlung mit einer charakteristischen Zeit von (5±2) min sehr langsam ist (Lentz et al., 1978), findet die Hauptumwandlung mit Relaxationszeiten von 50 ms bis zu 4 s statt (Van Osdol et al., 1991).

Untersuchungen von Dichte und Wärmekapazität im Rahmen dieser Arbeit zeigen, daß Vor- und Hauptumwandlung nicht nur mit Enthalpieerhöhungen sondern auch mit Zunahmen des spezifischen Volumens der Lipide verbunden sind. Enthalpie und spezifisches Volumen sind sogar proportional zueinander, woraus im Theorie-Kapitel ein Zusammenhang von Wärmekapazität und Elastizität abgeleitet wird. Die Ordungsumwandlungen der Lipid-Ketten werden mit Hilfe sogenannter Spin-Label-ESR-Spektroskopie näher betrachtet, wobei festgestellt wird, daß auch beim $L_{\beta'}-P_{\beta'}$ -Übergang Ketten schmelzen.

Phasenübergänge bei Lipid-Monoschichten

Amphiphile Moleküle wie Lipide können aber nicht nur Doppelschichten in Wasser bilden, sondern auch Monofilme, z. B. an Luft/Wasser-Grenzflächen. Experimente mit diesen Monoschichten gewähren oft einen leichteren Zugang zu Eigenschaften der eigentlichen Membran, die ja aus zwei Monoschichten aufgebaut ist. Dies gilt insbesondere für Messungen von Protein-Lipid-Wechselwirkungen oder die Bestimmung von lateralen Drücken und molekularen Flächen (MacDonald, 1996). In dieser Arbeit interessiert vor allem die Anhängigkeit des Umwandlungsdrucks Π_{EC} (s. u.) von der Temperatur, aus der Rückschlüsse auf das Verhalten der zugehörigen Doppelschichten gezogen werden können. Die knifflige Frage, wann denn eine Monoschicht der Hälfte einer Doppelschicht entspricht, wird in Abschnitt 5.4 diskutiert.

Der typische Verlauf einer Oberflächendruck-Fläche-Isotherme ist in Abbildung 1.4 eingezeichnet. Als Oberflächendruck bezeichnet man hierbei das Verhältnis von der Kraft, die ein Monofilm auf seine Begrenzung ausübt und der Länge der Begrenzungslinie. Näheres dazu ist in Abschnitt 2.5 ausgeführt. Bei hohen Flächen und niedrigem lateralem Druck existiert zuerst noch gar kein Film, sondern die Lipid-Moleküle befinden sich entfernt voneinander in verschiedenen Clustern. Bei Verkleinerung der Fläche bildet sich ein geschlossener monomolekularer Film und der Oberflächendruck beginnt zu steigen. Der Film befindet sich als erstes in der flüssig-expandierten Phase (LE: *liquid expanded*), in der die Kohlenstoffketten der Lipide noch nicht vollständig senkrecht zur Wasser/Luft-Grenzfläche stehen. Mit weiter kleiner werdender Fläche wird schließlich ein Punkt (A_{EC}, Π_{EC}) erreicht, an dem der Übergang zur geordneten flüssig-kondensierten Phase beginnt (LC: *liquid condensed*), in der alle Lipid-Ketten senkrecht zur Oberfläche ausgerichtet sind. Bei noch höheren Drücken folgt die „feste“ Phase (S: *solid*), die sich von der LC-Phase durch eine längerreichweite Positionsordnung der Lipide unterscheidet, bis der Film schließlich bei zu hohem lateralem

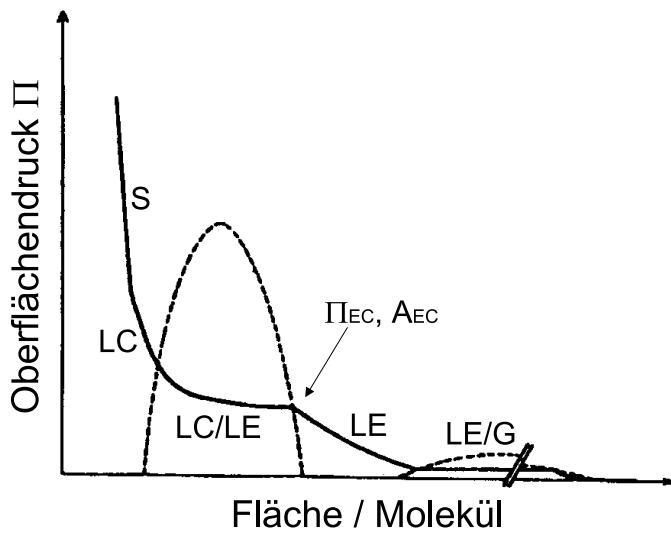


Abbildung 1.4: Typische Isotherme eines Monolayers (nach Möhwald, 1995). Beginnt man bei niedrigem Oberflächendruck und großer molekularer Fläche, so liegt noch gar kein geschlossener Monofilm vor. Dieser Zustand wird als gasartig bezeichnetet (G). Verkleinert man die Oberfläche, bildet sich ein geschlossener Film aus (LE für *liquid expanded*). Bei einem Druck Π_{EC} und einer Fläche A_{EC} beginnt das Koexistenzgebiet von expandierter und kondensierter flüssiger Phase (LC für *liquid condensed*), bis sich schließlich der ganze Film in der LC-Phase befindet. Verringert man die molekulare Fläche noch weiter, nimmt die Monoschicht die *Solid*-Phase ein, bis der Film schließlich kollabiert (nicht eingezeichnet).

Druck kollabiert. Das heißt, der Oberflächendruck bleibt konstant und die Monoschicht wird nicht länger komprimiert. Wahrscheinlich faltet sie sich stattdessen in die Flüssigkeit und bildet dort Doppelschichten (MacDonald, 1996).

Im Koexistenzbereich von flüssig-expandierter und flüssig-kondensierter Phase können vielfältige Domänenmuster beobachtet werden, deren Gestalt u. a. stark von der Kompressionsgeschwindigkeit abhängt. Bei schneller Verkleinerung der Fläche werden z. B. dendritische Strukturen gefunden, während bei langsameren Messungen Muster von kreisförmigen oder gekrümmten Domänen auftreten (Möhwald, 1995; Möhwald et al., 1995).

Strukturelle Umwandlungen von Lipid-Membranen

In Abgrenzung zu den weiter oben beschriebenen kalorischen Umwandlungen von Membranen, die vor allem Ordnungsumwandlungen der Lipid-Ketten sind, stehen strukturelle Umwandlungen für Veränderungen der Gestalt der Membranaggregate. Solche morphologischen Umwandlungen können Änderungen der Vesikelform ebenso umfassen wie den Übergang von Lipid-Vesikeln zu anderen Lipid-Phasen oder die Abknospung kleiner Vesikeln von größeren.

Für biologische Membranen sind Formänderungen vielfach beobachtet worden, z. B. für Erythrozyten bei verschiedenen Umgebungsbedingungen oder Krankheiten (Sackmann, 1995a). Von Gruner (1985) ist vorgeschlagen worden, daß Organismen die intrinsische Krümmung ihrer Membran anpassen, indem sie Lipide selektiv einbauen, die alleine Doppelschichten oder andere Phasen ausbilden (*bilayer lipids* und *nonbilayer lipids*).

Auch bei Modellmembranen finden sich Änderungen der Vesikelform, die sich in Phasendiagrammen zusammenfassen lassen (Seifert und Lipowsky, 1995; Lipowsky, 1996). Dabei genügt zum Teil schon eine Änderung der Temperatur, um einen strukturellen Übergang zu induzieren. Diese Phasendiagramme sind im wesentlichen Funktionen der elastischen Konstanten der Membranen.

In dieser Arbeit wird im folgenden nach experimentellen Belegen für einen Zusammenhang von elastischen Konstanten und Wärmekapazität, also für eine Kopplung von strukturellen und kalorischen Übergängen gesucht.

2 Experimentelle Aufbauten und Meßmethodik

2.1 Densitometrie mittels Oszillatortechnik

2.1.1 Meßprinzip und Funktionsweise

Um die Dichte von Dispersionen aus Lipid-Vesikeln in Abhängigkeit von der Temperatur zu bestimmen, waren an ein Meßverfahren folgende Anforderungen zu stellen:

- hohe Auflösung im Bereich von 10^{-6} g/ml, um Dichteänderungen bei Phasenumwandlungen zu erfassen;
- geringe Beeinflussung durch Viskosität und Oberflächenspannung;
- erforderliche Probenmenge möglichst in der Größenordnung von 1 ml;
- Automatisierbarkeit des Aufbaus für Messungen über Temperaturbereiche bis 50 K, d. h. kurze Meßzeit für die einzelnen Datenpunkte und einfache Temperierbarkeit.

Als Methode der Wahl erwies sich die Dichtemessung nach der Biegeschwinger-Methode (Kratky et al., 1969; Kratky et al., 1973; Picker et al., 1974), für die empfindliche Meßzellen kommerziell erhältlich sind.

Das wesentliche Element eines Biegeschwinger-Densitometers ist der U-förmige Oszillatator, der aus einer Glas- oder Stahlkapillare gefertigt ist (Abb. 2.1).

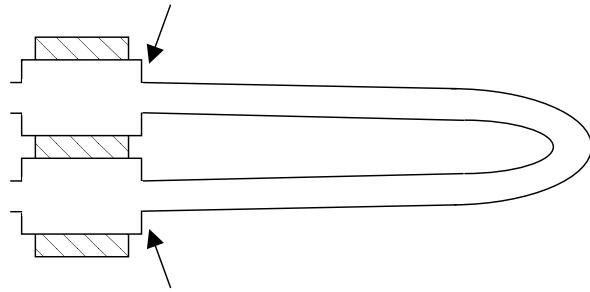


Abbildung 2.1: Die U-förmige Kapillare ist das Herzstück des Biegeschwinger-Densitometers (Seitenansicht). Aus der Änderung ihrer Eigenfrequenz im gefüllten Zustand kann die Dichte der Proben-Flüssigkeit bestimmt werden. Die Pfeile kennzeichnen die durch die Querschnittsänderung festgelegten Schwingungsknoten.

Dieser wird mit der Probenflüssigkeit gefüllt und aus der Änderung der Eigenfrequenz die Dichte bestimmt.

Für einen schmalen Frequenzbereich und nicht zu große Amplituden kann dieser Schwinger mit einem einfachen Masse-Feder-Modell beschrieben werden (Kratky et al., 1973). Es gilt

$$m = m_0 + \rho V \quad (2.1)$$

mit m : Gesamtmasse, m_0 : Masse des leeren Oszillators, ρ : Dichte der Probe und V : Probevolumen.

Unter den weiteren Annahmen, daß die Masse m eine ungedämpfte, harmonische Schwingung ausführt (Schwingungskonstante k) und die Masse homogen über den Schwinger verteilt ist, erhält man für die Resonanzfrequenz ν

$$2\pi\nu = \sqrt{\frac{k}{m}} = \sqrt{\frac{k}{m_0 + \rho V}} \quad (2.2)$$

Daraus erhält man eine Beziehung für die Dichte ρ der Probe:

$$\rho = A\tau^2 - B \quad (2.3)$$

wobei $\tau = \nu^{-1}$ die Schwingungsperiode ist und $A := k/(4\pi^2V)$ und $B := m_0/V$ Konstanten sind.

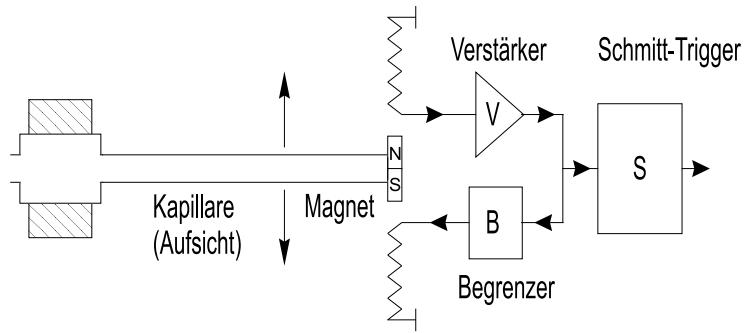


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau eines Densitometers in Aufsicht (vgl. Abb. 2.1). Die U-förmige Kapillare wird zu Schwingungen angeregt. Durch den Schaltkreis aus Verstärker und Begrenzer ist das System entdämpft und in seiner Amplitude begrenzt. Die Eigenschwingung der Kapillare wird über den Schmitt-Trigger in ein Rechtecksignal umgewandelt und dann zu einem Zähler geleitet (Kratky et al., 1973).

Betrachtet man nun die Dichtedifferenz zwischen zwei Proben, so erhält man

$$\rho_1 - \rho_2 = A(\tau_1^2 - \tau_2^2) \quad (2.4)$$

Zur Bestimmung der Konstanten A sind also zwei Referenzen notwendig, bei denen die Dichte in Abhängigkeit von der Temperatur hinreichend genau bekannt ist. Dann kann man die Dichtedifferenz einer Probe zu einer der Kalibrierungsstandards ermitteln.

Um eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, weist die Gestaltung des Biegeschwingers einige Besonderheiten auf (vgl. Abb. 2.1).

1. Die U-Form bestimmt eine eindeutige Schwingungsebene und reduziert so das Risiko elliptischer Schwingungen mit daraus folgender nicht-eindeutiger Resonanzfrequenz. Zudem ist das Befüllen und Reinigen so sehr einfach möglich.
2. Eine Querschnittsänderung der Kapillare bewirkt eine definierte Lage der Schwingungsknoten und legt damit das Meßvolumen fest (Pfeile in Abb. 2.1).

3. Das Material des Schwingers hat eine Elastizitätskonstante mit hoher Temperaturstabilität.

Zur Bestimmung der Eigenfrequenz wird der Oszillatator entdämpft und die Periodendauer gemessen. Dies geschieht durch den in Abbildung 2.2 dargestellten Schaltkreis. An der Spitze der Kapillare befindet sich ein kleiner Magnet, der bei Auslenkung eine Spannung in einer Spule induziert. Dieses Signal wird verstärkt, begrenzt und danach auf eine Anregungsspule gegeben, die dem Oszillatator die durch Dämpfung verlorene Energie wieder zuführt. Der Begrenzer sorgt dafür, daß die Amplitude nicht mehr als etwa 0,01 mm beträgt, um zu gewährleisten, daß die Verformung des Biegeschwingers im elastischen Bereich stattfindet. Besonders wichtig ist auch eine exakte Phasenbeziehung zwischen Abnahme- und Erregerspannung, da jeder Phasenfehler die Masse m_0 des Oszillators effektiv ändern und damit das Meßergebnis verfälschen würde. Schließlich wandelt ein Schmitt-Trigger das Anregungssignal in ein Rechtecksignal um, das zu einem Zähler geleitet werden kann.

Für eine Genauigkeit von 10^{-6} g/ml ist eine Temperierung des Oszillators auf 0,01 K genau erforderlich, die mit kommerziellen Ultrathermostaten erreichbar ist.

2.1.2 Experimenteller Aufbau und Kalibrierung

Bei der volumetrischen Vermessung von Lipid-Vesikeln in Abhängigkeit von der Temperatur ist es notwendig, über einen Temperaturbereich von zum Teil mehreren 10 K mit hoher Temperaturauflösung Daten aufzunehmen, um Details der Phasenumwandlungen verfolgen zu können. Es gibt verschiedene Ansätze zur Bewältigung dieser Aufgabe, z. B. eine kontinuierliche, sehr glatte Veränderung der Temperatur bei Verwendung eines Biegeschwinger-Densitometers (Anthony et al., 1981).

Für die vorliegende Arbeit wurde eine isotherme Meßmethode gewählt. Das

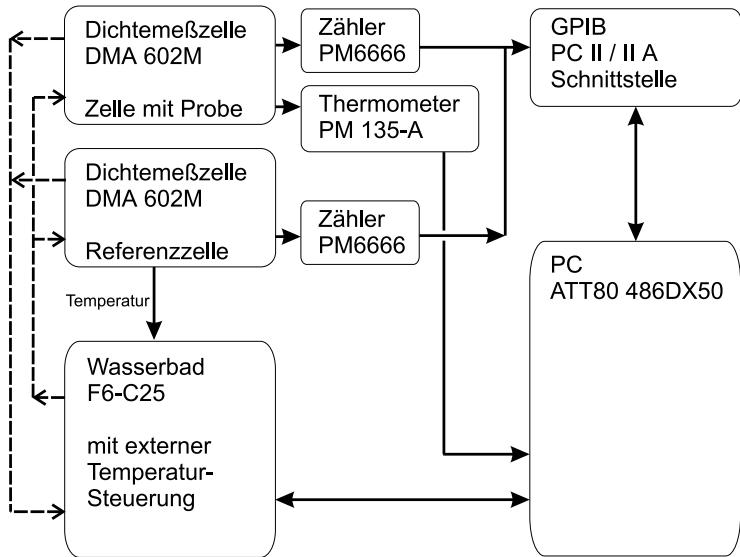


Abbildung 2.3: Skizze des verwendeten Aufbaus zur Dichtebestimmung. Durchgezogene Linien bedeuten Datenverbindungen, deren Richtung durch die Pfeile angegeben ist. Die gestrichelten Linien geben den Fluß der Temperierflüssigkeit wieder. Alle Daten (Schwingungsperioden und Temperaturen) werden im Computer (PC) verarbeitet, der auch die Steuerung des Wasserbades übernimmt.

heißt, daß die Temperatur punktweise eingestellt und nach einer angemessenen Equilibrierungszeit die Dichte bestimmt wurde. Realisiert werden konnte dies dadurch, daß einerseits moderne Ultrathermostate über eine hinreichend kleine Einstellzeit bis zu einer stabilen Temperatur verfügen und andererseits durch die Automatisierung der Messung keine Beschränkung der Meßzeit durch die Anwesenheit der Bediener gegeben war.

Die Aufbauskizze ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Kern des dargestellten Dichtemeßgeräts sind zwei baugleiche Dichtemeßzellen DMA 602M der Firma Anton Paar (Graz, Österreich), deren Aufbau im vorhergehenden Abschnitt beschrieben worden ist. Laut Hersteller ist mit diesen Zellen eine relative Genauigkeit von $1,5 \cdot 10^{-6}$ g/ml möglich. Eine der Zellen ist mit einer Referenzflüssigkeit (üblicherweise doppelt destilliertes Wasser) und die zweite mit einer Probe gefüllt. Beide Zellen werden von einem Wasserbad F6-C25 von Haake (Karlsruhe, Deutschland)

über thermisch gut isolierte Zu- und Ableitungsschläuche temperiert. Der verwendete Thermostat liefert auch über Zeiten im Bereich von 5...10 Minuten eine auf $\pm 0,01$ K genaue Temperatur und verfügt über eine sehr kurze, überschwingungsfreie und gegen Umwelteinflüsse stabile Einstellungsregelung. Die Temperaturregelung erfolgt extern, d. h. daß sich die Elektronik des Wasserbads an der Temperatur orientiert, die über ein Widerstandsthermometer (4-Leiter Pt100) in der Referenzzelle gemessen wird. Die Solltemperatur wird dem Wasserbad, das über eine serielle Schnittstelle verfügt, vom Computer vorgegeben.

Das Ausgangssignal der beiden Dichtemeßzellen wird an jeweils einen Zähler Phillips PM6666 (Eindhoven, Niederlande) weitergeleitet, der 10-Sekunden-Mittelwerte der Periode mit einer Genauigkeit von 10^{-7} ms mißt. Die Zähler sind mit einer GPIB-Schnittstelle (*General Purpose Interface Bus*) ausgestattet und senden ihre Meßwerte über eine GPIB-Karte GPIB-PCII/IIA der Firma National Instruments (Austin/TX, USA) an den Computer weiter.

Schließlich wird die Temperatur der Dichtemeßzelle, in der sich die Probe befindet, über ein Widerstandsthermometer (4-Leiter Pt100) von einem Meßgerät der Firma Waldsee Electronic (Bad Waldsee, Deutschland) ebenfalls als 10-Sekunden-Mittelwert gemessen und über eine serielle Schnittstelle an den Computer gemeldet.

Als Steuercomputer wurde ein PC unter dem Betriebssystem Microsoft Windows 95 (Redmond/WA, USA) verwendet. Das Steuerprogramm wiederum wurde mit LabView 4.0.1 von National Instruments (Austin/TX, USA) erstellt, einer graphischen, objektorientierten Programmiersprache, die insbesondere für die Steuerung von experimentellen Aufbauten entwickelt wurde. Dieses Steuerprogramm bietet eine graphische Bedienoberfläche und erfüllt folgende Aufgaben:

- Steuerung der Messung nach vom Benutzer vorgegebenen Parametern;
- Erfassung, Speicherung und teilweise Auswertung der Meßwerte;

- graphische Darstellung der Dichtedifferenz von Probe und Wasser gegen die Temperatur sowie der Temperaturen von Referenz- und Probenzelle gegen die Zeit;
- Erstellung von Kalibrierungsdateien.

Die Erfassung eines Datenpunktes geschieht durch das Programm wie folgt:

1. Die Solltemperatur wird an die Steuerung des Wasserbads übergeben.
2. Nachdem die Proben-Zelle die Solltemperatur $\pm 0,01$ K erreicht hat, wartet das Programm für eine vom Benutzer vorgegebene Equilibrierungszeit.
3. Danach werden nacheinander die Periode der Probenzelle, deren Temperatur und die Periode der Referenzzelle aufgezeichnet. Die Anzahl der Messungen gibt der Benutzer vor.
4. Schließlich wird eine neue Solltemperatur eingestellt, indem die Temperatur um einen Schritt verändert wird, der jeweils für ein Temperaturintervall vorgegeben wird.

Zur Sicherheit werden alle Daten so oft wie möglich erfaßt, also beispielsweise auch während der Equilibrierungszeit.

Wie im Abschnitt 2.1.1 angesprochen bzw. aus Gleichung (2.4) ersichtlich, kann man mit einem Biegeschwinger-Densitometer nur die Dichtedifferenz zu einer Referenzsubstanz messen. Darüberhinaus braucht man zur Kalibrierung eine zweite Referenz mit bekannter Dichte.

Für die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen wurde durchweg die Dichtedifferenz zu doppelt destilliertem Wasser bestimmt und als zweites Dichtenormal eine Natriumchlorid-Lösung benutzt. Die Dichte von Wasser in Abhängigkeit von der Temperatur ist als polynomiale Näherung sehr genau bekannt (Bettin und Spieweck, 1990). Gleches gilt für die Dichte einer NaCl-Lösung mit einer Konzentration von 5,550825 mol/(kg H₂O) (Rogers und Pitzer, 1982), wobei letztere

n	c_n	a_n
0	$9,99839564 \cdot 10^2 \text{ kg/m}^3$	$9,9983952 \cdot 10^2 \text{ kg/m}^3$
1	$6,7998613 \cdot 10^{-2} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1} \text{kg/m}^3$	$1,6952577 \cdot 10^1 \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1} \text{kg/m}^3$
2	$-9,1101468 \cdot 10^{-3} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-2} \text{kg/m}^3$	$-7,9905127 \cdot 10^{-3} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-2} \text{kg/m}^3$
3	$1,0058299 \cdot 10^{-4} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-3} \text{kg/m}^3$	$-4,6241757 \cdot 10^{-5} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-3} \text{kg/m}^3$
4	$-1,1275659 \cdot 10^{-6} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-4} \text{kg/m}^3$	$1,0584601 \cdot 10^{-7} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-4} \text{kg/m}^3$
5	$6,5985371 \cdot 10^{-9} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-5} \text{kg/m}^3$	$-2,8103006 \cdot 10^{-10} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-5} \text{kg/m}^3$
		$b = 1,6887236 \cdot 10^{-2} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$

Tabelle 2.1: Koeffizienten für die Näherungen der Dichte von Wasser (Bettin und Spieweck, 1990).

Daten erst auf die Internationale Temperaturskala von 1990 (ITS-90) umgerechnet werden müssen (Kohlrausch, 1996, S. 308).

Im einzelnen lauteten die Näherungen für Wasser

$$\rho = \sum_{n=0}^5 c_n \hat{T}^n \quad (2.5)$$

(0...40 °C) und

$$\rho = \frac{\sum_{n=0}^5 a_n \hat{T}^n}{1 + b \hat{T}} \quad (2.6)$$

(41...100 °C, \hat{T} : Temperatur in °C¹) mit den in Tabelle 2.1 angegebenen Koeffizienten.

Bei den Dichte-Daten für die NaCl-Lösung mußte zunächst die gemessene Temperatur auf die Internationale Praktische Temperaturskala von 1968 (IPTS-68) umgerechnet werden

$$\frac{\hat{T}_{90} - \hat{T}_{68}}{\text{°C}} = \sum_{n=1}^7 d_n \left(\frac{\hat{T}_{90}}{\hat{T}_N} \right)^n \quad (2.7)$$

mit den in Tabelle 2.2 angegebenen Koeffizienten.

¹Zur besseren Übersichtlichkeit sind Temperaturen in der Einheit °C mit einem „Hut“ markiert. Ansonsten wird die Einheit Kelvin (K) verwendet.

d_1	-0,13266	U_1	$1,0837195 \cdot 10^{+3}$
d_2	-0,52553	U_2	$-2,4749323 \cdot 10^{-1}$
d_3	2,10880	U_3	$1,2442861 \cdot 10^{-3}$
d_4	0,98156	m	1,3244058 g/ml
d_5	-10,15705		
d_6	11,71876		
d_7	-4,11971		
T_N in °C	631		

(a)

(b)

Tabelle 2.2: (a) Koeffizienten für die Umrechnung von der ITS-90 auf die ITPS-68 im Bereich von 0 °C bis 631 °C (Kohlrausch, 1996, S. 320). (b) Konstanten zur Bestimmung der Dichte der NaCl-Lösung (Rogers und Pitzer, 1982).

Die Dichte von einer NaCl-Lösung mit einer Konzentration von 5,550825 mol/(kg H₂O) war dann im Bereich von 0 °C bis 80 °C bei einem Druck von 1013,25 hPa gegeben durch

$$\rho = \frac{m}{U_1 + U_2 \frac{\hat{T}_{68}}{^{\circ}\text{C}} + U_3 \frac{\hat{T}_{68}^2}{^{\circ}\text{C}^2}} \quad (2.8)$$

wobei die nötigen Konstanten in Tabelle 2.2 aufgeführt sind.

Zur Kalibrierung wurden Lösungen von NaCl z. A. von Baker (Deventer, Holland) in bidestilliertem Wasser mit Konzentrationen von (5.5508±0.0013) mol/(kg H₂O) und (5.5508±0.0012) mol/(kg H₂O) angesetzt.

Bei der Kalibrierung wurde die Konstante A aus Gleichung (2.4) für die Probenzelle als Funktion der Periode $\tau_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{Referenzzelle}}$ der mit Wasser gefüllten Referenzzelle bestimmt und nicht als Funktion der Temperatur \hat{T} . Ebenso gingen die Literaturwerte für die Dichte von Wasser $\rho_{\text{H}_2\text{O}}$ und die vorher gemessene Schwingungsperiode der mit Wasser gefüllten Probenzelle $\tau_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{Probenzelle}}$ als Funktionen von $\tau_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{Referenzzelle}}$ in die Berechnung ein. Die Referenzzelle diente somit gewissermaßen

als Thermometer.

$$\rho_{\text{Probe}} - \rho_{\text{H}_2\text{O}}(\tau_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{Referenzzelle}}) = A(\tau_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{Referenzzelle}}) \left((\tau_{\text{Probe}}^{\text{Probenzelle}})^2 - (\tau_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{Probenzelle}}(\tau_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{Referenzzelle}}))^2 \right) \quad (2.9)$$

Dadurch konnte eine wesentlich höhere Genauigkeit erzielt werden als bei Verwendung nur einer Meßzelle. Zudem wurden so gleichphasige, schwingungsähnliche Veränderungen der Perioden beider Zellen über einen Zeitraum von mehreren Stunden ausgeglichen, deren Ursache nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte. Laut Herstellerangaben wird in einem neueren Modell der Dichtemeßzelle ein Referenzoszillator benutzt, um diese Variationen auszugleichen, die auf Umlagerungsprozessen im Glas der Biegeschwinger beruhen sollen.

Bedingt durch die Alterung der Meßzelle war eine Kalibrierung alle zwei Monate notwendig und ausreichend. Diese Alterung bewirkte im wesentlichen eine Verschiebung der Meßwerte um eine Konstante in der Größenordnung von 10^{-5} g/ml pro Tag. Da die Änderung der Dichte mit der Temperatur ausgewertet wurde, war diese Alterung ohne Belang. Eine gerätebedingte Hysterese bei an- und absteigenden Temperaturverläufen wurde darüberhinaus nicht beobachtet.

2.2 Differentialkalorimetrie

Für das Studium thermotroper Umwandlungen von Makromolekülen sind kalorimetrische Untersuchungen von großer Bedeutung, da die gemessene Wärmekapazitätskurve die komplette thermodynamische Charakterisierung der Übergänge ermöglicht. Sie liefert die Umwandlungsenthalpie ΔH , die Umwandlungsentropie ΔS und die Zustandsfunktion Z (Mabrey und Sturtevant, 1978; Freire und Biltonen, 1978; Freire, 1995).

Das Meßprinzip eines Differentialkalorimeters (DSC: *differential scanning calorimeter*) ist folgendes: In einem sogenannten adiabatischen Schild befinden sich zwei aus einem inerten Material gefertigte, möglichst baugleiche Zellen. In der

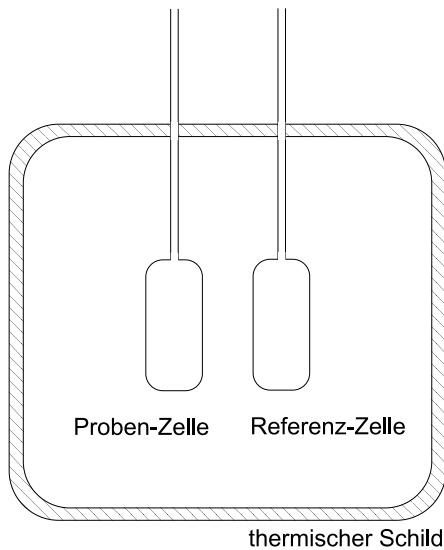


Abbildung 2.4: Meßprinzip beim verwendeten Differentialkalorimeter VP-DSC. Die beiden Zellen werden durch Kapillaren befüllt. Bei vorgegebener Temperaturänderungsrate wird aus der Leistungsdifferenz, die nötig ist, um beide Zellen auf gleicher Temperatur zu halten, die Wärmekapazität bestimmt.

einen ist die Probe, in der zweiten eine Referenzsubstanz. Nun wird die Temperatur in dem adiabatischen Schild kontinuierlich verändert (*scanning*). Eine elektronische Regelung sorgt gleichzeitig dafür, daß die Temperaturdifferenz zwischen den beiden Zellen möglichst klein ist, d. h. daß sich beide Zellen mit gleicher Rate erwärmen oder abkühlen. Im einfachen Fall der Temperaturerhöhung muß dazu eine Zelle stärker geheizt werden als die andere.² Diese Leistungsdifferenz ΔP wird aufgezeichnet, ebenso die Zeit t und die Temperatur \hat{T} . Daraus errechnen sich die für eine Temperaturerhöhung mehr benötigte Wärme ΔQ bzw. die

²Eine Wärmeentwicklung kann bei Temperaturerhöhung nur dann auftreten, wenn die thermotrope Reaktion gemessen an der Geschwindigkeit der Temperaturänderung kinetisch limitiert ist. Denn das thermodynamische Gleichgewicht verschiebt sich bei Temperaturerhöhung nur in die endotherme Richtung.

Wärmekapazitätsdifferenz zur Referenzsubstanz ΔC_p (bei konstantem Druck p):

$$\Delta Q = \int_t^{t+\Delta t} \Delta P(t') dt' \cong \Delta P \Delta t \quad (2.10)$$

$$\Delta C_p := \left(\frac{\partial Q}{\partial T} \right)_p \cong \frac{\Delta Q}{\Delta T} \quad (2.11)$$

Für die Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurde ein hochempfindliches Differentialkalorimeter VP-DSC der Firma MicroCal (Northhampton/MA, USA) verwendet, das nach dem oben beschriebenen Grundprinzip arbeitet. Die beiden Zellen bestehen aus Tantal und wurden für die Messungen auf einen Druck von etwa $(3,5 \pm 0,2)$ bar gebracht. Das Gerät zeichnet sich durch einen weiten Bereich möglicher Heiz- oder Kühlraten (0...60 K/h), geringes Rauschen der Meßwerte und eine hohe Stabilität der Nulllinie aus.

Bezüglich der letzten beiden Eigenschaften waren Messungen mit diesem Kalorimeter im Jahre 1997 etwa zehnfach besser als publizierte Rohdaten anderer Geräte (Plotnikov et al., 1997). Vor allem aufgrund dieser sensiblen und zugleich robusten Regelungstechnik war es möglich, eine Druckzelle für dieses Kalorimeter zu konstruieren, die im nächsten Abschnitt beschrieben wird.

2.3 Kalorimetrie mit Hochdruckzelle

Um die Druckabhängigkeit von Phasenumwandlungen bei Lipidmembranen messen zu können, wurde für das im vorigen Abschnitt beschriebene Differentialkalorimeter VP-DSC eine Druckzelle konstruiert. Diese ermöglichte die Ermittlung von Wärmekapazitätskurven bei Drücken bis zu 200 bar.

In Abbildung 2.5 ist der Aufbau der Druckzelle schematisch wiedergegeben. Die gesamte Zelle wird über das linke Ventil mit einer N_2 -Druckflasche auf einen Druck von bis zu 200 bar gebracht. Eine Feinregulierung des Innendrucks ist über das rechte Ventil möglich, das mit einer Dosierspindel ausgerüstet ist. Die für Drücke bis 2000 bar ausgelegten Ventile wurden von der Firma Nova Swiss (Effnetikon, Schweiz) bezogen, nachdem verschiedene Typen anderer Hersteller

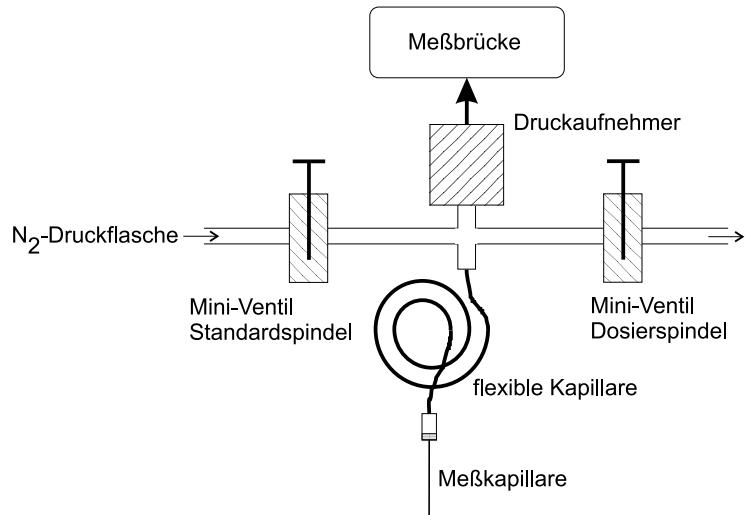


Abbildung 2.5: Die Druckzelle für das Differentialalkalorimeter VP-DSC. Mit Stickstoff aus einer Druckflasche wird der Innenraum der Druckzelle auf einen Druck von bis zu 200 bar gebracht. Die Probe befindet sich in der abschraubbaren Meßkapillare, die in die Probenzelle des Kalorimeters eingeführt wird (vgl. Abb. 2.4).

eine mangelhafte Dichtigkeit über Zeiträume von mehreren Tagen gezeigt hatten. Die Druckmessung findet durch einen Druckaufnehmer EBM 6045 von Nova Swiss statt, der mit vier druckabhängigen Widerständen Drücke von 0...500 bar mit einer Auflösung von 0,1 bar messen kann. Schließlich verbindet eine flexible Kapillare die Meßkapillare mit dem übrigen Aufbau.

Die Meßkapillare ist abschraubar und wird vor der Messung mit der Probe gefüllt. Danach wird die gesamte Zelle auf den gewünschten Druck gebracht und von der Gasflasche getrennt, damit die Meßkapillare in die Probenzelle des Kalorimeters eingeführt werden kann (vgl. Abb. 2.4). Die Probenzelle des VP-DSC kann nicht selbst unter Druck gesetzt werden, da ihre Wände aus meßtechnischen Gründen sehr dünn gehalten sind. Das Einführen der Meßkapillare wird durch die flexible Verbindungskapillare erleichtert, die auch die mechanische Beanspruchung der Probenzelle zu reduzieren hilft. In die Referenzzelle des Kalorimeters wird eine zweite Meßkapillare gesteckt, die mit der Referenzsubstanz gefüllt ist. Zur verbesserten thermischen Ankopplung ist das verbleibende Volumen in

Referenz- und Probenzelle mit bidestilliertem Wasser gefüllt.

Es zeigte sich, daß trotz der stark erhöhten thermischen Ankoppelung des Kalorimeters an die Umgebung und des etwa um den Faktor 40 reduzierten Meßvolumens aussagekräftige Messungen mit stabiler Nulllinie ohne weiters möglich waren. Dies ist auf die sehr anpassungsfähige Regelungselektronik des VP-DSC zurückzuführen. Die Reproduzierbarkeit ist jedoch eingeschränkt, da eine Positionsänderung der Meßkapillare in der Probenzelle zu einer Veränderung von Nulllinie und effektivem Meßvolumen führt. Dieses Problem tritt besonders dann auf, wenn die Druckzelle zur Druckerhöhung aus dem Kalorimeter entfernt und wiedereingesetzt wird. Berührungen der Druckzelle mit der Hand (z. B. beim Druckablassen) oder Erschütterungen im Labor haben bei den bisherigen Messungen hingegen nur selten zu Artefakten geführt. Die Genauigkeit des Drucksensors von 0,1 bar war eingeschränkt durch Veränderungen des Drucks mit der Temperatur, die bei einer Änderung um 60 K einige Zentel Bar betragen. Zudem machte sich bei längeren Messungen ein Druckverlust von etwa 1 bar pro Tag bemerkbar. Über den Temperaturbereich einer Umwandlung sind diese Druckänderungen aber vernachlässigbar.

2.4 Viskosimetrie

Im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchungen an Dispersionen von Lipidvesikeln wurde auch die Viskosität solcher Gemische in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht.

Unter der Viskosität wird hier die dynamische Scherviskosität η verstanden, die durch die Beziehung

$$\tau_{xy} = \eta \frac{\partial v_x}{\partial y} \quad (2.12)$$

gegeben ist (Kohlrausch, 1996, S. 185). Für die Schubspannung τ_{xy} betrachte man in einer in x -Richtung strömenden Flüssigkeit eine sehr kleine, in y -Richtung

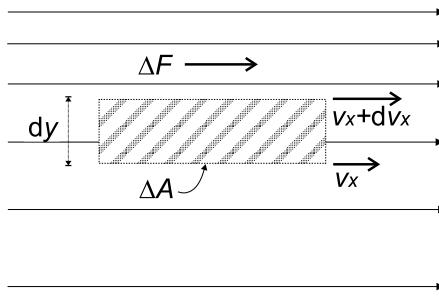


Abbildung 2.6: Zur Definition der Viskosität η (nach Feynman et al., 1977, S. 41-2). Der Gradient der Strömungsgeschwindigkeit bewirkt eine Schubspannung $\Delta F/\Delta A$ auf die gedachte, rechteckige Zelle.

infinitesimal dünne, rechteckige Zelle der Fläche ΔA (Abb. 2.6). Dann bewirkt die über die Dicke dy anfallende Differenz der Strömungsgeschwindigkeit dv_x eine Scherkraft ΔF auf die Fläche ΔA und somit eine Schubspannung $\tau_{xy} = \Delta F/\Delta A$.

Verschiedene Substanzen können unterschiedliches Fließverhalten zeigen. Für die später folgenden Messungen ist aber nur das Newtonsche Flüssigkeitsverhalten von Belang, bei dem η nicht von der Strömungsgeschwindigkeit oder der deformierenden Kraft abhängt.

Zur Messung der Viskosität wird ein Rotationsviskosimeter benutzt, dessen Funktionsweise in Abbildung 2.7 dargestellt ist. Das Rotationsviskosimeter besteht aus einem Topf, der von einem Motor mit konstanter Winkelgeschwindigkeit ω gedreht wird. In dem Topf befindet sich ein kleinerer Zylinder, der an einem Torsionsfaden aufgehängt ist. Auf den Torsionsfaden ist ein Spiegel geklebt, dessen Winkelauslenkung mit einem Lichtstrahl und einem Detektor gemessen wird. In den Zwischenraum von Topf und Zylinder wird die Probe gefüllt. Da bei dieser Bauart der äußere Topf rotiert, spricht man von einem Rotationsviskosimeter nach Couette (Kohlrausch, 1996, S. 195). Die Probe überträgt bei sich drehendem äußeren Topf ein Drehmoment auf den inneren Zylinder. Eine elektronische Gegensteuerung sorgt nun dafür, daß die Verdrillung des Torsionsfadens bzw. die Winkelauslenkung des Spiegels stets Null bleibt. Dazu wird ein entgegengesetztes

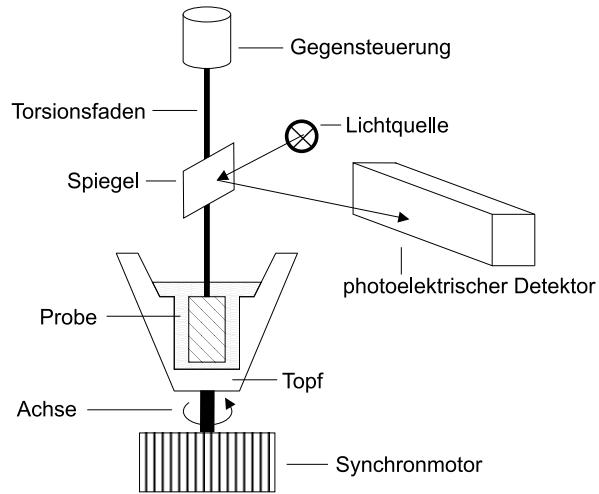


Abbildung 2.7: Funktionsweise eines Rotationsviskosimeters nach Couette. Die Probe wird zwischen zwei Zylinder gefüllt, von denen der äußere von einem Motor mit konstanter Winkelgeschwindigkeit gedreht wird. Dadurch wird ein Drehmoment auf den inneren Zylinder übertragen, der an einem Torsionsfaden aufgehängt ist. Mit einer Gegensteuerung, die die Winkelauslenkung des Lichtzeigers konstant hält, lässt sich so das Drehmoment bei vorgegebener Winkelgeschwindigkeit bestimmen, woraus man die Viskosität berechnen kann.

Drehmoment $-M$ erzeugt, das gemessen wird.

Aus den Abmessungen der Zylinder kann man nun die Viskosität berechnen (Umstätter, 1952, S. 68-74) und erhält

$$\eta = \frac{M}{\omega} \frac{r_a^2 - r_i^2}{4\pi L r_a^2 r_i^2} \quad (2.13)$$

mit r_a : Innenradius des Topfes, r_i : Radius des inneren Zylinders und L : Länge des inneren Zylinders.

Für diese Arbeit wurde die Viskosität nicht direkt nach Gleichung (2.13) bestimmt. Ausgehend von der Proportionalität von Viskosität und Drehmoment bei konstanter Winkelgeschwindigkeit, wurde das Verhältnis der Viskosität der Vesikel-Dispersion zu der von Wasser gemessen. Die Viskosität von destilliertem Wasser ist bekannt, zur Einschätzung der Größenordnung sei hier der Wert für 20 °C angegeben, der 1,002 mPa·s beträgt (Kohlrausch, 1996, S. 190). Weitere Referenzwerte der Viskosität von Wasser finden sich bei Lide und Frederikse (1996,

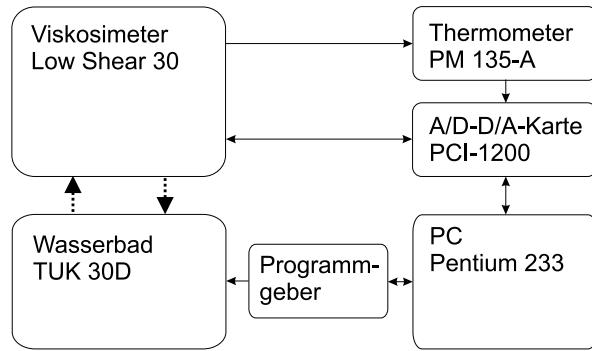


Abbildung 2.8: Experimenteller Aufbau des Viskosimeters. Ein Computer steuert Temperierung und Drehgeschwindigkeit des Topfes (vgl. Abb. 2.7). Temperatur und Winkelauslenkung des inneren Zylinders werden über eine A/D-Wandlerkarte an den Computer geleitet, der die weitere Auswertung übernimmt. Datenübertragungen sind als durchgezogene, der Fluß der Temperierflüssigkeit als gepunktete Linien dargestellt.

S. 6-8).

Der konkrete Aufbau des verwendeten Rotationsviskosimeters wurde von Matthias F. Schneider in seiner Diplomarbeit geleistet (Schneider, 1999, in Vorbereitung) und soll hier nur kurz beschrieben werden (Abb. 2.8).

Die zentrale Steuerung und Meßwerterfassung übernimmt ein PC unter dem Betriebssystem Microsoft Windows 95 (Redmond/WA, USA), was eine weitgehende Automatisierung der Messung erlaubt. Ein Rotationsviskosimeter Low Shear 30 der Firma Contraves (Zürich, Schweiz) wird über ein Wasserbad TUK 30 D von Lauda (Lauda-Königshofen, Deutschland) temperiert, das eine Temperaturkonstanz von 0,02 K über Zeiträume von einigen Minuten erlaubt. Die Solltemperatur des Wasserbads wird über einen selbstkonstruierten Programmgeber vom PC aus vorgegeben. Die Schnittstelle des Computers mit dem Viskosimeter und dem Thermometer PM 135-A von Waldsee Electronic (Bad Waldsee, Deutschland) ist eine A/D-D/A-Wandlerkarte PCI-1200 von National Instruments (Austin/TX, USA). Darüber werden die Temperatur im Viskosimeter und eine dem Drehmoment M proportionale Spannung eingelesen sowie die Motorgeschwin-

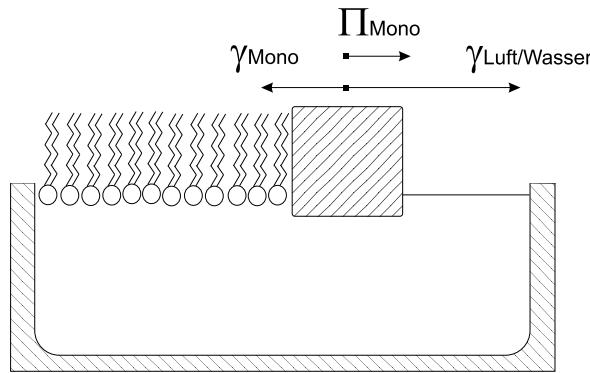


Abbildung 2.9: Gleichgewicht der makroskopischen Kräfte beim Monofilm. Die Oberflächenspannung des Lipidfilms, der sich links der beweglichen Barriere auf der Subphase befindet, ist kleiner als die der Luft/Wasser-Grenzfläche. Deshalb hat der Monofilm die Tendenz sich auszubreiten, der mit einem Oberflächendruck Π über die bewegliche Barriere entgegengewirkt wird.

digkeit vorgegeben. Das Steuerprogramm wurde mit der Entwicklungsumgebung LabView 4.0.1 von National Instruments erstellt.

2.5 Monofilm-Messungen

Für die Messung von Isothermen des Oberflächendrucks Π in Abhängigkeit der Fläche pro Molekül A wurde eine Langmuir-Filmwaage benutzt, deren Funktionsprinzip in Abbildung 2.9 wiedergegeben ist.

Eine Langmuir-Filmwaage besteht aus einem Trog, in dem sich die sogenannte Subphase, hier hochreines Wasser, befindet. Die Oberfläche wird durch eine bewegliche Barriere geteilt. Auf einer der beiden Seiten der Barriere wird nun ein Lipidfilm aufgebracht. Wenn dessen Oberflächenspannung γ

$$\gamma = \left(\frac{\partial F}{\partial A} \right)_{N,T} \quad (2.14)$$

(F : freie Energie) kleiner als die der Wasser/Luft-Grenzfläche ist, breitet sich der Film über die Oberfläche aus. Um dem entgegenzuwirken, muß auf die bewegliche Barriere eine Kraft \tilde{F} ausgeübt werden. Das Verhältnis von dieser Kraft und

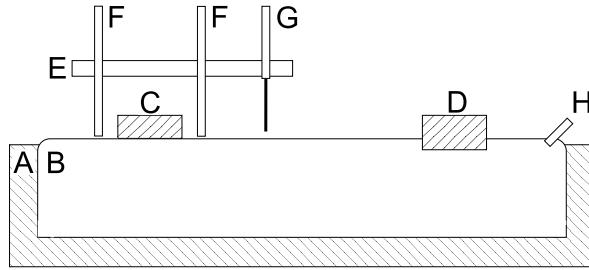


Abbildung 2.10: Schema der modifizierten Filmwaage (nach Brockman et al., 1984). A: Trog, B: Subphase, C: feste Barriere, D: bewegliche Barriere, E: Befestigung, F: Kapillare zum Absaugen, G: Nadel zur Probeninjektion, H: Einlaß für die Subphase.

der Länge der Barriere L bezeichnet man als Oberflächendruck $\Pi = \tilde{F}/L$. Neben dieser operativen Definition gibt es auch eine äquivalente thermodynamische Beziehung

$$\Pi = - \left(\frac{\partial F_m}{\partial A} \right)_{N,T} \quad (2.15)$$

wobei F_m die freie Energie des Monofilms ist. Diese ergibt sich aus der Differenz der freien Oberflächenenergie bei Anwesenheit des Monofilms F_S und der der reinen Luft/Wasser-Grenzfläche F_0 (Feng, 1999).

Den Oberflächendruck Π kann man auf verschiedene Weisen messen. Die verwendete Filmwaage FW-1 von Lauda (Lauda-Königshofen, Deutschland) verfügte über eine zweite, feste Barriere, die an einer Feder befestigt war. Die geringfügige Auslenkung der festen Barriere wurde über eine induktive Abstandsmessung aufgezeichnet und daraus der Oberflächendruck bestimmt.

Die Monofilm-Messungen wurden während eines Aufenthaltes am *Hormel Institute* der *University of Minnesota* in Austin durchgeführt. Die dortige Lauda-Filmwaage ist auf vielfältige Weise modifiziert worden, was an anderer Stelle veröffentlicht ist (Brockman et al., 1980; Brockman et al., 1984).

Die wesentlichen Merkmale sind in Abbildung 2.10 dargestellt. Die Filmwaage befindet sich in einem klimatisierten Raum und ist gegen Umwelteinflüsse (Tem-

peratur, Verunreinigungen, Erschütterungen) und Verdunstung geschützt. Die Temperatureinstellung erfolgt auf 0,1 K genau durch eine Temperier-Schlange unter dem Trog, die von einem Wasserbad-Thermostaten gespeist wird.

Die Vorteile dieses speziellen Designs sind hohe Reproduzierbarkeit und vollautomatische Vermessung mehrerer Proben. Die hohe Reproduzierbarkeit wird durch drei Eigenschaften erreicht.

- Ein sehr gut reproduzierbares Volumen der Probe wird mit einem Autoinjektor stets an der gleichen Stelle über der Subphase injiziert (G in Abb. 2.10).
- Eine automatisierte Reinigungsprozedur bei geschlossener Filmwaage, bei der Subphase zugegeben, die Oberfläche mit der beweglichen Barriere mehrfach „abgewischt“ und Subphase wieder abgesaugt wird, sorgt für eine sehr saubere Subphasen-Oberfläche (F und H in Abb. 2.10).
- Die rechte der beiden Absaugkapillaren F in Abb. 2.10 saugt die Subphase bis zu einem bestimmten Niveau ab, so daß Effekte durch die Änderung der gekrümmten Subphasen-Oberfläche minimiert werden.

Für alle Messungen war die Subphase Wasser, das – durch Umkehrosmose und einen Kohlenstofffilter vorgereinigt – ein Elix-3 Deionisierungs-System und ein Milli-QUV-Plus-Polishing-System von Millipore (Bedford/MA, USA) durchlaufen hatte. Die Leitfähigkeit betrug danach noch 18,2 MΩcm, der Gesamtgehalt an organischen Verbindungen sollte nach Herstellerangaben unter 5 ppb gelegen haben.

Vor den Messungen wurde der Drucksensor der Filmwaage kalibriert. Dazu wurden bei 25,0 °C die Kollaps-Oberflächendrücke von Triolein und Oleylalkohol bestimmt und mit Referenzwerten verglichen (Oleylalkohol: (33,44±0,6) mN/m, Triolein: (11,87±0,3) mN/m). Beide Substanzen stammten von Nu-Chek-Prep (Elysian/MN, USA). Dann wurde der entsprechende Parameter im Steuerpro-

gramm angepaßt, bis die Anzeige im Rahmen der Genauigkeit der Literaturwerte diesen entsprach.

2.6 Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie

Bei der Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie) nutzt man die Wechselwirkung magnetischer Dipole mit einem äußeren Feld aus, um mehr über die Umgebung dieser Dipole zu erfahren. In einem ESR-Experiment bringt man eine paramagnetische Probe in ein starkes, statisches Magnetfeld, dem man ein schwächeres magnetisches Wechselfeld (Mikrowellen) überlagert. Dann wird die Absorption der Probe in Abhängigkeit der eingestrahlten Frequenz untersucht. Meist benutzt man aber einen Resonator mit festen Abmessungen und läßt daher die Frequenz konstant. Dann wird das starke Magnetfeld, von dem die Energien der induzierten Übergänge abhängen (vgl. z. B. Gln. (2.19)), kontinuierlich verändert. Das war auch bei dem benutzten ESR-Spektrometer der Fall, wo dieses Magnetfeld zusätzlich moduliert wurde, um Empfindlichkeit und Auflösung zu steigern. Durch diese Modulierung entsprachen die gewonnenen ESR-Spektren der ersten Ableitung der eigentlichen Absorptionsspektren.

In der ESR-Spektroskopie betrachtet man die magnetischen Momente von ungepaarten Elektronen, die in Ionen der Übergangselemente und in Komplexen dieser Elemente in Proteinen (z. B. Cytochrom C oder Hämoglobin) natürlich vorkommen. Bei Lipiden tritt das Problem auf, daß diese in ihrer natürlichen Form keine ungepaarten Elektronen aufweisen und somit für die ESR „unsichtbar“ sind. Deshalb gibt man zu den Lipiden sogenannte Spin-Label. Dabei handelt es sich um Lipid-Moleküle, die an einer Stelle eine radikalische Gruppe tragen. Bei der Interpretation der ESR-Spektren wird angenommen, daß diese Spin-Label die Membranen nur unwesentlich stören und gleichzeitig die Dynamik der sie umgebenden Lipid-Moleküle widerspiegeln.

Ein hier verwendetes Spin-Label ist das sogenannte 5-PC-SL (Abb. 2.11), bei

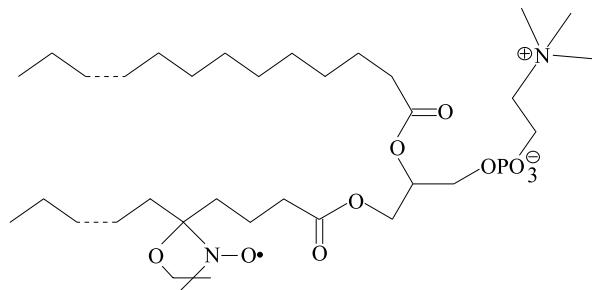


Abbildung 2.11: Strukturformel des Spin-Labels 5-PC-SL. An dem ersten Fettsäurerest eines Phosphatidylcholins ist an Position 5 eine Doxyl-Gruppe angebracht. Das ungepaarte Elektron der Nitroxidgruppe wechselwirkt bei der ESR-Spektroskopie mit den äußeren Magnettfeldern.

dem sich an der ersten aliphatischen Kette eines Phosphatidylcholins an Position 5 eine Doxyl-Gruppe befindet. Die darin enthaltene Nitroxid-Gruppe besitzt ein ungepaartes Elektron in einem $2p\pi$ -Orbital des Stickstoffs (Heimburg, 1989, S. III-2). Die Beschaffenheit der Fettsäurereste ist nicht für jedes Molekül genau festgelegt, da für die Spin-Label-Synthese ein aus Eigelb gewonnenes Lysophosphatidylcholin-Gemisch verwendet wurde, sogenanntes *egg (yolk) lysophosphatidylcholine*. Die darin enthaltenen Moleküle hatten zu 90 % gesättigte Ketten der Länge 16 und 18. Des weiteren wurde das Spin-Label 13-DMPC-SL benutzt, bei dem sich analog an Position 13 der ersten Kohlenstoffkette eines DMPC-Moleküls eine Doxylgruppe befand. Die für diese Arbeit benutzten Spin-Label wurden freundlicherweise von Derek Marsh (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Da das magnetische Moment eines Moleküls von seinem Spin abhängt, ist zur theoretischen Beschreibung der ESR eine relativistische Theorie erforderlich. Zur Vereinfachung geht man aber zu einem effektiven Spin-Hamilton-Operator $\mathcal{H}_{S,\text{eff}}$ über (Kohlrausch, 1985, S. 812). Für die ESR enthält dieser in guter Näherung nur einen Term für den Elektron-Zeeman-Effekt \mathcal{H}_S und einen für die Elektron-

Kern-Spinwechselwirkung \mathcal{H}_{IS}

$$\mathcal{H}_{S,\text{eff}} = \mathcal{H}_S + \mathcal{H}_{IS} \quad (2.16)$$

$$\mathcal{H}_S = \mu_B \underline{H} \cdot \underline{g} \cdot \underline{S} \quad (2.17)$$

$$\mathcal{H}_{IS} = \underline{I} \cdot \underline{A} \cdot \underline{S} \quad (2.18)$$

(μ_B : Bohrsches Magneton, \underline{g} : g -Tensor für Elektronen, \underline{S} : Elektronen-Spin-Operator, \underline{I} : Kernspin-Operator und \underline{A} : Hyperfeinstruktur-Tensor).

Da die Wechselwirkung von Elektronen-Spin und äußerem Magnetfeld im allgemeinen von der Lage des Moleküls zum Feld abhängt, sind \underline{H} und \underline{S} durch einen Tensor gekoppelt. Ebenso hängen Elektronen-Spin und Kern-Spin über den Tensor \underline{A} zusammen, da ihre Wechselwirkung von der räumlichen Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeitsdichte des Elektrons abhängt.

Bei dem Stickstoffatom der Nitroxid-Gruppe ist die Kernspinquantenzahl $I = 1$ und der Elektronenspin $S = \frac{1}{2}$. Nach den Regeln für quantenmechanische Drehimpulse sind also drei bzw. zwei Eigenwerte möglich, $m_I \in \{-1, 0, 1\}$ beim Kernspin und $m_S \in \{-\frac{1}{2}, +\frac{1}{2}\}$ für den Elektronenspin. Mit den Auswahlregeln $\Delta m_I = 0$ und $\Delta m_S = 1$ erhält man die in Abbildung 2.12 dargestellten Übergänge.

Nach Diagonalisierung der Tensoren \underline{g} und \underline{A} gelten folgende Beziehungen für die Übergangsenergien (Heimburg, 1989, S. III-4):

$$\hbar \omega_1 = g_{xx} \mu_B H_x + A_{xx} m_I \quad (2.19)$$

$$\hbar \omega_2 = g_{yy} \mu_B H_y + A_{yy} m_I \quad (2.20)$$

$$\hbar \omega_3 = g_{zz} \mu_B H_z + A_{zz} m_I \quad (2.21)$$

Wenn man mit konstanter Frequenz der eingestrahlten Mikrowellen und variablem Magnetfeld arbeitet, bietet es sich an, den A -Tensor in den Einheiten des

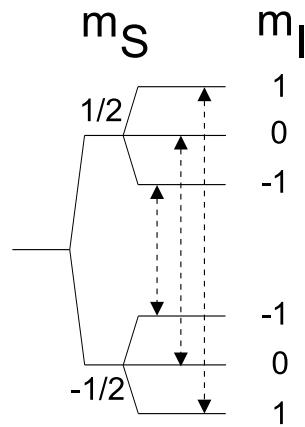


Abbildung 2.12: Aufspaltung des Grundzustandes und erlaubte Übergänge bei der Nitroxid-Gruppe.

Magnetfelds auszudrücken:

$$A_{ii} \rightarrow \frac{A_{ii}}{g_{ii} \mu_B} \quad (2.22)$$

Als Spektrum wird dann die Absorption (bzw. deren erste Ableitung) als Funktion des Magnetfelds aufgenommen, so daß die Hauptachsenelemente des Hyperfeinstrukturtensors den maximalen und minimalen Abstand der Resonanz-Linien angeben.

Für alle Orientierungen des Moleküls relativ zum Magnetfeld gibt es also sechs Energieniveaus mit drei möglichen Übergängen. Für das Doxyl-Label sind die Hauptachsenelemente des g -Tensors relativ ähnlich verglichen mit den Differenzen der Elemente des Hyperfeinstruktur-Tensors (Heimburg, 1989, S. III-5).

Die Anisotropie des A -Tensors nutzt man nun aus, um die Dynamik der Lipidketten zu untersuchen. Angenommen, die Lipide lägen als Kristall vor. Dann wären sie alle auf eine bestimmte Weise gegenüber dem Magnetfeld orientiert, so daß man im allgemeinen *ein* Absorptionsspektrum mit drei Maxima erwartete. Wäre die Probe ein Kristallpulver, so würden sich verschiedene Spektren verschieden orientierter Moleküle überlagern. In einer Flüssigkeit jedoch sind die Lipide beweglich, so daß eine Mittelung der Anisotropie der Hyperfeinaufspal-

tung stattfinden kann, falls diese Bewegung schneller als die Zeitskala der ESR ist. Bei vollständiger Mittelung wird ein Spektrum mit drei scharfen Linien gemessen werden. Diese Beweglichkeit wird als Rotation der Moleküle in den Bloch-Gleichungen berücksichtigt (Marsh, 1986). Damit wird die Linienform der Spektren von der Beweglichkeit der Moleküle abhängig. Ein weiterer Effekt, der die Linien verbreitert und mit der Beweglichkeit der Spin-Label zusammenhängt, ist die sogenannte Spin-Spin-Austauschwechselwirkung (Marsh, 1986). Dabei führt eine hohe Begegnungsrate der Spin-Label zur Verbreiterung der Linien, womit man Diffusionsgeschwindigkeiten messen kann (Sachse und Marsh, 1986; Sachse et al., 1987). Denselben Effekt haben auch lokal hohe Spin-Label-Konzentrationen, z. B. wenn sich Spin-Label in kristallinen Lipid-Phasen nicht mischen und Ausscheidungen bilden. Des weiteren wirkt sich die Lebensdauer der elektronisch angeregten Zustände auf die Linienbreite aus (Spin-Gitter-Relaxation).

Man kann mit weiteren Betrachtungen unter Ausnutzung der Symmetrie der Membran aus den Abständen der Resonanzextrema, die Diagonalelementen des A -Tensors entsprechen, bei bekannter Orientierung der Nitroxid-Gruppe zum Lipid-Molekül einen Ordnungsparameter definieren (Heimburg, 1989, S. III-5 – III-12). Dieser Ordnungsparameter ist ein Maß für die Ordnung der Kohlenstoffketten im Lipidmolekül. Er wird so definiert, daß er unterhalb der Umwandlung, also im geordneten Zustand, 1 ist. Oberhalb der Umwandlung, wenn sehr viele verschiedene Zustände gleichberechtigt vorliegen können, wird er zu Null. Je nachdem, ob sich der Ordnungsparameter bei einer bestimmten Temperatur unstetig ändert oder stetig verschwindet, spricht man von einem Übergang erster bzw. höherer Ordnung. Ist das Verschwinden über einen Temperaturbereich ausgeschmiert, bezeichnet man den Übergang als kontinuierlich. In der Landau-Theorie, die Phasenübergänge höherer Ordnung betrachtet, wird die freie Energie F eines Systems nach einem Ordnungsparameter entwickelt, um solche Übergänge phänomenologisch beschreiben zu können (Becker, 1985, S. 265). Die Landau-Theorie kann auch auf den Übergang vom Gel-Zustand zum flüssig-kristallinen

Zustand bei Lipid-Membranen angewendet werden (Sackmann, 1995b).

In dieser Arbeit wird ein anderer Zugang zur Dynamik der Lipid-Ketten gewählt, da die Bestimmung der Abstände der Resonanzlinien bei den sehr breiten und niedrigen Extrema der gemessenen ESR-Spektren nur zu einer groben Angabe eines Ordnungsparameters führt. Dazu sei daran erinnert, daß eine zunehmende Rotationsgeschwindigkeit der Lipid-Ketten zu einer zunehmenden Mittelung der Anisotropie des *A*-Tensors führt, was sich in schmaleren Resonanzmaxima äußert. Da aber die Gesamtabsorption der Probe nur von der Konzentration der Spin-Label abhängt, muß das Doppelintegral über die ESR-Spektren (erste Ableitung der Absorptionsspektren) eine Konstante sein. Demzufolge bedeutet eine größere Schärfe der Linien eine Vergrößerung der Höhe jedes einzelnen Maximums. Zeichnet man nun die Linienhöhe einer Resonanzlinie als Funktion der Zeit auf, so gewinnt man Informationen über die stattfindenden Änderungen der Beweglichkeit der Lipid-Moleküle (Heimburg, 1989, S. III-10), und das sensibler als bei Verwendung der extremalen Abstände der Resonanzlinien (Heimburg und Biltonen, 1994). Aus der Veränderung der Linienhöhe kann auch ein Ordnungsparameter zur weiteren quantitativen Untersuchung der Umwandlung definiert werden.

Für die Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurde ein ESR-Spektrometer Century-Line von Varian (Palo Alto/CA, USA) verwendet. Die Frequenz der eingesendeten Mikrowellen betrug 9,118 GHz, das Magnetfeld wurde von 3193 G bis 3293 G verändert. Die Probe wurde in eine Quarzkapillare gefüllt und diese zugeschmolzen in ein ESR-Probengefäß gesteckt, das zur thermischen Stabilisierung mit Silikon-Öl gefüllt war. In dem Silikon-Öl befand sich ein Thermoelement, mit dem die Temperatur bestimmt wurde. Die Temperierung erfolgte auf etwa 0,1 K genau mit einer speziellen Regelungseinheit, die bei konstanter Kühlung durch gasförmigen Stickstoff ein Heizelement steuerte.

DMPC	1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-phosphocholin
677,94 g/mol	Dimyristoylphosphatidylcholin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-phosphocholin
734,05 g/mol	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DMPG	1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-rac-(1-glycerol)]
665,06 g/mol	Dimyristoylphosphatidylglycerol

Tabelle 2.3: Abkürzung, systematischer Name, molare Masse und ein gebräuchliches Synonym für jedes der verwendeten Lipide. Für DMPG ist die Molmasse des Anions angegeben. Molekülstrukturen von DMPC und DMPG finden sich in Abbildung 1.1. DPPC unterscheidet sich von DMPC nur um je zwei CH₂-Gruppen längere Kohlenwasserstoff-Ketten.

2.7 Präparation der Proben

Materialien

Die verwendeten Phospholipide (Tab. 2.3) wurden, falls nichts anderes angegeben ist, von der Firma Avanti Polar Lipids (Alabaster/AL, USA) als Pulver bezogen. Dabei lag DMPG als Natriumsalz vor. Die Reinheit dieser Lipide wurde mittels Dünnschichtchromatographie geprüft (Boyer, 1993, S. 61). Dazu wurden SiO₂-beschichtete Glasplatten und als Laufmittel ein Gemisch von CH₂Cl₂, CH₃OH und 32%iger NH₄OH-Lösung im Volumenverhältnis von 65:30:3 benutzt. Die Lipide wurden in einem 2:1-Gemisch von CH₂Cl₂ und CH₃OH gelöst.

Soweit zur Herstellung der Proben ein Puffer verwendet wurde, bestand dieser aus dem pH-Puffer HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethan-sulfonsäure) von Sigma (St. Louis/MO, USA), dem Kalzium-Puffer EDTA (Ethylenediamin-tetraessigsäure-diammoniumsalz) von Fluka (Buchs, Schweiz) und Natriumchlorid von Baker (Deventer, Holland). Der spezielle Puffer HEPES wurde vor allem wegen der geringen Temperaturabhängigkeit seines pK_a-Wertes und der vernachlässigbaren Interaktion mit Membranen verwendet (Boyer, 1993, S. 36). Der Kalziumpuffer EDTA hatte den Nebeneffekt, das Wachstum von Mikroorganismen in einer Probe stark zu erschweren. Der pH-Wert wurde mit Na-

triumhydroxid (0,1 mol/l) eingestellt, das ebenfalls von Baker bezogen wurde. Alle Pufferkomponenten wiesen mindestens den Reinheitsgrad z. A. (zur Analyse) auf. Als Lösungsmittel wurde bidestilliertes Wasser verwendet. Die genaue Zusammensetzung der Lipid-Dispersion ist immer bei den Meßergebnissen angegeben.

Alle verwendeten organischen Lösungsmittel stammten, falls nichts anderes angegeben ist, von Baker (Deventer, Holland).

Multilamellare Vesikel

Aus den zwitterionischen Phosphatidylcholinen wurden Dispersionen multilamellarer Vesikel (MLV) hergestellt, indem diese einfach in bidestilliertem Wasser oder Puffer bei einer Temperatur oberhalb der Umwandlung vom Gel-Zustand nach flüssig-kristallin gelöst wurden. Man bezeichnet Vesikel als multilamellar, wenn sie von einer Membran aus mehreren Doppelschichten umgeben sind. Der Lösungsprozeß wurde durch kurzes Schütteln mit einem MS1 Minishaker von IKA Works (Wilmington/NC, USA) bei 2400 min^{-1} unterstützt. Dabei formen sich spontan multilamellare Vesikel (Szoka und Papahadjopoulos, 1980; Lasic, 1988).

Unilamellare Vesikel

Bei unilamellaren Vesikeln hängt die Art der Präparation vom verwendeten Lipid ab. Das anionische DMPG bildet ober- und unterhalb der Phasenumwandlung spontan hauptsächlich unilamellare Vesikel (Lasic, 1988). Da das thermische Verhalten von DMPG sehr sensibel gegenüber pH-Wert, Ionenstärke und Kalzium-Konzentration ist, wurde hier stets ein Puffer verwendet.

Die zwitterionischen Phosphatidylcholine bilden spontan MLV, so daß es hier einer weiteren Technik bedarf, um unilamellare Vesikel zu erhalten. Dazu wurde ein sogenannter Extruder (LipoFast Basic) von Avestin (Ottawa, Kanada) benutzt. Bei diesem handelt es sich um eine Apparatur, bei der man mittels einer Spritze eine Dispersion multilamellarer Vesikel durch einen Filter in ei-

ne zweite Spritze preßt (MacDonald et al., 1991). Der Filter besteht aus einer Polycarbonat-Folie, in der sich Löcher mit einem Durchmesser von etwa 100 nm befinden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, daß diese Methode unilamellare Vesikel ergibt, die einen mittleren Durchmesser haben, der dem der Filteröffnungen entspricht (MacDonald et al., 1991). Die Breite der Größenverteilung hängt dabei davon ab, wie oft die Dispersion durch den Filter gedrückt wurde. Bei einer Größe von etwa 100 nm spricht man von großen, unilamellaren Vesikeln (LUV für *large unilamellar vesicles*).

Zum Extrudieren der MLV-Dispersionen wurde der Extruder in einen Messingblock eingeschlossen, der mit einem Wasserbad auf eine Temperatur oberhalb der Hauptumwandlung gebracht wurde. Die Ausgangsdispersion wurde 21mal durch den Filter gedrückt. Die Konzentrationen von Phosphatidylcholin-Dispersionen waren auf etwa 10 mg/ml begrenzt, da bei höheren Konzentrationen ein zu hoher Druck für die Extrusion hätte angewendet werden müssen.

Für eine LUV-Dispersion von DMPC in Wasser (10 mg/ml) wurde die Größenverteilung durch dynamische Lichtstreuung mit einem Nicomp Model 370 Submicron Particle Sizer V5.0 von Pacific Scientific (Silver Spring/MD, USA) kontrolliert. Dabei wurde unter der Annahme nichtwechselwirkender, sphärischer Vesikel mittels der Abfallzeit der Intensitäts-Autokorrelationsfunktion des gestreuten Lichts und der Einstein-Stokes-Beziehung für die Diffusionskonstante von Kugeln in einem viskosen Medium eine Verteilung von Durchmessern ermittelt. Diese war im Fall der LUV-Dispersion unimodal und ergab einen Durchmesser von (105±26) nm (vgl. Abb. 2.13).

Mischungen

Zur Erstellung einer äquimolaren Mischung von DMPC und DPPC (entspricht $M_w = 706,0$ g/mol) wurden entsprechende Mengen beider Lipide eingewogen und in Chloroform gelöst. Die so entstandene Lösung wurde zunächst unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Dann wurde über 5 Stunden in einem Exsikkator bei

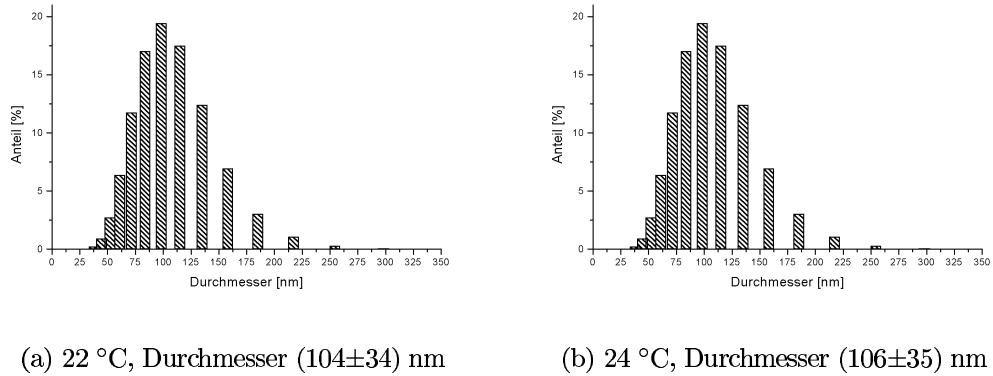


Abbildung 2.13: Beispiele aus Lichtstreuungsexperimenten gewonnener Größenverteilungen für extrudierte DMPC-Vesikel. Für die Extrusion wurde ein Filter mit 100 nm Porendurchmesser verwendet, durch den die Ausgangsdispersion 21mal gedrückt wurde.

einem Druck unter 0,1 mbar das restliche Chloroform abgepumpt. Das trockene Gemisch wurde dann in Wasser gelöst und daraus eine LUV-Disperion hergestellt, wie auf Seite 40 beschrieben ist.

Vesikel mit Spin-Labeln

Zunächst wurde aus dem jeweiligen Spin-Label (5-PC-SL oder 13-DMPC-SL, vgl. S. 33) eine Lösung in Methanol erstellt und diese dann mit in Dichlormethan gelöstem DMPC gemischt, so daß zu 2 mg Lipid 1,5 % Spin-Label hinzukamen. Diese Lösung wurde unter Stickstoff getrocknet und verbliebenes Lösungsmittel in einem Exsikkator bei einem Druck von unter 0,1 mbar über 12 Stunden abgepumpt. Danach wurden 95 μ l Puffer (5 mmol/l HEPES, 1 mmol/l EDTA, pH = 7,48) zugegeben und die Probe darin bei 48 °C gelöst. Diese Dispersion wurde in eine Kapillare gefüllt, die MLVs abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Kapillare zugeschmolzen.

Monofilme

Bei Monofilmmessungen wird eine Lipid-Lösung in organischem Lösungsmittel auf eine Wasseroberfläche aufgebracht, so daß sich nach Verdunsten des Lösungsmittels ein monomolekularer Film auf dem Wasser ausbildet. Da die Messungen an Monofilmen überaus empfindlich gegen Verunreinigungen sind, mußte hier mit besonderer Sorgfalt gearbeitet werden.

DMPC und DPPC wurden wiederum von Avanti bezogen, diesmal jedoch als Lösung in Chloroform. Die Lipide wurden zunächst unter Stickstoff getrocknet. Dann wurde, um verbliebenes Chloroform zu entfernen, etwas Benzol und Methanol beigegeben und wiederum getrocknet. Schließlich wurden die Proben in einem Gemisch von Hexan und Ethanol (Volumenverhältnis 95:5) wieder gelöst. Die für die Monofilm-Messungen verwendeten organischen Lösungsmittel außer Ethanol wurden von Burdick & Jackson (Muskegon/MI, USA) bezogen und waren von hoher Reinheit. Das Ethanol war hochrein und stammte von Aaper (Shelbyville/KY, USA). Zusätzlich wurde es über CaH_2 destilliert, um den Wassergehalt weiter zu reduzieren.

Abschließend wurde die Lipid-Konzentration anhand des Phosphorgehalts nach der Methode von Fiska und SubbaRow (Bartlett, 1958) auf 0,4 % genau und besser bestimmt.

Die so erhaltenen Lösungen wurden dann zum Teil mit Hexan/Ethanol weiter verdünnt. Dies war notwendig, da das auf die Subphase injizierte Volumen durch den Autoinjektor der Filmwaage vorgegeben war und für eine Veränderung der Kompressionsrate die Anzahl der Moleküle angepaßt werden mußte.

3 Theorie

3.1 Proportionalität von Umwandlungsenthalpie und -volumen

Bei den in diesem Abschnitt dargestellten Überlegungen zur Thermodynamik einer Lipid-Membran soll von folgender Voraussetzung ausgegangen werden. Es wird angenommen, daß im Temperaturbereich der Schmelzumwandlung der Kohlenwasserstoff-Ketten die Wärmekapazität proportional zur Volumenänderung ist.

$$\frac{\partial \hat{V}}{\partial T} = \gamma_{\text{vol}} \Delta c_p \quad (3.1)$$

Dabei ist Δc_p die molare Überschuß-Wärmekapazität gegenüber einer Referenzsubstanz, γ_{vol} eine Proportionalitätskonstante und \hat{V} das scheinbare molare Volumen des Lipids. Letzteres berechnet sich aus der Dichte der Probe ρ , der Dichte des Lösungsmittels ρ_0 und der molaren Massen M_w des Lipids. Es wird als „scheinbares“ Volumen bezeichnet, da der Berechnung die Annahme zugrunde liegt, daß sich das Probenvolumen additiv aus Lösungsmittelvolumen und Lipidvolumen zusammensetzt (Jolicoeur, 1981).

$$\hat{V} = \frac{M_w}{\rho_0} \left(1 - \frac{1000(\rho - \rho_0)}{c} \right) \quad (3.2)$$

Für c ist die Konzentration des Lipids in g/l einzusetzen, um \hat{V} in ml/mol zu erhalten. Oft benutzt man in der physikalischen Chemie auch das partielle molare Volumen \check{V} .

$$\check{V} = \left(\frac{\partial V}{\partial n} \right)_{T, P, n_0} \quad (3.3)$$

(n_0 : Stoffmenge des Lösungsmittels, n : Stoffmenge des Lipids). Dieses berücksichtigt die Konzentrationsabhängigkeit des Lösungs-Volumens, das sich im allgemeinen nicht als Summe der Komponenten-Volumina ergibt. Für Vesikel-Dispersionen ist der Unterschied zwischen scheinbarem und partiellem molarem Volumen jedoch gering (Wiener et al., 1988). Im folgenden soll weiterhin angenommen werden, daß das Volumen V eines Lipids in einfacher Weise durch das scheinbare molare Volumen \hat{V} angegeben werden kann

$$V = n\hat{V} \quad (3.4)$$

wobei n für die Stoffmenge des Lipids steht.

Die nun aufgeführten Überlegungen zur Ausnutzung der Annahme (3.1) folgen dem von Heimburg vorgeschlagenen Modell (Heimburg, 1998). Die Gültigkeit der Annahme (3.1) wird im Abschnitt 5.2 diskutiert werden.

Für die Enthalpie aller Zustände i einer Membran gilt jeweils

$$H_i = E_i + pV_i + \Pi A_i \quad (3.5)$$

(E_i : innere Energie, p : Druck, V_i : Volumen, Π : Oberflächendruck, A_i : Fläche). In einem isobar-isothermen System (p , Π und T konstant) kann man H_i als die Energie betrachten, die man aus der Hamilton-Funktion und einem Term pV für die Volumenarbeit für einen Zustand i bestimmen kann. Damit ergibt sich für die Zustandsfunktion Z

$$Z = \sum_i \Omega_i \exp\left(-\frac{H_i}{k_B T}\right) \quad (3.6)$$

mit Ω_i als Entartung des Zustandes i und der Boltzmann-Konstanten k_B . Der Meßwert einer Observablen X ist dann der folgende Mittelwert über die X der jeweiligen Zustände

$$\langle X \rangle := \frac{1}{Z} \sum_i X_i \Omega_i \exp\left(-\frac{H_i}{k_B T}\right) \quad (3.7)$$

Durch Differenzierung der Erwartungswerte der Observablen Enthalpie $\langle H \rangle$, Volumen $\langle V \rangle$ und Fläche $\langle A \rangle$ jeweils nach der Temperatur T , nach dem Druck p bzw. nach dem Oberflächendruck Π erhält man als Suszeptibilitäten die Wärmekapazität C_p , die isotherme Volumenkompressibilität κ_T^{vol} bzw. die isotherme Flächenkompressibilität κ_T^{area} .

$$C_p = \left(\frac{\partial \langle H \rangle}{\partial T} \right)_p = \frac{\langle H^2 \rangle - \langle H \rangle^2}{k_B T^2} \quad (3.8)$$

$$\kappa_T^{\text{vol}} = -\frac{1}{\langle V \rangle} \left(\frac{\partial \langle V \rangle}{\partial p} \right)_T = \frac{\langle V^2 \rangle - \langle V \rangle^2}{\langle V \rangle k_B T} \quad (3.9)$$

$$\kappa_T^{\text{area}} = -\frac{1}{\langle A \rangle} \left(\frac{\partial \langle A \rangle}{\partial \Pi} \right)_T = \frac{\langle A^2 \rangle - \langle A \rangle^2}{\langle A \rangle k_B T} \quad (3.10)$$

Nun seien H_0 und V_0 die intrinsische Enthalpie bzw. das intrinsische Volumen eines Lipids der Membran, während ΔH und ΔV die durch Konformationsänderungen der Lipid-Ketten verursachten Veränderungen von Enthalpie und Volumen sind. Die Klammern für die Erwartungswerte werden im folgenden der Einfachheit halber weggelassen. Es folgt

$$C_p = \left(\frac{\partial H_0}{\partial T} \right)_p + \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial T} \right)_p = C_{p,0} + \Delta C_p \quad (3.11)$$

$$\kappa_T^{\text{vol}} = -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V_0}{\partial p} \right)_T - \frac{1}{V} \left(\frac{\partial \Delta V}{\partial p} \right)_T = \kappa_{T,0}^{\text{vol}} + \Delta \kappa_T^{\text{vol}} \quad (3.12)$$

In gleicher Weise wird die Fläche A in A_0 und ΔA zerlegt.

$$\kappa_T^{\text{area}} = -\frac{1}{A} \left(\frac{\partial A_0}{\partial \Pi} \right)_T - \frac{1}{A} \left(\frac{\partial \Delta A}{\partial \Pi} \right)_T = \kappa_{T,0}^{\text{area}} + \Delta \kappa_T^{\text{area}} \quad (3.13)$$

Die Größen $C_{p,0}$, $\kappa_{T,0}^{\text{vol}}$ und $\kappa_{T,0}^{\text{area}}$ sind intrinsische Größen, die mit Fluktuationen der Moleküle verknüpft sind, aber nicht mit Umwandlungen der Membran. Die Anteile, die aus den Fluktuationen des Zustands der Membran kommen, sind in ΔC_p , $\Delta \kappa_T^{\text{vol}}$ und $\Delta \kappa_T^{\text{area}}$ berücksichtigt.

Bis jetzt sind die Funktionen für κ_T^{vol} , κ_T^{area} und C_p unabhängig voneinander, und es existiert keine einfache Beziehung zwischen ihnen.

Jetzt wird von der Annahme (3.1) Gebrauch gemacht. Wenn (3.1) zutrifft, dann kann gezeigt werden, daß ebenso für alle zugänglichen Zustände

$$\Delta V_i = \gamma_{\text{vol}} \Delta H_i \quad (3.14)$$

gilt (Heimburg, 1998). Mit den Gleichungen (3.8), (3.9), (3.11) und (3.12) gewinnt man eine Beziehung für die Überschuß-Kompressibilität

$$\Delta \kappa_T^{\text{vol}} = \frac{\gamma_{\text{vol}}^2 T}{\langle V \rangle} \Delta C_p \quad (3.15)$$

Als Folge der Proportionalitäts-Annahme (3.1) ist die Kompressibilität proportional zur Wärmekapazität. Beide nehmen also insbesondere Maxima bei den Phasenübergängen an.

Für die Flächenänderung wird ausgehend von (3.14) in Analogie ebenfalls eine Proportionalitätsrelation postuliert

$$\Delta A_i = \gamma_{\text{area}} \Delta H_i \quad (3.16)$$

(A_i : Fläche auf der Membran pro Molekül im Zustand i) deren Gültigkeit im Zusammenhang mit Monofilmexperimenten diskutiert werden wird (vgl. Abschn. 5.4). Damit erhält man nun auch eine Beziehung für die isotherme laterale Kompressibilität.

$$\Delta \kappa_T^{\text{area}} = \frac{\gamma_{\text{area}}^2 T}{\langle A \rangle} \Delta C_p \quad (3.17)$$

Dieses Ergebnis wird in eine Beziehung für den Biegemodul K_b eingesetzt. In der Elastizitätstheorie von Membranen bezeichnet der Biegemodul K_b (auch Biegesteifigkeit genannt) die Abhängigkeit der Krümmungsenergiedichte $f_{\text{krümm}}$ von mittlerer und spontaner Krümmung (s. z. B. Seifert und Lipowsky, 1995).

$$f_{\text{krümm}} = \frac{K_b}{2} \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} - C_0 \right)^2 + \text{weitere Terme} \quad (3.18)$$

(R_1, R_2 : Krümmungsradien der Membran, C_0 : spontane Krümmung)

Die Beziehung für den Biegemodul

$$\frac{1}{K_b} =: \kappa_b = \frac{2 \kappa_T^{\text{mono}}}{h^2} \quad (3.19)$$

wurde von Evans (1974) für eine isotrope Lipid-Doppelschicht mit symmetrischen Monoschichten abgeleitet (κ_T^{mono} : isotherme laterale Kompressibilität einer Monoschicht, h : Abstand der beiden Monoschichten). Die Kopplung der Monoschichten im Bereich der Phasenumwandlung wird hier vernachlässigt. Für Phosphatidylcholine ist diese Wechselwirkung so schwach ausgeprägt, daß beide Monoschichten unabhängig voneinander vom Gel-Zustand zum flüssig-kristallinen Zustand übergehen können (Sillerud und Barnett, 1978). Man setzt deshalb einfach

$$\kappa_T^{\text{mono}} \cong \frac{1}{2} \kappa_T^{\text{area}} \quad (3.20)$$

sowie den Abstand der Monoschichten gleich dem ihrer Zentren $h = D/2$ und erhält

$$\kappa_b = \frac{16 \kappa_T^{\text{area}}}{D^2} \quad (3.21)$$

Damit gelangt man schließlich mit diesem einfachen Modell zu einer Proportionalität von Überschuß-Biegeelastizität und -Wärmekapazität

$$\kappa_b = \kappa_{b,0}(T) + \frac{16 \gamma_{\text{area}}^2 T}{D^2 A} \Delta C_p \quad (3.22)$$

Damit wird vorhergesagt, daß bei einer Phasenumwandlung mit der Wärmekapazität auch die Biegeelastizität ein Maximum annimmt. Dieses Ergebnis wird in Abschnitt 3.3 weitere Verwendung finden.

3.2 Folgerungen für die Druckabhängigkeit der Wärmekapazität

Ausgehend von (3.14), also der Proportionalität von Umwandlungsenthalpie und -volumen für jeden Zustand i

$$\Delta V_i = \gamma_{\text{vol}} \Delta H_i$$

sollen nun hier, einer Idee von Heimburg folgend, Schlüsse auf das thermotrope Verhalten von Lipid-Membranen bei Druckerhöhung gezogen werden. Darum wird die Beziehung (3.14) jetzt etwas anders aufgeschrieben, um deutlich zu machen, daß sie nur bei einem bestimmten Druck p_0 gilt.

$$\Delta V_i^0 = \gamma_{\text{vol}}^0 \Delta H_i^0 \quad (3.23)$$

Für die Überschuß-Enthalpie ΔH bzw. deren Erwartungswert $\langle \Delta H \rangle$ gilt unter isobar-isothenmen Bedingungen

$$\langle \Delta H \rangle = \frac{\sum_i \Omega_i \Delta H_i \exp\left(-\frac{\Delta H_i}{k_B T}\right)}{\sum_i \Omega_i \exp\left(-\frac{\Delta H_i}{k_B T}\right)} \quad (3.24)$$

(Ω_i : Entartung des Zustands i). Neben der Annahme (3.1) wird noch vorausgesetzt, daß die Anzahl der zugänglichen Zustände und deren Entartung für die betrachteten Drücke nicht vom Druck p abhängt, sowie

$$\Delta E_i^p = \Delta E_i^0 \quad (3.25)$$

$$\Delta V_i^p = \Delta V_i^0 \quad (3.26)$$

(E_i : innere Energie des Zustands i).

Bei einer Druckerhöhung um Δp erhält man für die beiden Drücke p_0 und $p = p_0 + \Delta p$

$$\Delta H_i^0 = \Delta E_i^0 + p_0 \Delta V_i^0 \quad (3.27)$$

$$\Delta H_i^p = \Delta E_i^p + (p_0 + \Delta p) \Delta V_i^p \quad (3.28)$$

In Gleichung (3.28) kann man nun (3.25), (3.26) und (3.23) einsetzen und kommt zu

$$\begin{aligned} \Delta H_i^p &= \Delta E_i^0 + p_0 \Delta V_i^0 + \Delta p \gamma_{\text{vol}}^0 \Delta H_i^0 \\ &= \Delta H_i^0 (1 + \Delta p \gamma_{\text{vol}}^0) \end{aligned} \quad (3.29)$$

Dies kann man als eine Entwicklung bis zur linearen Ordnung von ΔH_i^p in p um p_0 interpretieren.

Der Erwartungswert für die Überschußenthalpie bei den Randbedingungen T und p ist also gegeben durch

$$\langle \Delta H \rangle_T^p = (1 + \Delta p \gamma_{\text{vol}}^0) \frac{\sum_i \Omega_i \Delta H_i^0 \exp\left(-(1 + \Delta p \gamma_{\text{vol}}^0) \frac{\Delta H_i}{k_B T}\right)}{\sum_i \Omega_i \exp\left(-(1 + \Delta p \gamma_{\text{vol}}^0) \frac{\Delta H_i}{k_B T}\right)} \quad (3.30)$$

Nun kann man die Temperatur neu skalieren

$$T^* := \frac{T}{1 + \Delta p \gamma_{\text{vol}}^0} \quad (3.31)$$

und (3.30) schreiben als

$$\langle \Delta H \rangle_T^p = (1 + \Delta p \gamma_{\text{vol}}^0) \langle \Delta H \rangle_{T^*}^0 \quad (3.32)$$

Das Ergebnis dieser Betrachtungen ist also, daß der Meßwert der Enthalpie bei dem Druck p und der Temperatur T in erster Näherung gleich dem bei dem Druck p_0 und der Temperatur $T^* = (1 + \Delta p \gamma_{\text{vol}}^0)^{-1} T$ ist. Damit werden Verschiebung und Form der Wärmekapazitätsprofile von Lipid-Membranen bei Druckänderung vorhersagbar.

Ein Vergleich mit experimentellen Ergebnissen wird in Abschnitt 5.3 vorgenommen.

3.3 Kopplung von kalorischen und strukturellen Umwandlungen

Am Ende von Abschnitt 3.1 wurde festgestellt, daß unter den dortigen Annahmen die Elastizität einer Membran im Temperaturbereich der Hauptumwandlung mit der Wärmekapazität ein Maximum annimmt. Hier soll ein davon ausgehender Ansatz von Heimburg geschildert werden, mit dem versucht wird, Zusammenhänge von Ordnungsübergängen der Lipid-Ketten mit strukturellen Umwandlungen von Membranen zu verstehen (Schneider et al., 1999, zur Veröffentlichung eingereicht).

Neben Ordnungsübergängen der Lipid-Ketten können bei Membranen auch Gestaltumwandlungen stattfinden. Diese morphologischen Umwandlungen lassen sich mit Hilfe der elastischen Konstanten der Membran theoretisch verstehen (Seifert und Lipowsky, 1995). Die elastischen Konstanten sind aber im Bereich der Umwandlung nicht unabhängig von der Wärmekapazität der Membran, da sie über die thermodynamischen Fluktuationen mit ihr verknüpft sind, wie in Abschnitt 3.1 gezeigt wurde (Halstenberg et al., 1998; Heimburg, 1998). Darum liegt die Annahme nahe, daß morphologische Umwandlungen von Vesikeln vor allem im Bereich der Schmelzumwandlung der Lipid-Ketten stattfinden. Dies soll nun genauer begründet werden.

Der Einfachheit halber wird ein Zwei-Zustands-Modell angenommen, mit einer planaren und einer sphärischen Membran. Es werden lokal Gebiete auf einem großen Vesikel betrachtet, so daß Randeffekte nicht ins Gewicht fallen. Die Differenz der Gibbsschen freien Enthalpien beider Zustände wird mit $\Delta G(T)$ bezeichnet. $\Delta G(T)$ soll sich aus zwei Termen zusammensetzen

$$\Delta G(T) = \Delta G_{\text{elast}}(T) + \Delta G_{\text{solv}}(T) \quad (3.33)$$

$\Delta G_{\text{elast}}(T)$ ist die freie Enthalpie, die gebraucht wird, um die planare Membran bis zu einer sphärischen Krümmung zu verbiegen. Wenn man alle anderen Wechselwirkungen vernachlässigt, ist für eine symmetrische Membran der planare Zustand thermodynamisch stabil. Der zweite Summand $\Delta G_{\text{solv}}(T)$ steht für die veränderte Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel. Er wird begründet durch die bei vielen Lipid-Systemen experimentell sichtbare, zum Teil starke Abhängigkeit der Hauptumwandlung vom Lösungsmittel. Diese Abhängigkeit röhrt von der Beeinflussung der Elektrostatik (Ionenstärke, pH-Wert) und osmotischen Kräften her. Bei der Krümmung der Membran bzw. der damit einhergehenden Veränderung der Lösungsmittel-Membran-Grenzschicht soll nun freie Enthalpie freiwerden, $\Delta G_{\text{solv}}(T)$ also negativ sein. Wenn – bedingt durch die hohen Fluktuationen – in der Umwandlung ΔG_{elast} genügend klein wird, wird ΔG im wesentlichen von

ΔG_{solv} bestimmt und die Membran krümmt sich.

Mit diesem einfachen Modell kann erklärt werden, daß eine Kopplung von einer Ordnungsumwandlung der Lipid-Ketten mit einer Formumwandlung der Membran zu einer Aufspaltung des Wärmekapazitäts-Maximums führt (vgl. Abschn. 4.1 und 5.5).

Dazu simuliert oder mißt man die Wärmekapazitätsprofile von nur planaren und nur sphärischen Membranen. Bei der Simulation erreicht man die Krümmung dadurch, daß man die Anzahlen der Lipidzustände *gel* und *fluid* in den beiden Hälften der Doppelschicht verschieden setzt. Da der fluide Zustand eine größere molekulare Fläche hat, ergibt sich so eine Krümmung der Membran.¹ Die Wärmekapazitäten erhält man dann durch Monte-Carlo-Simulationen (Metropolis et al., 1953; Heimburg und Biltonen, 1996).

Für die freie Enthalpie einer dieser Membranen gilt dann

$$\begin{aligned} G(T) &= G_0 + G_{\text{solv}} + \Delta H(T) - T\Delta S(T) \\ &= G_0 + G_{\text{solv}} + \int_{T_0}^T \Delta C_p dT' - T \int_{T_0}^T \frac{\Delta C_p}{T'} dT' \end{aligned} \quad (3.34)$$

bzw. für die Differenz zwischen gekrümmter und planarer Membran

$$\begin{aligned} \Delta G(T) &= G_{\text{solv}}^{\text{gekrümmt}} - G_{\text{solv}}^{\text{planar}} \\ &+ \int_{T_0}^T (\Delta C_p^{\text{gekrümmt}} - \Delta C_p^{\text{planar}}) dT' - T \int_{T_0}^T \frac{\Delta C_p^{\text{gekrümmt}} - \Delta C_p^{\text{planar}}}{T'} dT' \end{aligned} \quad (3.35)$$

Die ersten beiden Terme bilden die durch Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel verursachte Differenz ΔG_{solv} , deren Temperaturabhängigkeit im Bereich der Umwandlung als vernachlässigbar klein angesehen wird. Die letzten beiden Glieder geben den Anteil ΔG_{elast} der Krümmung wieder. Mit Gleichung (3.35) läßt sich nun aus simulierten Wärmekapazitätskurven die freie Enthalpie berechnen. In Abbildung 3.1 sind im oberen Bild die freien Enthalpien von gekrümmtem (*curved*) und planarem (*flat*) Zustand aufgetragen. ΔG_{solv} wurde so gewählt, daß

¹Für die in Abbildung 3.1 berechneten Kurven wurde für die gekrümmte Membran auf diese Weise ein mittlerer Krümmungsradius von 60 nm angenommen.

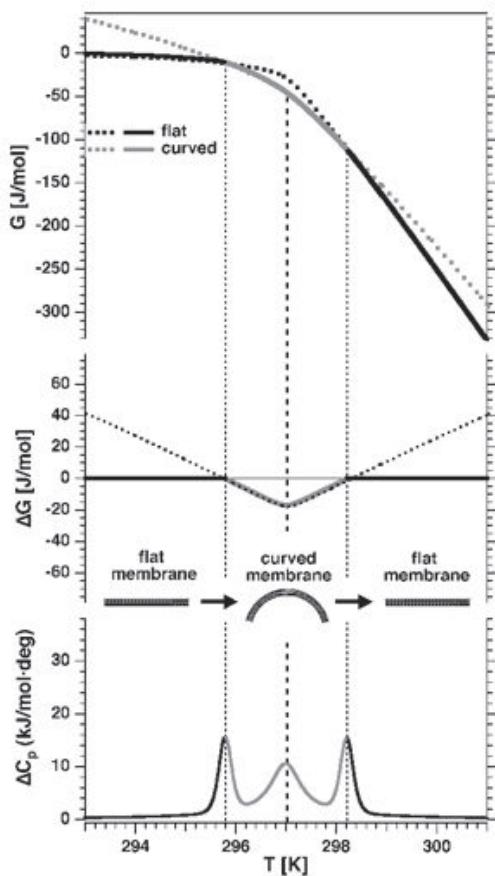


Abbildung 3.1: Freie Enthalpie und Wärmekapazität bei einer Kopplung von Kettenschmelzen und Formumwandlung (Schneider et al., 1999, mit freundlicher Genehmigung). Im oberen Teilbild sind die freien Enthalpien des gekrümmten (*curved*) und planaren (*flat*) Zustands eingezeichnet, wobei die minimale freie Enthalpie durchgezogen ist. Darunter befindet sich die Differenz zwischen gekrümmtem und planarem Zustand $\Delta G(T)$. Im untersten Teil ist das aus der freien Enthalpie errechnete Wärmekapazitäts-Profil dargestellt.

sich die beiden Kurven schneiden. Dann wurde die Differenz ΔG bestimmt, deren Ableitung nach der Temperatur den ganz unten in Abbildung 3.1 dargestellten Wärmekapazitätsverlauf ergibt.

Aus diesen einfachen Betrachtungen folgt, daß bei einer Kopplung der Ordnungsumwandlung der Lipid-Ketten mit einer strukturellen Umwandlung der Vesikel eine Aufspaltung des Maximums der Wärmekapazität zu erwarten ist. Durch die hohen Fluktuationen im Temperaturbereich des Kettenschmelzens kann der Anteil der freien Krümmungsenthalpie ΔG_{elast} so weit vermindert werden, daß die Lösungsmittelwechselwirkungen ΔG_{solv} zu Formumwandlungen führen. Ob die Schmelzumwandlung der Lipid-Ketten jedoch solch ein Ereignis auslöst, hängt von den Eigenschaften des Lösungsmittels ab. Die Diskussion dieser Voraussagen erfolgt in Abschnitt 5.5.

4 Ergebnisse

4.1 Spezifisches Volumen, Wärmekapazität und Viskosität unilamellarer Systeme

Im folgenden sind die Resultate der kalorimetrischen, densitometrischen und viskosimetrischen Messungen für Dispersionen unilamellarer Vesikel dargestellt.

Auswertung der Messungen

Zur Auswertung der Dichte-Messungen an den Lipid-Dispersionen wurde die Dichtedifferenz zum Lösungsmittel in das scheinbare molare Volumen \hat{V} nach Gleichung (3.2) umgerechnet. Daraus wurde die erste Ableitung nach der Temperatur bestimmt (thermischer Volumenexpansionskoeffizient), indem bei dem jeweiligen Datenpunkt des Volumens für ein lokales Datenfenster eine polynomiale Regression zweiter Ordnung durchgeführt wurde. Dieses Datenfenster wurde so lange verkleinert, bis sich die Form der Kurve (Extrema, Höhe, Breite) bis auf ein zunehmendes Rauschen nicht mehr änderte. Die gewählten Datenfenster umfaßten 7 bis 21 Punkte, was je nach gemessenem System etwa 0,1...0,7 K entsprach. Jeder Datenpunkt wurde aus 25 bis 30 Meßwerten bei gleicher Temperatur als Mittelwert ausgerechnet. Zwei Beispiele für gemessene Dichtekurven sind in Abbildung 4.1 angegeben.

Obwohl das Thermometer am Dichtemeßgerät Temperaturdifferenzen auf 0,01 K genau messen konnte, lag die Genauigkeit des Absolutwerts laut Hersteller nur bei etwa 0,2 K. Beim Kalorimeter, das die Temperatur sogar bis auf 0,001 K auflöste, gehörte zur Ausstattung eine Referenz, mit der die Temperaturan-

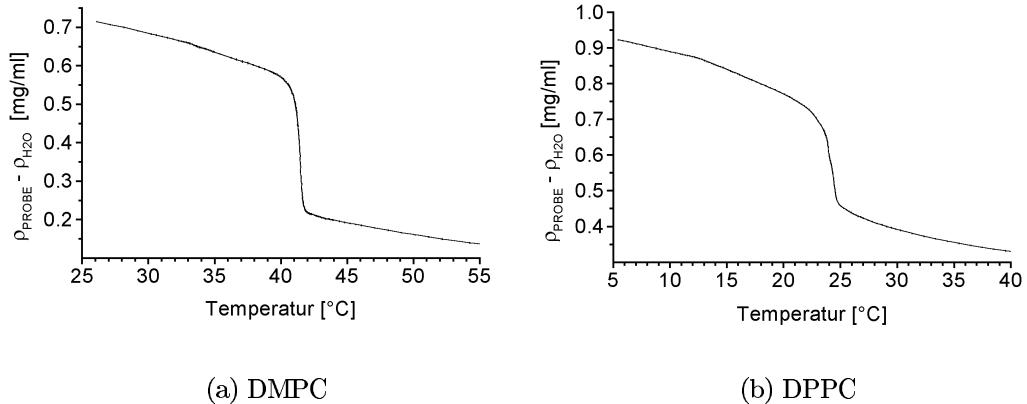


Abbildung 4.1: Typische Meßkurven der Dichte für Dispersionen extrudierter DMPC- und DPPC-Vesikel. Pro Temperatur wurden 30 Meßwerte aufgenommen, deren Mittel hier wiedergegeben ist. Die eingezeichneten Fehlerbalken (einfache Standardabweichung) liegen in der Größenordnung der Liniendicke.

zeige auf 0,1 K genau kalibriert werden konnte. Für alle untersuchten Systeme lagen die Umwandlungstemperaturen aus densitometrischen Messungen um 0,2 K höher als die entsprechenden Punkte in den Wärmekapazitätsprofilen. Da die Übergänge zum Teil sehr scharf waren (Halbwertsbreiten unter 0,1 K), wurde diese Abweichung als systematischer Fehler der Absoluttemperatur gewertet. Die Temperaturen aller Messungen des Dichtemeßgeräts wurden um 0,2 K verringert, um eine einheitliche Bezugstemperatur zu haben. Für die Angabe der Umwandlungstemperaturen sind im folgenden nur die vom Kalorimeter gelieferten Werte berücksichtigt.

Soweit bei den einzelnen Messungen Fehlergrenzen angegeben werden konnten, orientieren sich diese – wenn nichts anderes angegeben ist – an einem Vertrauensintervall für den statistischen Fehler mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %, wobei eine Normalverteilung angenommen wurde. Die Fehlergrenzen wurden aus den Standardabweichungen der Mittelwerte ausgerechnet, die entsprechend dem Stichprobenumfang erhöht wurden (Walcher, 1994, S. 30-33). Diese Erhöhung geschah durch Multiplikation mit einem tabellierten Faktor (Walcher,

1994, S. 395).

Für Umrechnungen in verschiedene Einheiten wurden die in Tabelle 2.3 auf S. 39 angegebenen Molmassen verwendet.

Zusammen dargestellte Messungen von molarer Wärmekapazität, Volumenexpansionskoeffizienten oder Viskosität beziehen sich immer auf dieselbe Probe.

Extrudierte DMPC-Vesikel

In Abbildung 4.2 sind die Verläufe von Volumenexpansionskoeffizienten und molarer Wärmekapazität für extrudierte DMPC-Vesikel (Konzentration 10,0 mg/ml, in bidestilliertem Wasser) dargestellt. Die kalorimetrischen Daten stammen aus einer Messung mit einer Rate von +5 K/h (*Up scan*). Beide Verläufe liegen selbst in den Details der Umwandlung annähernd deckungsgleich übereinander, $\partial\hat{V}/\partial T$ und Δc_p sind also im Bereich der Hauptumwandlung proportional zueinander. Die quantitative Auswertung dieser Proportionalität ist auf S. 62 durchgeführt.

Weiterhin fällt auf, daß sich die Maxima von molarer Wärmekapazität und Volumenexpansionskoeffizienten in zwei Peaks aufspalten. Diese Beobachtung wurde bisher nur in einem Poster für die Jahrestagung der *Biophysical Society* (Jin et al., 1998) und als Ergebnis dieser Arbeit (Heimburg, 1998) veröffentlicht. Deshalb wurde die Reproduzierbarkeit dieses Ergebnisses eingehend untersucht. Bei allen durchgeführten Präparationen konnte die charakteristische Kurvenform aus Abbildung 4.2 bestätigt werden. Lediglich Details schwankten leicht, wie z. B. das Verhältnis der Peakhöhen zueinander. Eine Probe wurde nach dem Extrudieren 25 Stunden bei 42 °C gelagert und danach eine kalorimetrische Messung bei absteigender Temperatur sowie darauf folgende Messungen mit aufsteigender Temperatur durchgeführt (jeweils 5 K/h). Diese zeigten alle eine entsprechende Aufspaltung. Bei einer weiteren Probe wurde die Ausgangsdispersion von multilamellaren Vesikeln 8mal eingefroren und wieder aufgetaut (*freeze-thawing*), ohne daß ein wesentlicher Einfluß auf die Aufspaltung beobachtet wurde. Gleiche Ergebnisse wurden auch mit Proben in bidestilliertem Wasser und in Puffer (5

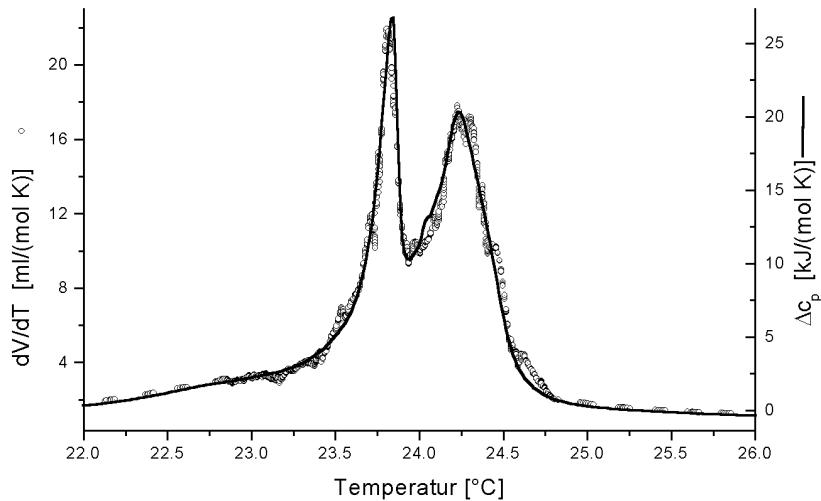


Abbildung 4.2: Volumenexpansionskoeffizient und molare Wärmekapazität im Temperaturbereich der Hauptumwandlung für extrudierte DMPC-Vesikel. In diesem Bild sind für die Ableitung des scheinbaren molaren Volumens nicht wie sonst Mittelwerte aus 25...30 Meßwerten bei jeder Temperatur berücksichtigt, sondern die einzelnen Meßwerte selbst. Dies veranschaulicht die geringe Streuung der Meßwerte.

mmol/l HEPES, 1 mmol/l EDTA, pH = 7,5) erzielt. Auch DMPC von Fluka (Buchs, Schweiz) zeigte ein zweigeteiltes Umwandlungsmaximum. Unterschiedliche Geschwindigkeiten (Drücke) beim Extrudieren bewirkten nur eine ausgeprägtere Aufspaltung bei langsameren Extrudieren (niedrigere Drücke) und eine Veränderung des Verhältnisses der Peakhöhen. Eine Abhängigkeit von der Temperaturänderungsrate zeigte sich im Bereich von 1...5 K/h nicht.

Weitere Systeme unilamellarer Vesikel

Volumetrische und kalorimetrische Messungen wurden auch an weiteren Systemen von unilamellaren Vesikeln durchgeführt. Sowohl bei Dispersionen des anionischen Lipids DMPG bei niedriger Ionenstärke (Abb. 4.3) als auch bei hoher Ionenstärke und bei extrudierten Vesikeln des zwitterionischen Lipids DPPC (Abb. 4.4) lagen

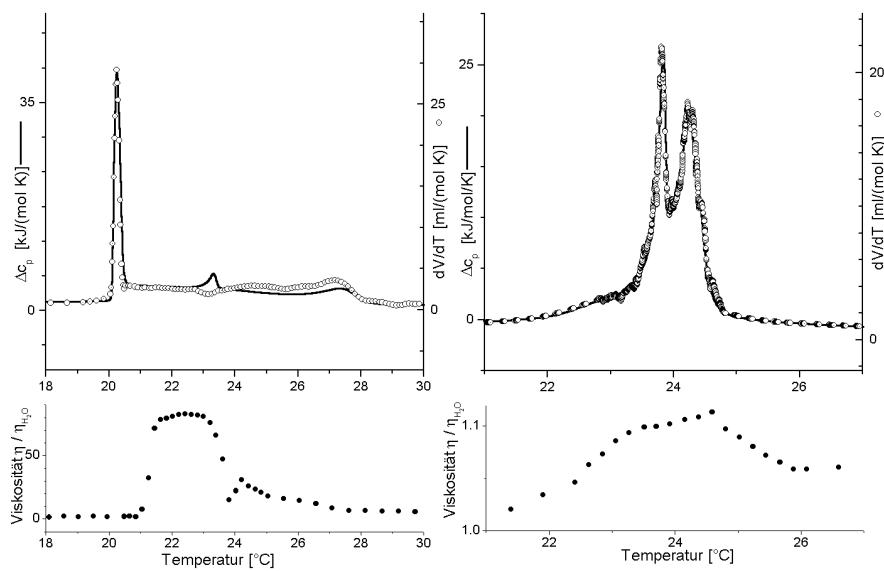


Abbildung 4.3: Molare Wärmekapazität, Volumenexpansionskoeffizient und Viskosität für DMPG- (links) und DMPC-Dispersionen (rechts). DMPG lag in Puffer (5 mmol/l HEPES, 1 mmol/l EDTA, pH = 7,8) bei niedriger Ionenstärke (10 mmol/l NaCl) in einer Konzentration von 6,65 mg/ml vor. Für DMPC wurde ein 10,0 mg/ml MLV-Dispersion in bistelliertem Wasser 21mal extrudiert. Die Wärmekapazitätsmessungen erfolgten mit einer Rate von +5 K/h.

die Kurven für Δc_p und $\partial \hat{V} / \partial T$ in guter Näherung übereinander.

Bei den Profilen für DPPC-Vesikel links in Abb. 4.4 zeigte sich ein abrupter Abfall der molaren Wärmekapazität im oberen Temperaturbereich der Umwandlung, während der Verlauf des Volumenexpansionskoeffizienten annähernd symmetrisch war. Diese Asymmetrie verschwand bei Messungen der Wärmekapazität mit langsameren Raten bis zu +0,1 K/h (Daten nicht gezeigt). Da der isotherme Modus des Dichtemeßgeräts etwa einer Rate von +0,2 K/h entsprach, ist bei einer wirklich quasistatischen Messung eine bessere Übereinstimmung der Kurven zu erwarten. Hier wurden die kalorimetrischen Daten für +5 K/h dargestellt, da Wärmekapazität, Volumenänderung und Viskosität von derselben Probe stammen sollten.

Auf die Ergebnisse der Viskositätsmessungen wird auf S. 64 eingegangen.

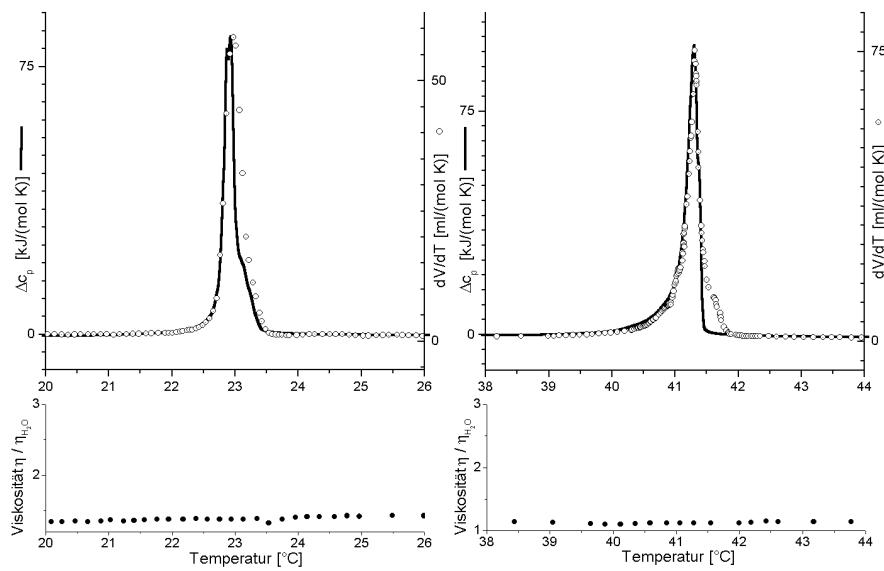


Abbildung 4.4: Molare Wärmekapazität, Volumenexpansionskoeffizient und Viskosität für DMPG- (links) und DPPC-Dispersionen (rechts). DMPG war in Puffer (5 mmol/l HEPES, 1 mmol/l EDTA, pH = 7,8) bei hoher Ionenstärke (200 mmol/l NaCl) in einer Konzentration von 6,65 mg/ml angesetzt worden. Für DPPC wurde eine MLV-Dispersion (10,0 mg/ml) in bistelliertem Wasser 21mal extrudiert. Die Wärmekapazitätsmessungen erfolgten mit einer Rate von +5 K/h.

Auch bei den untersuchten Mischungen zwitterionischer Lipide (DMPC/DPPC in Abb. 4.5, DLPC/DPPC in Abb. 4.6) ist die Proportionalität von $\Delta c_p(T)$ und $\partial \hat{V} / \partial T$ gut zu erkennen.

Das Verhalten multilamellarer Systeme wird im Abschnitt 4.2 mit Hilfe von Druckkalorimetrie untersucht. Die Dichte solcher Dispersionen ist mit Biegeschwinger-Densitometrie nicht zugänglich, da sich multilamellare Vesikel nach einigen zehn Minuten absetzen. Sie verteilen sich dann nicht mehr homogen im Oszillator, so daß quantitative Messungen nicht möglich sind.

Proportionalitäten

Die quantitative Auswertung der oben gezeigten Probensysteme ist für die Hauptumwandlung in Tabelle 4.1 und für die Vorumwandlung in Tabelle 4.2 aufgeführt.

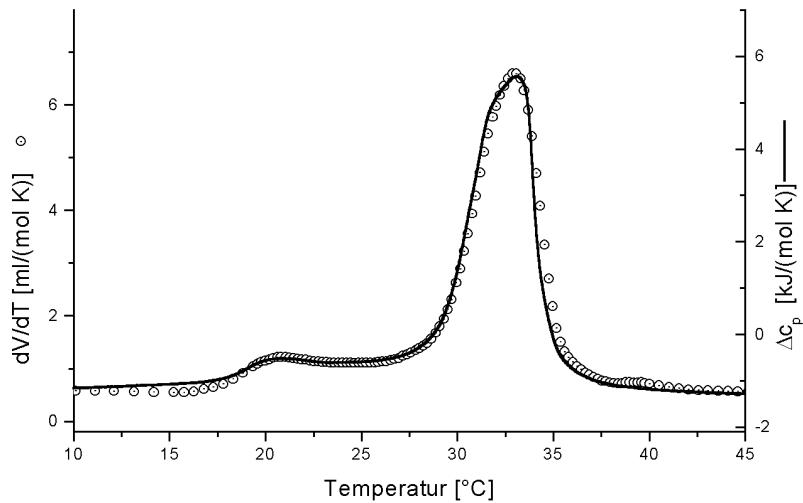


Abbildung 4.5: Volumenexpansionskoeffizient und molare Wärmekapazität einer DMPC/DPPC-Mischung. Aus einer Dispersion multilamellarer Vesikel (10,0 mg/ml, äquimolar in bidestilliertem Wasser, $M_w = 706,0$ g/mol) wurden durch 21maliges Extrudieren unilamellare Vesikel hergestellt. Die Wärmekapazitätsmessungen erfolgten mit einer Rate von +5 K/h.

Bei den Vorumwandlungen der oben aufgeführten Lipid-Systeme war die Reproduzierbarkeit der Kurvenform von Wärmekapazitäten und Volumenexpansionskoeffizienten weniger gesichert. Ein genaues Übereinanderliegen war deshalb nicht zweifelsfrei zu erkennen. Dies spiegelt sich in den deutlich höheren Fehlern der Daten in Tabelle 4.2 wider. ΔH und $\Delta \hat{V}$ wurden jeweils aus den Profilen der molare Wärmekapazität bzw. des Volumenexpansionskoeffizienten durch Integration bestimmt. Dazu wurde zunächst bei Messungen derselben Probe von Δc_p und \hat{V} in gleicher Weise eine gerade Linie in die Nulllinie unter die Umwandlungsmaxima gelegt und diese dann von den gemessenen Profilen abgezogen. Für die Berechnung des Proportionalitätsfaktors γ wurden nicht die Mittelwerte von ΔH und $\Delta \hat{V}$ herangezogen, sondern die Einzelwerte der entsprechenden Proben. Erst danach wurde der jeweilige Mittelwert von γ bestimmt. Der Grund dafür ist die Abhängigkeit der Kurvenformen von der genauen Präparation. Quantitativ

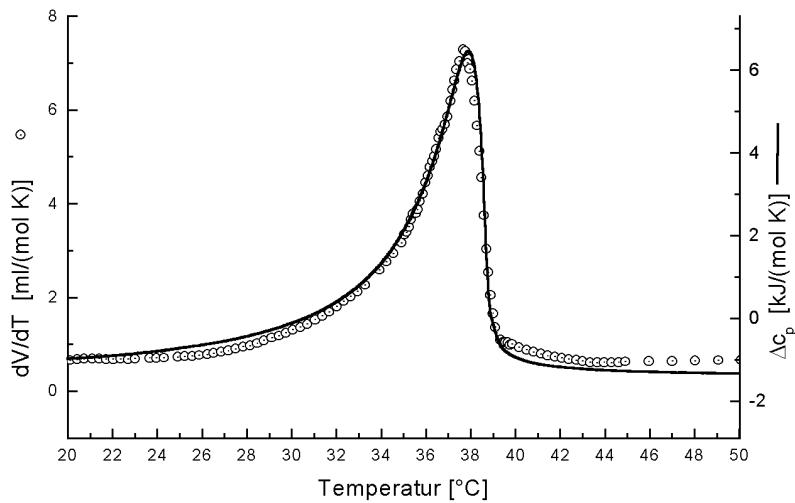


Abbildung 4.6: Molare Wärmekapazität und Volumenexpansionskoeffizient für eine DLPC/DPPC-Mischung. Die Mischung (8,0 mg/ml, Stoffmengenverhältnis 16:84 in bidestilliertem Wasser, 13mal extrudiert, $M_w = 761,1$ g/mol) wurde von Michael Kahle präpariert. Die Wärmekapazitätsmessungen erfolgten mit einer Rate von +5 K/h.

äußert sich dies darin, daß die Fehler der aus den gemittelten Größen bestimmten γ wesentlich höher sind als die der aus Einzelmessungen gemittelten γ , nämlich bei der Hauptumwandlung etwa um den Faktor 3 und bei der Vorumwandlung ungefähr um den Faktor 2. Die Größe der angegebenen statistischen Fehler für die jeweiligen Systeme ist auch bedingt durch die Verfügbarkeit von zum Teil nur wenigen Messungen, so daß die einfachen Standardabweichungen entsprechend erhöht werden mußten (vgl. S. 58).

Viskosität

In den Abbildungen 4.3 und 4.4 sind auch die Viskositätsverläufe für die jeweiligen Lipid-Dispersionen eingezeichnet. Die Viskosität wurde dabei relativ zu der von Wasser gemessen. Referenzwerte für die Viskosität von Wasser finden sich bei Lide und Frederikse (1996, S. 6-8).

System	ΔH_m [kJ/mol]	$\Delta \hat{V}_m$ [10 ⁻³ ml/g]	\hat{T}_m [°C]	γ_m [10 ⁻⁴ ml/J]
DMPC extr.	23,4±3,2	30,7±5,2	23,78±0,07 24,18±0,06	9,01±0,71
DPPC extr.	30,5±3,0	35,2±7,5	41,26±0,25	8,14±0,67
DMPC/DPPC extr.	36,6	45,8	20,91 33,10	8,85
DLPC/DPPC extr.	37,5	39,7	37,89	7,59
DMPG 10 mM NaCl	27,7±5,8	31,6±2,4	20,25±0,12 23,31±0,15 27,35±0,12	7,60±0,61
DMPG 200 mM NaCl	28,3	35,1	22,91	8,27
$\overline{\gamma_m}$				8,52±0,44

Tabelle 4.1: Quantitative Auswertung der kalorimetrischen und volumetrischen Messungen für die Hauptumwandlung. Die DLPC/DPPC-Mischung war von Michael Kahle hergestellt worden (vgl. Abb. 4.6). Soweit genügend Ergebnisse vorlagen, wurde ein Fehler angegeben. Bei der Berechnung der γ_m -Faktoren wurden nicht die Mittelwerte von ΔH_m und $\Delta \hat{V}_m$ verwendet, sondern für die Werte der entsprechenden Proben jeweils γ_m bestimmt und dann gemittelt. In der letzten Zeile ist der Mittelwert über alle Einzelmessungen $\overline{\gamma_m}$ aufgeführt. (extr.: extrudiert, mM: mmol/l)

System	ΔH_p [kJ/mol]	$\Delta \hat{V}_p$ [10 ⁻³ ml/g]	\hat{T}_p [°C]	γ_p [10 ⁻⁴ ml/J]
DMPC extr.	1,06±0,24	1,14±0,76	13,99±0,26	7,5±2,0
DPPC extr.	1,55±0,49	1,15±0,88	33,45±0,46	4,6±2,2
DMPG 10mM NaCl	4,26±0,12	1,37±0,16	11,41±0,07	2,14±0,30
$\overline{\gamma_p}$				4,7±2,9

Tabelle 4.2: Ergebnisse der kalorimetrischen und volumetrischen Messungen für die Vorumwandlung. Für die Berechnung der γ_p -Faktoren wurden nicht die Mittelwerte von ΔH_p und $\Delta \hat{V}_p$ verwendet, sondern für die jeweiligen Proben γ_p bestimmt und dann gemittelt. Schließlich wurde aus allen Einzelmessungen der Mittelwert $\overline{\gamma_p}$ bestimmt. (extr.: extrudiert, mM: mmol/l)

Dispersionen des anionischen Lipids DMPG bei niedriger Ionenstärke zeigen ein stark ausgeprägtes Viskositätsmaximum bis etwa zum 80fachen der Viskosität von Wasser im Bereich der Hauptumwandlung¹ (links in Abb. 4.3). Diese starke Veränderung der Zähigkeit kann selbst mit bloßem Auge beobachtet werden. Bei hoher Ionenstärke hingegen (200 mmol/l NaCl) ist kein Viskositätsmaximum mehr zu erkennen (links in Abb. 4.4).

Extrudierte Vesikel des zwitterionischen DMPC lassen ebenfalls ein Maximum der Viskosität in der Umwandlung erkennen (rechts in Abb. 4.3), wenn auch weit weniger stark ausgeprägt als bei DMPG und niedriger Ionenstärke. Beim gegenüber DMPC nur um zwei CH₂-Gruppen je Kette längeren DPPC ist jedoch keine Veränderung der Viskosität sichtbar.

Immer dann, wenn die molare Wärmekapazität bzw. der Volumenexpansionskoeffizient eine Aufspaltung in der Hauptumwandlung zeigt, wird ein Maximum der Viskosität beobachtet. Dieses Resultat wird mit dem Modell aus Abschnitt 3.3 in Abschnitt 5.5 erklärt.

4.2 Wärmekapazitätsprofile bei verschiedenen Drücken

Berechnung der molaren Wärmekapazitäten

Mit der in Abschnitt 2.3 beschriebenen Druckzelle wurde die Abhängigkeit der Wärmekapazitäten von verschiedenen Lipid-Systemen im Temperaturbereich der Umwandlungen untersucht. Dabei mußte für die Angabe der molaren Wärmekapazität die Stoffmenge der Probe in der Druckkapillare bestimmt werden. Dies geschah durch Vergleich der mit der Druckzelle beobachteten Umwandlungswärme mit der Umwandlungswärme derselben Probe in der normalen Probenzelle des Kalorimeters. Da das effektive Meßvolumen der Probenzelle vom Hersteller des

¹Als „Bereich der Hauptumwandlung“ wird hier Heimburg und Biltonen (1994) folgend der Temperaturbereich von 20 °C bis 28 °C bezeichnet.

Kalorimeters sehr genau bestimmt worden war, konnte dort die molare Umwandlungswärme ausgerechnet werden, womit Rückschlüsse auf die Probenmenge in der Druckzelle möglich waren.

Eine Ermittlung des effektiven Meßvolumens der Druckzelle erwies sich aus zwei Gründen als nicht sinnvoll. Zum einen war die Position der Druckzelle in der Referenzzelle nur eingeschränkt reproduzierbar (vgl. Abschnitt 2.3). Zweitens traten bei Messungen multilamellarer Vesikel durch die Geometrie der Druckzelle bedingte Effekte durch Absetzen auf. Im Gegensatz zur Druckzelle ist bei der Probenzelle das Volumen in den Füllkapillaren über Proben- und Referenzzelle sehr klein (vgl. Abb. 2.4). Sinkt nun Substanz aus den Füllkapillaren in die Zellen ab, so führt dies zu einer vernachlässigbar kleinen Konzentrationserhöhung. Bei der Druckzelle jedoch kann die Konzentration durch das Absinken zusätzlichen Lipids bei multilamellaren Vesikel etwa um einen Faktor 7 zunehmen. Für Dispersionen unilamellarer Vesikel, bei denen kein Absetzen zu beobachten war, wurde eine Abschätzung des effektiven Meßvolumens vorgenommen. Sie führte zu einem Wert von $(13,4 \pm 5,7) \mu\text{l}$, was etwa einem Vierzigstel des Volumens der Kalorimeter-Probenzelle entspricht.

Ergebnisse für verschiedene Systeme

In den folgenden Graphiken sind für Vesikel-Dispersionen verschiedener Lipide die Wärmekapazitätsverläufe in der Umgebung von Haupt- und Vorumwandlung bei verschiedenen Drücken dargestellt. Temperatur- und Wärmekapazitäts-Achsen sind für das gleiche System bei verschiedenen Drücken jeweils gleich skaliert, um einen ersten Vergleich der Kurvenform zu ermöglichen. Auf die Änderung der Wärmekapazitätsprofile mit dem Druck wird in Abschnitt 5.3 detailliert eingegangen werden. Die verwendeten Heizraten betragen stets $+5 \text{ K/h}$.

Die multilamellaren Systeme lieferten einerseits ein starkes Signal wegen ihrer hohen Konzentration, die für unilamellare Vesikel aufgrund der Extrusion nicht eingestellt werden konnte. Andererseits waren ihre Hauptumwandlungen

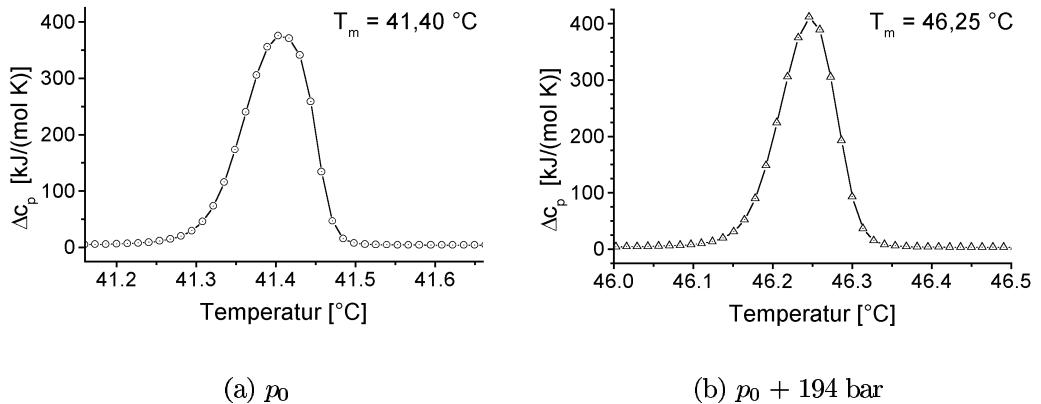


Abbildung 4.7: Druckabhängigkeit des Wärmekapazitätsprofils der Hauptumwandlung von DPPC (MLV). Die Hauptumwandlungen bei Drücken von p_0 (Umgangungsdruck) (a) und $p_0 + 194$ bar (b) sind für multilamellare DPPC-Vesikel (15,0 mg/ml in bidestilliertem Wasser) in gleichem Maßstab abgebildet.

sehr scharf, was eine hohe Anforderung an die Auflösung des Kalorimeters mit Druckzelle stellte. In Abbildung 4.7 ist die Hauptumwandlung für DPPC-Vesikel dargestellt und in Abbildung 4.8 die zugehörige Vorumwandlung. Sowohl bei Haupt- als auch bei Vorumwandlung sind die Wärmekapazitätsprofile im Rahmen der Meßgenauigkeit nahezu deckungsgleich. Bei multilamellaren DMPC-Vesikeln trifft dies für die Vorumwandlung ebenfalls zu (Abb. 4.10). Bei der Hauptumwandlung sind zwar die Breiten der beiden Kurven gleich, das Wärmekapazitätsmaximum bei Umgebungsdruck ist aber niedriger. Da in dem zugehörigem Experiment erst Vor- und Hauptumwandlung bei hohem und dann bei niedrigem Druck gemessen wurden, hatte sich wahrscheinlich nach Messung der Vorumwandlung das effektive Meßvolumen verändert.

Die Signale der Umwandlungen unilamellarer Vesikel waren wesentlich schwächer, da hier wegen der Extrusion nur mit Konzentrationen bis etwa 10 mg/ml gearbeitet werden konnte und keine Erhöhung der Probenmenge durch Absetzen stattfand. Aus diesem Grund waren die Vorumwandlungen in den Wärmekapazitätsprofilen schwer oder gar nicht sichtbar.

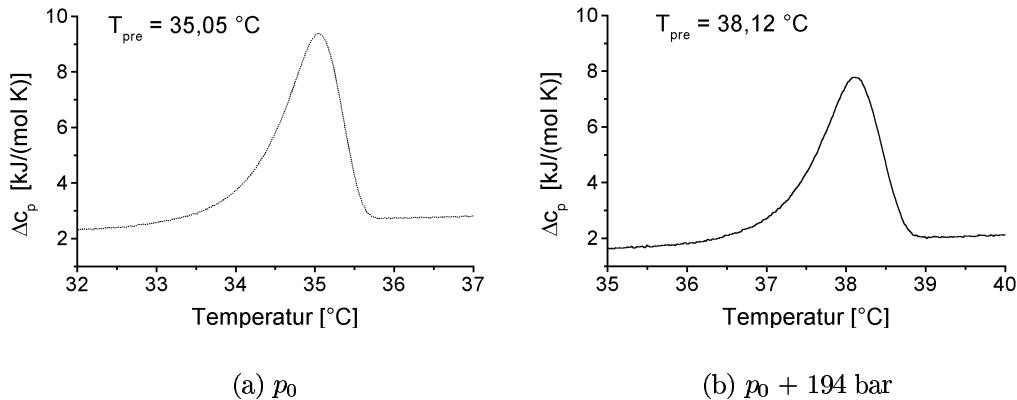


Abbildung 4.8: Druckabhängigkeit des Wärmekapazitätsprofils der Vorumwandlung von DPPC (MLV). Die Vorumwandlungen multilamellarer DPPC-Vesikel (15,0 mg/ml in bidestilliertem Wasser) sind für Drücke von p_0 (Umgebungsdruck) (a) und $p_0 + 194$ bar (b) in gleicher Skalierung dargestellt.

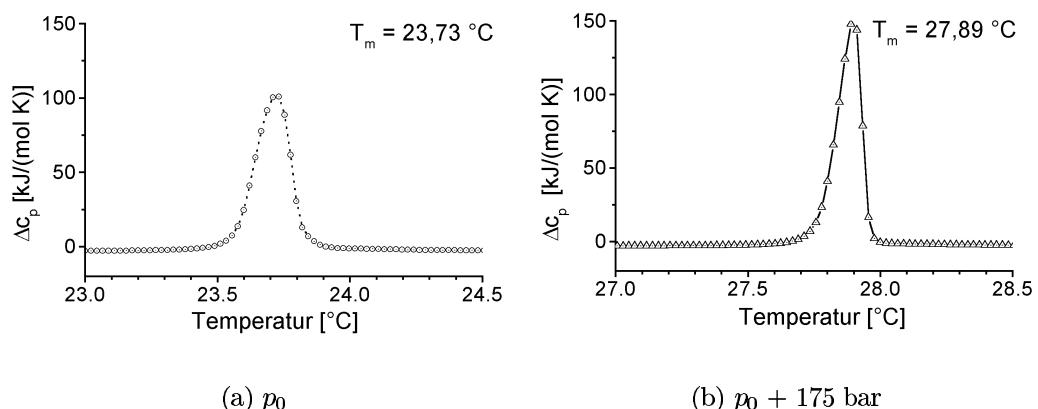


Abbildung 4.9: Druckabhängigkeit des Wärmekapazitätsprofils der Hauptumwandlung von DMPC (MLV). Für multilamellare DMPC-Vesikel (10,0 mg/ml in Puffer: 5 mmol/l HEPES, 1 mmol/l EDTA, pH = 7,5) sind die Hauptumwandlungen bei Umgebungsdruck p_0 (a) und bei $p_0 + 175$ bar (b) in gleich skalierten Koordinatensystemen dargestellt.

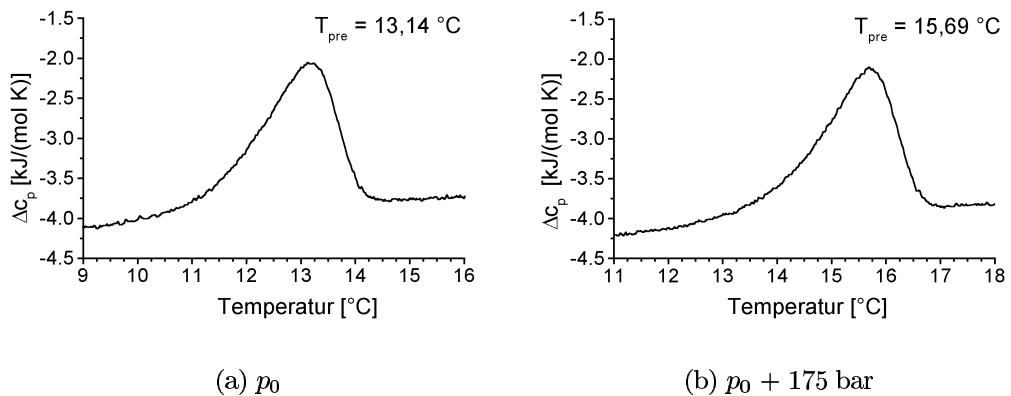


Abbildung 4.10: Druckabhängigkeit des Wärmekapazitätsprofils der Vorumwandlung von DMPC (MLV). Die Vorumwandlungen multilamellarer DMPC-Vesikel (10,0 mg/ml in Puffer: 5 mmol/l HEPES, 1mmol/l EDTA, pH = 7,5) sind bei Umgebungsdruck p_0 (a) und bei $p_0 + 175$ bar (b) in gleicher Skalierung dargestellt.

Die Aufspaltung der Hauptumwandlung von extrudierten DMPC-Vesikeln konnte trotz Verwendung der Druckzelle und dadurch verschlechterter Meßbedingungen reproduziert werden (Abb. 4.11). Auch hier waren die Kurven bei Umgebungsdruck und bei um 175 bar erhöhtem Druck nahezu deckungsgleich. Ebenso ähnlich fielen die Profile für extrudierte DPPC-Vesikel aus, die in Abbildung 4.12 dargestellt sind.

Schließlich wurde auch eine Dispersion extrudierter Vesikel einer DMPC-/DPPC-Mischung (Stoffmengenverhältnis 1:1) untersucht (Abb. 4.13). Hier kam man bei einer Höhe der Umwandlung von etwa 6 kJ/(mol K) in die Nähe der Auflösung des Kalorimeters mit Druckzelle. Trotz der verrauschten Kurven ist aber die große Ähnlichkeit in Form und Höhe zu erkennen. Das in Abbildung 4.5 gemessene Maximum bei etwa 21 °C kann jedoch nur andeutungsweise wiedergefunden werden.

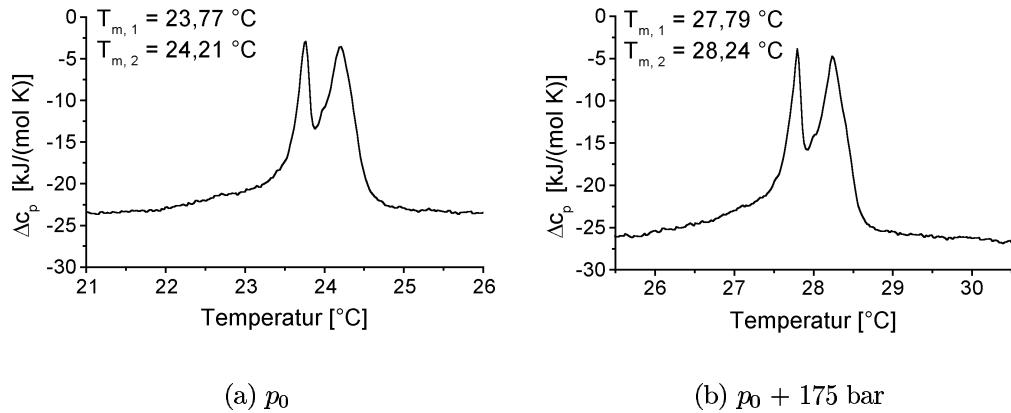


Abbildung 4.11: Druckabhängigkeit des Wärmekapazitätsprofils der Hauptumwandlung von DMPC (LUV). Die Hauptumwandlungen bei verschiedenen Drücken sind für extrudierte DMPC-Vesikel (10,0 mg/ml in bidestilliertem Wasser) in (a) und (b) in gleichem Maßstab abgebildet (p_0 : Umgebungsdruck).

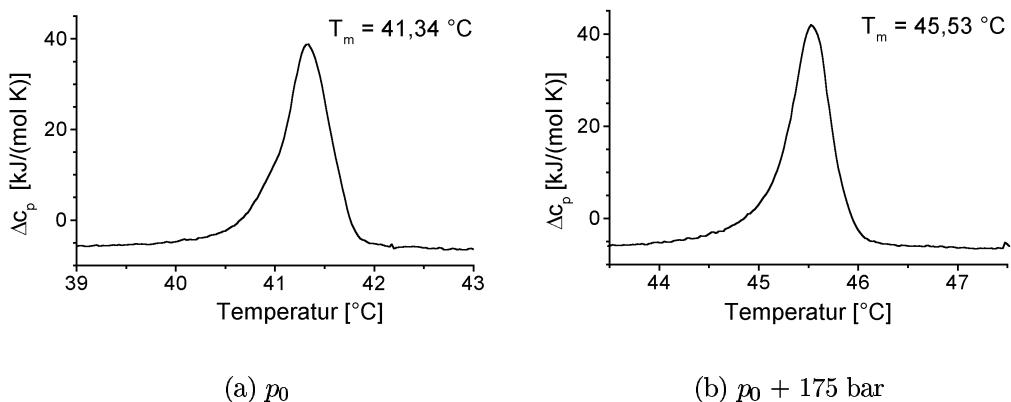


Abbildung 4.12: Druckabhängigkeit des Wärmekapazitätsprofils der Hauptumwandlung von DPPC (LUV). Für extrudierte DPPC-Vesikel (10,0 mg/ml in bidestilliertem Wasser) sind mit gleicher Skalierung die Hauptumwandlungen bei den Drücken p_0 (a) und $p_0 + 175$ bar (b) abgebildet (p_0 : Umgebungsdruck).

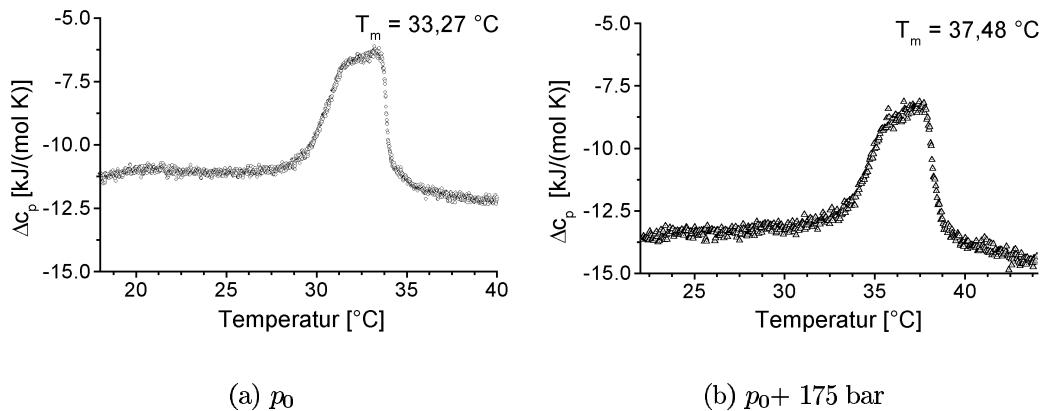


Abbildung 4.13: Druckabhängigkeit des Wärmekapazitätsprofils einer DMPC/DPPC-Mischung (LUV). Der Verlauf der molaren Wärmekapazität ist für extrudierte Vesikel einer DMPC/DPPC-Mischung (Stoffmengenverhältnis 1:1, 10,0 mg/ml in bidestilliertem Wasser, $M_w = 706,0$ g/mol) beim Umgebungsdruck p_0 und beim Druck $p_0 + 175$ bar in gleich skalierten Achsensystemen dargestellt.

Vergleich der Wärmen

Unter der Annahme, daß sich bei Druckerhöhung die Umwandlungs-Enthalpie ΔH nur um einen Term für die Volumenarbeit ändert, kann man versuchen, aus den gemessenen Kurven das Umwandlungs-Volumen ΔV und dann die Poportionalitätskonstante bei Umgebungsdruck γ_{vol}^0 zu berechnen.

$$\Delta H^p = \Delta H^0 + \Delta p \Delta V \quad (4.1)$$

$$\Rightarrow \Delta V = \frac{\Delta H^p - \Delta H^0}{\Delta p} \quad (4.2)$$

$$\Rightarrow \gamma_{\text{vol}}^0 = \frac{\Delta H^p - \Delta H^0}{\Delta p \Delta H^0} \quad (4.3)$$

Wie man in Gleichung (4.3) aber sieht, muß dazu die Differenz der beiden Umwandlungsenthalpien berechnet werden, die sich relativ nur sehr wenig unterscheiden und zudem durch die Festlegung der Nulllinie im Wärmekapazitätsprofil für die Integration mit einer hohen Unsicherheit behaftet sind. Als Beispiel ist diese Auswertung für die Hauptumwandlung multilamellarer DMPC-Vesikel

Δp [10 ⁵ Pa]	ΔH_m^0 [kJ/mol]	ΔH_m^p [kJ/mol]	$\Delta H_m^p - \Delta H_m^0$ [J/mol]	ΔV_m [10 ⁻³ ml/g]	$\gamma_{\text{vol},m}^0$ [10 ⁻⁴ ml/J]
175	18,5±2,5	18,7±2,5	216±112	18,2±9,5	6,7±4,1

Tabelle 4.3: Vergleich der Hauptumwandlungs-Wärmen bei verschiedenen Drücken p_0 und $p = p_0 + \Delta p$ für multilamellare DMPC-Vesikel. ΔV_m und γ_m ergeben sich als Mittel über die aus den Einzelmessungen berechneten Werte.

durchgeführt worden (Tab. 4.3), die für densitometrische Messungen aufgrund des Absetz-Effektes nicht zugänglich waren. Man erhält eine Abschätzung für die gesuchten Größen, die im Vergleich mit den Daten aus Abschnitt 4.1 plausibel erscheint.

Auswertung der Temperaturverschiebung

Vielversprechender für die Bestimmung der Proportionalitätskonstanten ist die Berücksichtigung der druckabhängigen Temperaturverschiebungen der Umwandlungen, die sehr genau bestimmt werden können. Dabei wird von Gleichung (3.31) Gebrauch gemacht, die für die Annahme einer Proportionalität von Umwandlungsenthalpie und -volumen hergeleitet wurde (vgl. Abschn. 3.2).

$$T_{\text{Umwandlung}}^p = T_{\text{Umwandlung}}^0 (1 + \Delta p \gamma_{\text{vol}}^0) \quad (4.4)$$

Daraus folgt sofort

$$\gamma_{\text{vol}}^0 = \frac{T_{\text{Umwandlung}}^p - T_{\text{Umwandlung}}^0}{T_{\text{Umwandlung}}^0 \Delta p} \quad (4.5)$$

Mit dieser Beziehung wurden die Proportionalitätskonstanten γ für die entsprechenden Temperaturverschiebungen ausgerechnet (Tab. 4.4). Insgesamt zeigt sich sowohl bei Haupt- als auch Vorumwandlung ein deutlich geringerer statistischer Fehler als bei der Bestimmung aus den Umwandlungswärmen bei verschiedenen Drücken. Gleichzeitig stimmen die so berechneten Werte gut mit den aus den Dichtemessungen bestimmten Faktoren überein (vgl. Tab. 4.1). Dabei gibt es ein leichtes Indiz dafür, daß die hier ausgerechneten γ -Faktoren systematisch etwas niedriger liegen als die aus Abschnitt 4.1.

System	Δp [10^5 Pa]	\hat{T}_m^0 [°C]	\hat{T}_m^p [°C]	\hat{T}_{pre}^0 [°C]	\hat{T}_{pre}^p [°C]	$\gamma_{vol,m}^0$ [$10^{-4} \frac{ml}{J}$]	$\gamma_{vol,p}^0$ [$10^{-4} \frac{ml}{J}$]
DMPC MLV	173	23,80	27,52			7,241	
DMPC MLV	175	23,66	27,88			8,124	
DMPC MLV	175	23,73	27,89	13,14	15,69	8,007	5,09
DMPC MLV	173	23,81	27,57	12,47	14,54	7,319	4,19
DMPC MLV	175	23,78	27,96	13,55	15,82	8,044	4,52
DMPC extr.	175	23,77	27,79	14,1	16,0	7,737	3,78
		24,21	28,24			7,744	
DPPC MLV	140	41,40	44,78	34,04	36,95	7,675	6,77
DPPC MLV	194	41,40	46,25	35,05	38,12	7,948	5,13
DPPC extr.	174	41,34	45,53	33,60	36,1	7,657	4,68
DMPC/ DPPC (1:1) extr.	175	33,27	37,48			7,851	
						$\bar{\gamma}_{vol}^0$	$7,76 \pm 0,22$
							$4,9 \pm 1,0$

Tabelle 4.4: Temperaturverschiebung von Vor- und Hauptumwandlung bei Druckerhöhung für verschiedene Lipid-Systeme. Für die untersuchten Dispersions uni- und multilamellarer Lipid-Vesikel sind die Umwandlungstemperaturen von Vor- und Hauptumwandlung (\hat{T}_m bzw. \hat{T}_{pre}) bei verschiedenen Drücken und die daraus berechneten Proportionalitätskonstanten γ_{vol}^0 eingetragen (zur Fehlerberechnung s. S. 58, extr.: extrudiert).

Inwieweit die gemachten Voraussetzungen für dieses Auswertungsverfahren gerechtfertigt sind, ist in Abschnitt 5.3 Gegenstand der Diskussion.

4.3 Oberflächendruck-Fläche-Isothermen der Monofilme

Isothermen

Von auf eine Wasseroberfläche aufgebrachten Monofilmen aus den Lipiden DMPC und DPPC wurden mit einer Langmuir-Filmwaage Isothermen des Oberflächendrucks Π in Abhängigkeit von der Fläche pro Molekül A vermessen. Um sicherzugehen, daß bei diesen dynamischen Messungen keine Abhängigkeit von der Kompressionsrate vorlag, wurden für DPPC Isothermen bei Kompressionsraten zwischen 2 und $14 \text{ \AA}^2 \text{ Molek\"ul}^{-1} \text{ min}^{-1}$ aufgenommen und verglichen. Dabei war kein Einfluß auf die Meßkurven zu beobachten. Es wurden dann bei Raten von ungefähr $2 \text{ \AA}^2 \text{ Molek\"ul}^{-1} \text{ min}^{-1}$ pro Temperatur und Lipid-System jeweils fünf verschiedene Monofilme der gleichen Probe untersucht, aus denen sich die hier dargestellten Kurven als Mittel ergaben.

In Abbildung 4.14 sind die entsprechenden Isothermen für DMPC-Monofilme dargestellt. Von der mit der Filmwaage kleinsten erreichbaren Temperatur von $5,1 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zu $15,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ist der Beginn des Übergangs von flüssig-expandiert (LE: *liquid-expanded*) nach flüssig-kondensiert (LC: *liquid-condensed*) als Knick deutlich sichtbar. (vgl. Abb. 1.4). Das Ende des LE/LC-Koexistenzbereichs ist mit bloßem Auge weniger klar erkennbar, kann aber mit einem geeigneten Algorithmus bestimmt werden, der auf S. 76 beschrieben ist. Bei $20,0 \text{ }^\circ\text{C}$ sind LE-LC-Umwandlung und der entsprechende Koexistenzbereich gerade noch auszumachen, bei $24,0 \text{ }^\circ\text{C}$ und darüber ist ein Übergang nicht mehr feststellbar.

Ähnliche Charakteristika weisen die Isothermen für DPPC auf (Abb. 4.15). Auch hier entsprechen die dargestellten Kurven jeweils dem Mittel aus fünf gemessenen Isothermen. Allerdings ist hier bei $10,0 \text{ }^\circ\text{C}$ noch gar keine Umwandlung zu erkennen. Erst von $15,0 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $35,0 \text{ }^\circ\text{C}$ sind der Beginn der LE-LC-Umwandlung und der LE/LC-Koexistenzbereich gut zu beobachten. Die Isotherme für $38,5 \text{ }^\circ\text{C}$ stammt aus einer späteren Meßreihe. Bei ihr ist die Umwandlung nur sehr schwach

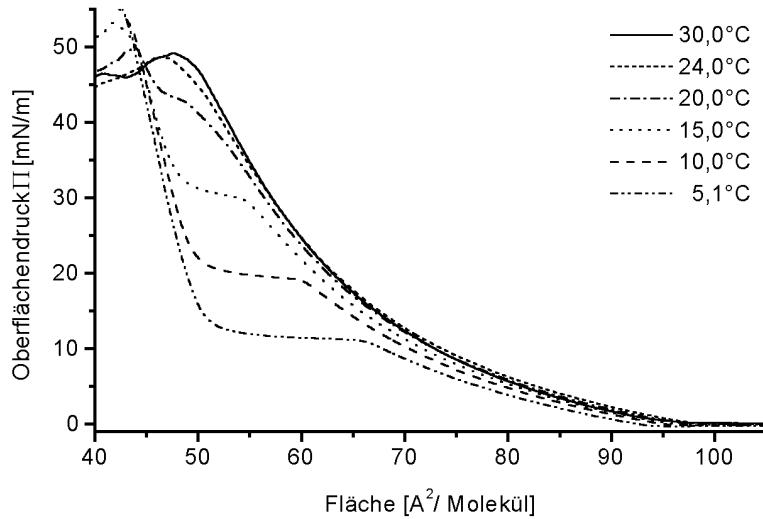


Abbildung 4.14: Druck-Fläche-Isothermen für DMPC-Monofilme. Für verschiedene Temperaturen wurden Isothermen für DMPC-Monofilme (Molekülanzahl: $(6,552 \pm 0,027) \cdot 10^{16}$) mit einer Kompressionsrate von $2,5 \text{ Å}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$ vermessen. Die Kurven sind aus jeweils fünf Isothermen gemittelt. Mit zunehmender Temperatur verschiebt sich der Beginn des LE-LC-Übergangs zu höheren Drücken Π_{EC} und der LE/LC-Koexistenzbereich wird schmäler (vgl. Abb. 1.4).

ausgeprägt, aber immer noch sichtbar.

Sowohl bei DMPC- als auch bei DPPC-Monofilmen liegen die Äste ober- und unterhalb des LE/LC-Koexistenzbereichs näherungsweise übereinander. Lediglich der Koexistenzbereich selbst wird mit zunehmender Temperatur immer schmäler, bis schließlich – zumindest bei DMPC – keine Umwandlung mehr zu beobachten ist. Für DPPC konnte die entsprechende Beobachtung (s. z. B. Phillips und Chapman, 1968) nicht überprüft werden, da keine Isothermen über $38,5^\circ\text{C}$ aufgenommen werden konnten.

Bestimmung der Phasengrenzen

Zur quantitativen Auswertung wurden nun die Oberflächendrücke Π_{EC} am Beginn der LE-LC-Umwandlung, die zugehörige molekulare Fläche A_{EC} und die

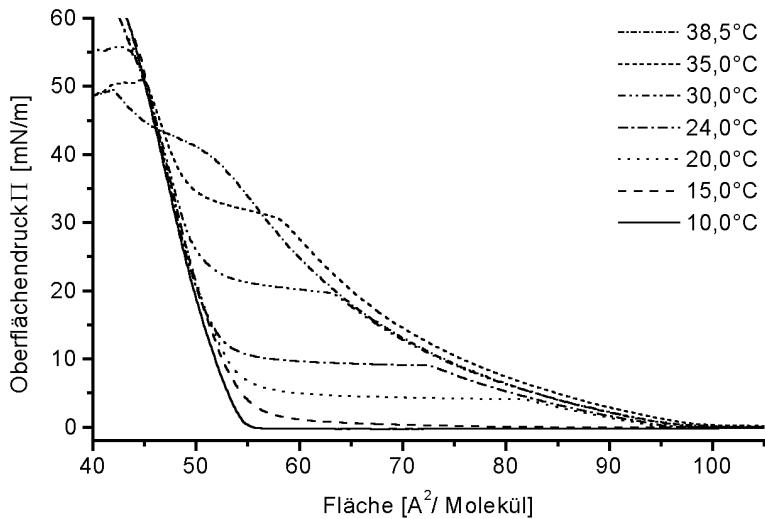


Abbildung 4.15: Druck-Fläche-Isothermen für DPPC-Monofilme. Von DPPC-Monofilmen (Molekülanzahl $(6,830 \pm 0,037) \cdot 10^{16}$ Moleküle) wurden bei Kompressionsraten von $2,2 \text{ } \text{Å}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$ von $10 \text{ } ^\circ\text{C}$ bis $35 \text{ } ^\circ\text{C}$ Druck-Fläche-Isothermen aufgenommen. Die Kurve für $38,5 \text{ } ^\circ\text{C}$ stammt aus einer späteren Messung ($6,553 \cdot 10^{16}$ Moleküle, $2,5 \text{ } \text{Å}^2 \text{ Molekül}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Die Druck-Profile ergaben sich als Mittelwert aus jeweils fünf Isothermen.

Flächendifferenz zwischen LE- und LC-Zustand ΔA_{EC} bestimmt (vgl. Abb. 1.4). Die Bestimmung des Anfangs und des Endes der LE-LC-Umwandlung geschah mit dem Programm FilmFit 3.061, das freundlicherweise von Howard L. Brockman vom *Hormel Institute* der *University of Minnesota* (Austin/MN, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Darin wurde der Beginn einer Umwandlung dann festgestellt, wenn die dritte Ableitung der Isotherme $\Pi(A)$ bei abnehmender Fläche einen Vorzeichenwechsel von positiv nach negativ hatte und die zweite Ableitung kleiner als eine zu bestimmende Schranke war. Bei Feststellung des Endes einer Umwandlung galt entsprechend umgekehrt, daß die dritte Ableitung einen Vorzeichenwechsel von negativ nach positiv hatte und die zweite Ableitung größer als der negative Wert der Schranke war (Brockman et al., 1980). Die Schranke wurde einmal entsprechend dem Signal-Rausch-Verhältnis der Messungen angepaßt und

dann nicht mehr verändert.

Mit diesem Algorithmus wurden für alle Einzelmessungen die gesuchten Werte bestimmt und dann für die jeweiligen Systeme gemittelt (Tab. 4.5). Als Maß für den Fehler ist hier die einfache Standardabweichung angegeben.

Die weitere Auswertung, die die ermittelten Größen in Beziehung zu den Eigenschaften von Lipid-Doppelschichten setzt, findet sich in Abschnitt 5.4.

4.4 ESR-Spektroskopie mit Spin-Labeln

ESR-Spektren

Für Temperaturen von -5 °C bis 40 °C wurden ESR-Spektren von multilamellaren DMPC-Vesikeln aufgenommen, wobei zwei Spin-Label eingesetzt wurden: 5-PC-SL und 13-DMPC-SL (vgl. S. 33). Die ESR-Spektren selbst stellen die erste Ableitung der Absorptionsspektren dar, so daß das zweifache Integral der ESR-Spektren über das Magnetfeld die Gesamt-Absorption ergibt. Da diese nur von der Probenmenge abhängt, wurden die Rohdaten der ESR-Spektren normiert, indem sie durch das zugehörige Doppelintegral dividiert wurden. Beispiele für solche normierten ESR-Spektren sind in den Abbildungen 4.16 und 4.17 aufgeführt. Dabei wurde jeweils bei der niedrigsten und höchsten erreichten Temperatur sowie vor und nach den Umwandlungstemperaturen ein Spektrum ausgewählt.

Änderung der Kettenbeweglichkeit

Die Höhen der Extrema aller ESR-Spektren wurden nun bestimmt und gegen die Temperatur aufgetragen. Qualitativ zeigten alle diese Auftragungen das gleiche Verhalten.

In den Abbildungen 4.18 und 4.19 kann jeweils der Temperaturverlauf der Höhe des zweiten Maximums verfolgt werden. Dieses Extremum wurde ausgewählt, da aufgrund seiner starken Ausprägung gegenüber den anderen Extrema bei allen Temperaturen (vgl. Abb. 4.16 und 4.17) die Höhenänderung hier am

\hat{T} [°C]	Π_{EC} [mN/m]	A_{EC} [Å ² /Molekül]	ΔA_{EC} [Å ² /Molekül]
5,1	10,87±0,22	66,26±0,32	16,36±0,44
10,0	18,94±0,15	60,23±0,28	11,32±0,30
15,0	29,69±0,12	54,53±0,24	7,34±0,37
20,0	42,70±0,20	48,82±0,11	3,02±0,17

(a) DMPC

\hat{T} [°C]	Π_{EC} [mN/m]	A_{EC} [Å ² /Molekül]	ΔA_{EC} [Å ² /Molekül]
20,0	4,08±0,17	81,73±0,32	28,68±0,35
24,0	9,55±0,11	74,25±0,28	17,4±1,2
30,0	19,56±0,16	63,29±0,18	14,18±0,22
35,0	30,36±0,09	58,18±0,11	10,03±0,15
38,5	38,98±0,29	52,08±0,17	7,46±0,42

(b) DPPC

Tabelle 4.5: Auswertung der Monofilm-Isothermen. Für Monofilme von DMPC (a) und DPPC (b) sind für verschiedene Isothermen jeweils der Oberflächendruck Π_{EC} des Beginns des Übergangs von flüssig-expandiert (LE: *liquid-expanded*) nach flüssig-kondensiert (LC: *liquid-condensed*), die zugehörige molekulare Fläche A_{EC} und die Flächendifferenz ΔA_{EC} zwischen LE- und LC-Zustand aufgeführt (vgl. Abb. 1.4). Es wurden aus je fünf Isothermen die entsprechenden Daten bestimmt und dann Mittelwerte gebildet. Als Fehler ist die einfache Standardabweichung angegeben.

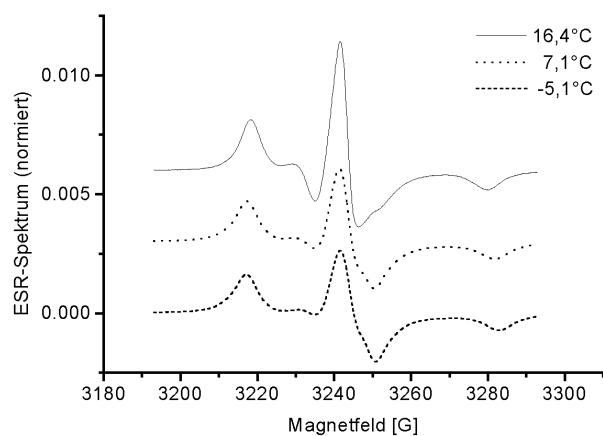
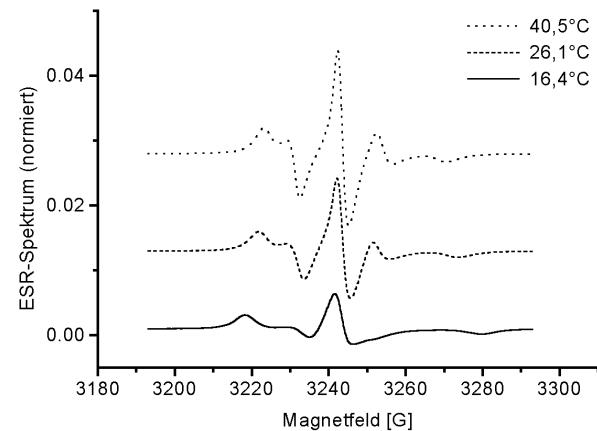


Abbildung 4.16: ESR-Spektren für multilamellare DMPC-Vesikel mit Spin-Label 5-PC-SL. Als Beispiel für die aufgenommenen Spektren sind hier Verläufe bei verschiedenen Temperaturen vor der Vorumwandlung, zwischen Vor- und Hauptumwandlung und nach der Hauptumwandlung aufgeführt. Die Änderung der Skalierung wird an dem Spektrum für 16,4 °C deutlich, das in beiden Bildern eingezeichnet ist. Die Nulllinien der Spektren sind zur besseren Übersichtlichkeit um einen willkürlichen Wert nach oben verschoben.

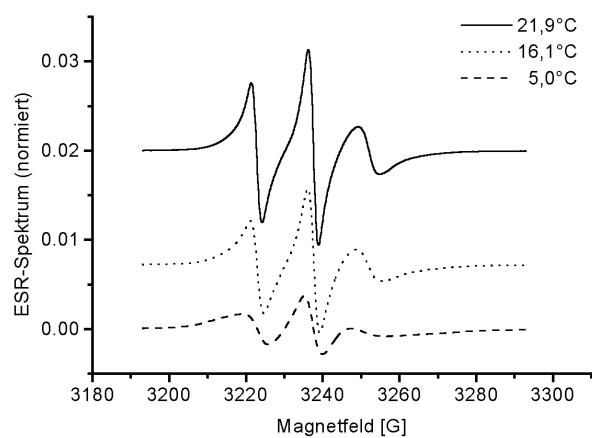
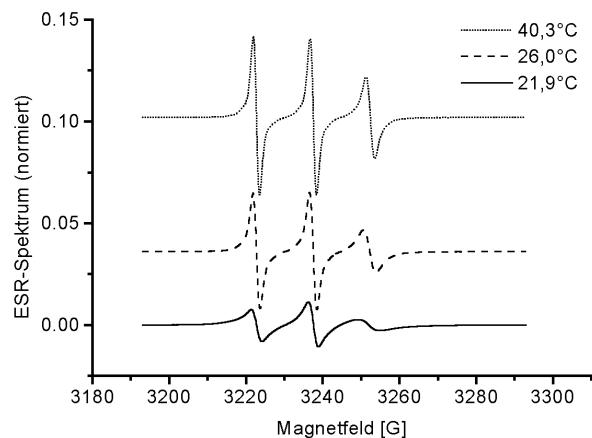


Abbildung 4.17: ESR-Spektren für multilamellare DMPC-Vesikel mit Spin-Label 13-DMPC-SL. Für Temperaturen unterhalb und oberhalb von Vor- und Hauptumwandlung sind Beispiele der gemessenen ESR-Spektren eingetragen. Um die unterschiedliche Skalierung deutlich zu machen, ist in beiden Bildern das Spektrum für 21,9 °C eingetragen. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Nulllinien der Spektren vertikal um einen willkürlichen Wert verschoben.

deutlichsten ausfiel.

Bei Verwendung des Spin-Labels 5-PC-SL sind bei etwa 10 °C und 24 °C starke Zunahmen der Peakhöhen zu beobachten (Abb. 4.18). Diese Temperaturen liegen jeweils im Bereich der Vor- bzw. Hauptumwandlung einer DMPC-Membran.

Der Höhenverlauf der Probe mit dem Spin-Label 13-DMPC-SL zeigt nur bei 24 °C eine außergewöhnliche Veränderung. Im Bereich von 5 °C bis 15 °C ist hingegen kein besonderes Ereignis sichtbar.

Insgesamt wird also im Temperaturbereich der Hauptumwandlung eine starke Zunahme der Kettenbeweglichkeit verzeichnet. Ebenso nimmt auch die Beweglichkeit der Ketten in der Vorumwandlung zu, wie die Experimente mit dem Label 5-PC-SL zeigen. Mögliche Gründe dafür, daß diese Beobachtung bei Verwendung des Spin-Labels 13-DMPC-SL nicht gemacht wurde, werden in Abschnitt 5.1 erörtert.

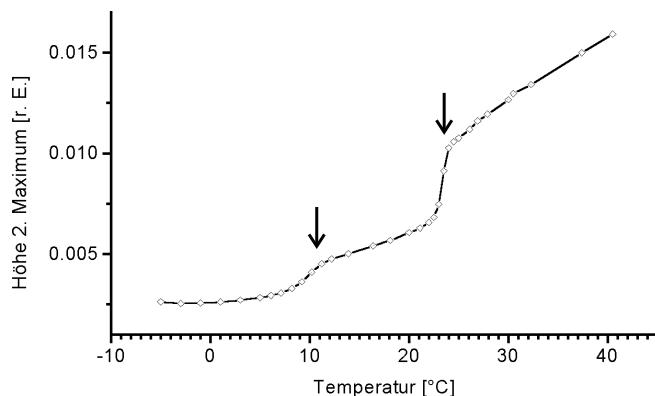


Abbildung 4.18: Temperaturabhängigkeit der Höhe des ESR-Spektrums für multilamellare DMPC-Vesikel mit Spin-Label 5-PC-SL. Die Höhe des zweiten Maximums des (normierten) ESR-Spektrums ist als Funktion der Temperatur dargestellt. Deutlich sind starke Veränderungen im Bereich von Vor- und Hauptumwandlung auszumachen (Pfeile). (r. E.: relative Einheiten)

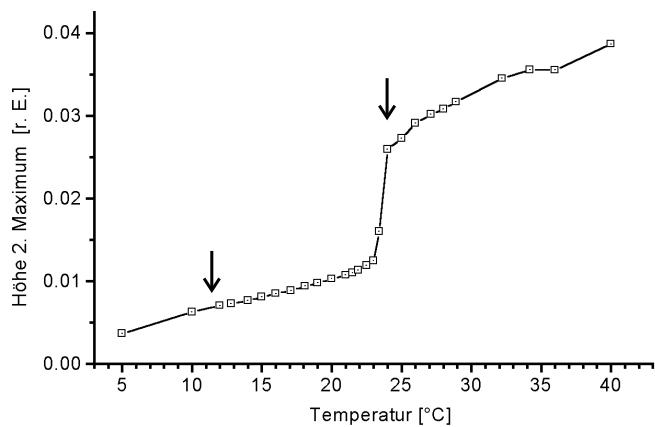


Abbildung 4.19: Temperaturabhängigkeit der Höhe des ESR-Spektrums für multilamellare DMPC-Vesikel mit Spin-Label 13-DMPC-SL. Für unterschiedliche Temperaturen ist die Höhe des zweiten Maximums vom (normierten) ESR-Spektrums aufgetragen. Im Gegensatz zu Abbildung 4.18 ist eine auffallende Veränderung der Höhe nur bei der Hauptumwandlungs-Temperatur zu beobachten. Vor- und Hauptumwandlung sind durch Pfeile markiert. (r. E.: relative Einheiten)

5 Diskussion

5.1 Kettenschmelzen in Vor- und Hauptumwandlung

In Abschnitt 4.4 wurde mit Spin-Label-ESR die Kettenbeweglichkeit in Abhängigkeit von der Temperatur für multilamellare DMPC- und DPPC-Vesikel untersucht. Es wurde festgestellt, daß sowohl Haupt- als auch Vorumwandlung mit einer deutlichen Erhöhung der Kettenbeweglichkeit einhergehen. Für die Vorumwandlung konnte dieser Effekt allerdings nur mit dem Spin-Label 5-PC-SL gemessen werden.

Daß bei der Hauptumwandlung einer Lipid-Membran vom Gel-Zustand in den flüssig-kristallinen Zustand ($P_{\beta'}$ \rightarrow L_{α}) ein Übergang von einem stark geordneten Zustand der Lipid-Ketten zu einem Zustand geringer Ordnung mit vielen gleichberechtigten Konformeren stattfindet, ist allgemein anerkannt (siehe z. B. Marsh, 1991; Laggner und Kriechbaum, 1991; Sackmann, 1995b). Für die Vorumwandlung hingegen finden sich in der Literatur verschiedene Ergebnisse (Laggner und Kriechbaum, 1991; Rappolt und Rapp, 1996). Ähnliche Resultate wie die hier vorgestellten sind mit verschiedenen Spin-Labels für DMPC (Heimburg, 1989; Heimburg et al., 1992) und DPPC (Tsuchida und Hatta, 1988) dokumentiert. NMR-Messungen an DPPC (Wittebort et al., 1981) und an DMPC, DPPC und weiteren Phosphatidylcholinen (Wittebort et al., 1982) zeigen eine temperaturabhängige Überlagerung von $L_{\beta'}$ - und L_{α} -ähnlichen Spektren, was auf eine strukturelle Heterogenität der $P_{\beta'}$ -Phase mit Anteilen von Lipiden mit geordneten

und ungeordneten Ketten hinweist. Experimente mit Röntgen-Beugung dagegen sprechen für eine geordnete *All-trans*-Konformation der Ketten (Tardieu et al., 1973; Janiak et al., 1976) mit vielleicht einigen *Gauche*-Konformeren (Ruocco und Shipley, 1982). Neuere Arbeiten zur Röntgenbeugung beurteilen den Anteil von Lipiden, die denen in der flüssig-kristallinen Phase ähnlich sind, als „sehr klein“ (Rappolt und Rapp, 1996; Rapp et al., 1993) bzw. kleiner als 10 % (Wack und Webb, 1989).

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit dem Spin-Label 5-PC-SL zeigen, daß schon in der Vorumwandlung ein signifikanter Anteil des Kettenschmelzens stattfindet. Sie stimmen mit anderen Resultaten für 5-PC-SL (Heimburg et al., 1992) und 5-Diacylglycerid-Spin-Label (Heimburg, 1989, S. III-11) bei DMPC sowie für 5-, 12- und 16-SASL-Spin-Label¹ bei DPPC (Tsuchida und Hatta, 1988) gut überein. Daß die Veränderung der Kettenbeweglichkeit mit dem Spin-Label 13-DMPC-SL, bei dem die radikalische Doxyl-Gruppe fast am Ende des ersten Fettsäure-Restes eines DMPC-Moleküls liegt, nicht gemessen wurde, könnte auch daran liegen, daß an dieser Position die Veränderung der Kettenbeweglichkeit relativ zu der in der Hauptumwandlung klein ist und in den hier dargestellten Experimenten nicht mehr aufgelöst werden konnte. Eine weitere Abklärung des Verhaltens von DMPC-Membranen mit *n*-DMPC-Spin-Labeln für verschiedene *n* wäre deshalb interessant, da das Fehlen einer Änderung der Kettenbeweglichkeit am Ende der Kohlenstoffketten eine wichtige Erkenntnis über das Kettenschmelzen in der Vorumwandlung bedeuten würde.

Daß auch in der Vorumwandlung Kettenschmelzen stattfindet, wird in Abschnitt 5.5 im Zusammenhang mit der Kopplung von kalorischen und strukturellen Umwandlungen von Lipid-Membranen wieder aufgegriffen werden.

¹Mit *n*-SASL werden Spin-Label auf Basis von Stearinsäure bezeichnet, an deren *n*-ter Position sich eine Doxyl-Gruppe befindet (vgl. S. 33).

5.2 Nachweis der Proportionalität von Umwandlungsenthalpie und -volumen

In Abschnitt 4.1 wurde der Nachweis erbracht, daß für verschiedene Systeme von Lipid-Vesikeln im Bereich der Hauptumwandlung Volumenexpansionskoeffizient $\partial\hat{V}/\partial T$ und molare Wärmekapazität Δc_p proportional zueinander sind.

$$\frac{\partial\hat{V}}{\partial T} = \gamma\Delta c_p$$

Für die Vorumwandlung konnte eine so eindeutige Aussage anhand der Dichtemessungen nicht getroffen werden, aber auch hier gibt es starke Hinweise auf eine Proportionalitätsrelation (vgl. Abschnitt 5.3). Aus Densitometrie und Kalorimetrie wurde in dieser Arbeit für alle Lipidsysteme ein γ -Faktor für Haupt- bzw. Vorumwandlung (γ_m bzw. γ_p) bestimmt (vgl. Tab. 4.1 und 4.2).

$$\gamma_m = (8,52 \pm 0,44) \cdot 10^{-4} \text{ ml/J} \quad (5.1)$$

$$\gamma_p = (4,7 \pm 2,9) \cdot 10^{-4} \text{ ml/J} \quad (5.2)$$

In der Literatur sind zahlreiche Messungen des Volumens und der Wärmekapazität für multilamellare DMPC- und DPPC-Vesikel dokumentiert (Referenzen in Tab. 5.1). Meist wurden nur das Umwandlungsvolumen ΔV und die Umwandlungsenthalpie ΔH bestimmt. In zwei Arbeiten sind aber auch Kurven von Volumenexpansionskoeffizienten und Wärmekapazität für DPPC und DMPC/DPPC (Stoffmengenverhältnis 25:75) bzw. für DPPC/Cholesterin-Gemische verglichen worden, wobei Übereinstimmung der Kurvenformen beobachtet wurde (Melchior et al., 1980; Anthony et al., 1981).

In Tabelle 5.1 sind die in der Literatur gefundenen Ergebnisse zusammengestellt. Die Volumenänderung der Vesikeldispersionen wurde mit Dilatometrie (Messung der Ausdehnung), Densitometrie und Auftriebs-Methoden in Mischungen aus D_2O und H_2O (*neutral buoyancy method*) bestimmt, für die Messung der Wärmen wurde durchgehend Differentialkalorimetrie angewandt.

System	ΔH_m [kJ/mol]	$\Delta \hat{V}_m$ [10^{-3} ml/g]	\hat{T}_m [°C]	γ_m [10^{-4} ml/J]	Quellen
DMPC MLV	$23,9 \pm 1,7$	27 ± 1	$23,74 \pm 0,42$	$7,66 \pm 0,63$	a, e, h, i
DPPC MLV	$35,76 \pm 0,73$	36 ± 2	$41,77 \pm 0,47$	$7,39 \pm 0,45$	a, b, c, d, f, g, h, i, j, k, l

(a) Hauptumwandlung

System	ΔH_p [kJ/mol]	$\Delta \hat{V}_p$ [10^{-3} ml/g]	\hat{T}_p [°C]	γ_p [10^{-4} ml/J]	Quellen
DMPC MLV	4,18	$2,5 \pm 0,3$	$13,3 \pm 1,4$	$4,05 \pm 0,50$	a, e, h, i
DPPC MLV	7,66	$3,3 \pm 1,1$	$34,59 \pm 0,60$	$3,2 \pm 1,1$	a, d, g, h, i, j, k, l

(b) Vorumwandlung

Tabelle 5.1: Literaturwerte für die Phasenumwandlungen von multilamellaren DMPC- und DPPC-Vesikeln. Die Fehlerangaben stammen aus den zitierten Arbeiten oder geben die Standardabweichung aller in der Literatur gefundenen Daten an. Bei der Berechnung der γ -Faktoren wurde die Fortpflanzung der Standardabweichung berechnet, um ein Maß für die Streuung der Werte zu erhalten. Quellen: a: (Janiak et al., 1976), b: (Posch et al., 1983), c: (Anthony et al., 1981), d: (Blazyk et al., 1975), e: (Epand und Epand, 1980), f: (MacDonald, 1978), g: (Melchior et al., 1980), h: (Nagle und Wilkinson, 1978), i: (Mabrey und Sturtevant, 1978), j: (Ohki et al., 1990), k: (Wiener et al., 1988), l: (Wilkinson und Nagle, 1978).

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen alle mit den Daten aus der Literatur gut überein, selbst wenn man in Betracht zieht, daß die in Tabelle 5.1 aufgeführten Daten aus Messungen multilamellarer Vesikel stammen. Die γ -Faktoren, die sich insgesamt aus der Literatur ergeben, sind im Rahmen der Fehlergrenzen den experimentell gewonnenen aus (5.1) und (5.2) gleich

$$\gamma_m^{\text{Literatur}} = (7,53 \pm 0,78) \cdot 10^{-4} \text{ ml/J} \quad (5.3)$$

$$\gamma_p^{\text{Literatur}} = (3,6 \pm 1,2) \cdot 10^{-4} \text{ ml/J} \quad (5.4)$$

Für die gemessene Mischung aus DMPC und DPPC (Stoffmengenverhältnis 1:1) gibt es ebenfalls für einige Größen Literaturwerte ($T_m = 32 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\Delta V_m = 0,047 \text{ ml/g}$, Vesikel durch Beschallung mit Ultraschall hergestellt; Laggner und Stabinger, 1976), die nahe an den Messungen dieser Arbeit liegen (vgl. Tab. 4.1).

Ähnliche Ergebnisse für die Proportionalitätskonstante können auch aus Daten für DLPE² und DMPE³ (Wilkinson und Nagle, 1981) berechnet werden ($\gamma_m = 6,35 \cdot 10^{-4} \text{ ml/J}$ bzw. $\gamma_m = 5,45 \cdot 10^{-4} \text{ ml/J}$).

Die in Abschnitt 4.1 gemessene Proportionalitätsrelation von Volumenexpansionskoeffizienten $\partial \hat{V} / \partial T$ und spezifischer Wärmekapazität Δc_p hält dem Vergleich mit bisher veröffentlichten Daten anderer Gruppen stand. Sie ist für verschiedenen Lipide in unterschiedlichen Präparationen gültig und kann als Ausgangspunkt für theoretische Überlegungen wie in Abschnitt 3.1 genutzt werden.

5.3 Druckabhängigkeit der Wärmekapazitätsprofile

Verschiebung der Umwandlung bei Druckerhöhung

Die Verschiebung der Hauptumwandlungstemperatur bei Druckerhöhung ist für Phospholipide im Bereich von 1...2000 bar mit verschiedenen isothermen oder

²DLPE: Dilaurylphosphatidylethanolamin

³DMPE: Dimyristoylphosphatidylethanolamin

isobaren Methoden eingehend untersucht worden (vgl. Referenzen in Tab. 5.2). Übereinstimmend wurde bis 1500 bar eine Proportionalität von T_m und p gefunden, wohingegen bei höheren Drücken eine Abweichung vom linearen Verlauf mit leicht negativer Krümmung zu beobachten ist (Böttner et al., 1994). Weiter wird berichtet, daß sich das Umwandlungsvolumen ΔV_m nicht mit dem Druck ändert, zumindest für multilamellare DPPC-Vesikel und Drücke bis 267 bar (Liu und Kay, 1977).

Werte von $\partial T_m / \partial p$ für DMPC und DPPC sind in Tabelle 5.2 aufgeführt. Sie stimmen mit Daten für weitere Lipide (DSPC⁴, DEPC⁵, POPC⁶) aus den dort zitierten Arbeiten überein.

Aus diesen Steigungen kann die Proportionalitätskonstante γ berechnet werden, indem man die Clausius-Clapeyron-Gleichung bei p_0 auswertet

$$\left(\frac{\partial T_{\text{Umwandlung}}}{\partial p} \right)_{p_0} = T_{\text{Umwandlung}}^0 \frac{\Delta V^0}{\Delta H^0} = T_{\text{Umwandlung}}^0 \gamma^0 \quad (5.5)$$

$$\Rightarrow \gamma^0 = \frac{(\partial T_{\text{Umwandlung}} / \partial p)_{p_0}}{T_{\text{Umwandlung}}^0} \quad (5.6)$$

Dies wurde für die Daten aus der Literatur durchgeführt und die Ergebnisse (Mittelwerte nebst Standardabweichung) in Tabelle 5.2 eingetragen.

Die so erhaltenen Werte sind in guter Übereinstimmung mit den aus Dichtemessung und Kalorimetrie bestimmten γ -Faktoren (vgl. Abschn. 4.1). Dies ist auch zu erwarten, wenn $\partial T_m / \partial p = \text{konstant}$ gilt und man dann die bei Umgebungsdruck gemessenen Volumen- und Enthalpie-Änderungen in die Clausius-Clapeyron-Gleichung einsetzt.

Berechnet man den Mittelwert aus allen in Tabelle 5.2 aufgeführten Arbeiten für alle verschiedenen Lipide (DMPC, DPPC, DSPC, DEPC, POPC), so erhält man aus insgesamt 21 Messungen $\gamma_m^{0,\text{Literatur}} = (7,31 \pm 0,57) \cdot 10^{-4} \text{ ml/J}$. Dieser Wert deckt sich gut mit dem Ergebniss der Druckmessungen dieser Arbeit ($\gamma_m^0 =$

⁴DSPC: Distearylphosphatidylcholin

⁵Dielaidylphosphatidylcholin

⁶Palmitoyloleoylphosphatidylcholin

System	$\partial T_m / \partial p$ [10^{-8} K/Pa]	T_m^0 [K]	γ_m^0 [10^{-4} ml/J]	Quelle
DMPC, MLV	$21,8 \pm 1,2$	$297,1 \pm 0,1$	$7,34 \pm 0,38$	d, e, f, g, k
DPPC, MLV	$22,3 \pm 1,1$	$314,9 \pm 0,4$	$7,07 \pm 0,33$	a, b, c, d, e, f, k
DPPC, son.	22,7	314,7	7,22	i, j
DSPC, MLV	25,0	327,6	7,63	e, h

Tabelle 5.2: Literaturwerte für die Druckabhängigkeit der Hauptumwandlung. Für die verschiedenen Systeme sind die Änderung der Umwandlungstemperatur T_m mit dem Druck, die Umwandlungstemperatur bei Normaldruck T_m^0 und der daraus berechnete Proportionalitätsfaktor γ_m^0 angeben. Die γ -Faktoren wurden für jede Arbeit einzeln berechnet und dann gemittelt. Quellen: a: (Liu und Kay, 1977), b: (Mountcastle et al., 1978), c: (Utoh und Takemura, 1985), d: (Wong et al., 1988), e: (Braganza und Worcester, 1986), f: (Winter und Pilgrim, 1989), g: (Böttner et al., 1994), h: (Landwehr und Winter, 1994), i: (Bernsdorff et al., 1996), j: (Maruyama et al., 1996), k: (Ichimori et al., 1997). (son.: durch Beschallung mit Ultraschall hergestellte unilamellare Vesikel, DSPC: Distearoylphosphatidylcholin)

System	$\partial T_p / \partial p$ [10^{-8} K/Pa]	T_p^0 [K]	γ_p^0 [10^{-4} ml/J]	Quelle
DPPC, son.	14,0	307,3	4,56	a
DPPC, MLV	16,2	308,2	5,26	b

Tabelle 5.3: Literaturwerte für die Druckabhängigkeit der Vorumwandlung bei DPPC. Quellen: a: (Wong et al., 1988), b: (Ichimori et al., 1997). (son.: durch Beschallung mit Ultraschall hergestellte unilamellare Vesikel)

$$(7,76 \pm 0,22) \cdot 10^{-4} \text{ ml/J}, \text{ vgl. Tab. 4.4}.$$

Für die Vorumwandlung liegen weniger Daten vor (vgl. Tab. 5.3). Braganza und Worcester (1986) kamen sogar aufgrund ihrer Messungen an DMPC und DPPC zu dem Schluß, daß die Vorumwandlung mit keiner nennenswerten Volumenänderung einhergeht.

Jedoch zeigen die in Tabelle 5.3 ausgerechneten γ -Faktoren eine befriedigende Übereinstimmung mit den aus Dichte- bzw. Druckmessungen gewonnenen Daten ($\gamma_p^0 = (4,7 \pm 2,9) \cdot 10^{-4} \text{ ml/J}$ bzw. $\gamma_p^0 = (4,9 \pm 1,0) \cdot 10^{-4} \text{ ml/J}$).

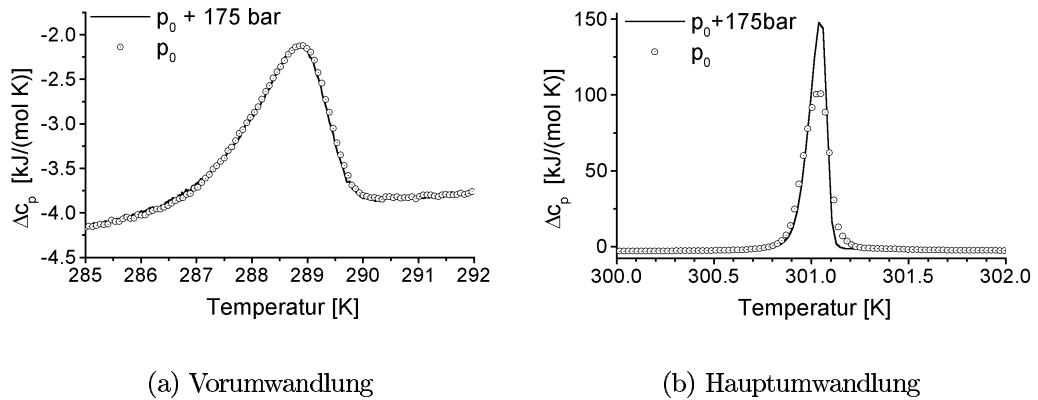


Abbildung 5.1: Reskalierung der Temperaturachse für Wärmekapazitätsprofile bei unterschiedlichen Drücken von DMPC (MLV). Bei der Vorumwandlung ist für die Messung bei Umgebungsdruck p_0 zur besseren Übersichtlichkeit nur jeder dritte Meßpunkt eingezeichnet.

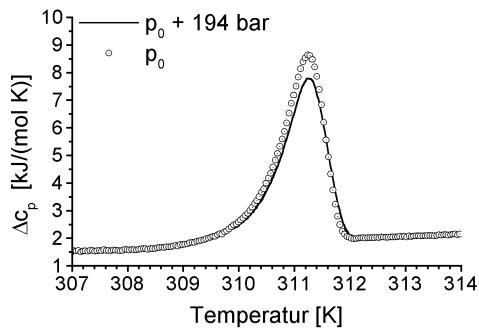
Reskalierung der Temperaturachsen

Eine weitere Überlegung aus Abschnitt 3.2 war, daß sich die Form der Wärmekapazitätsprofile bei Druckerhöhung kaum ändern würde. In den Abbildungen 5.1 bis 5.5 sind deshalb Wärmekapazitätsprofile von Vor- und Hauptumwandlungen bei verschiedenen Drücken dargestellt. Dabei wurde für die Kurve bei Umgebungsdruck p_0 mit folgender Formel aus Abschnitt 3.2 die Temperatur neu skaliert:

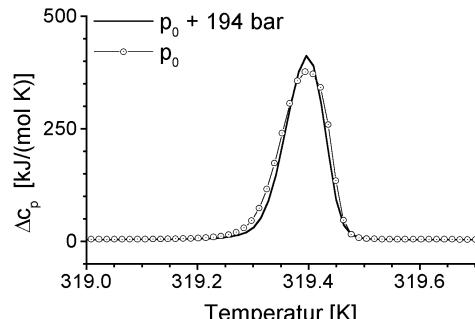
$$T^p = T^0 (1 + \Delta p \gamma^0)$$

Auf eine Reskalierung der Enthalpie ΔH , wie sie in (3.32) angegeben ist, wurde verzichtet, da sie nur Effekte hätte, die unter der Auflösung der Meßwerte lägen.

In allen Abbildungen zeigt sich sowohl für Vor- als auch Hauptumwandlung eine gute Übereinstimmung von reskaliertem Profil und tatsächlich gemessenem Kurvenverlauf. Zumindest für multilamellare DPPC-Vesikel beobachteten auch Mountcastle et al. (1978), daß sich die Kurvenform der Wärmekapazität bis 138 bar nicht verändert.



(a) Vorumwandlung



(b) Hauptumwandlung

Abbildung 5.2: Reskalierung der Temperaturachse für Wärmekapazitätsprofile bei unterschiedlichen Drücken von DPPC (MLV).

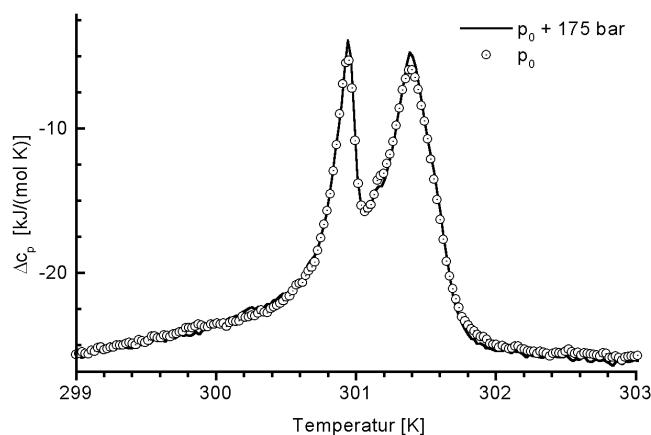


Abbildung 5.3: Reskalierung der Temperaturachse für Wärmekapazitätsprofile bei unterschiedlichen Drücken von DMPC (extrudierte Vesikel).

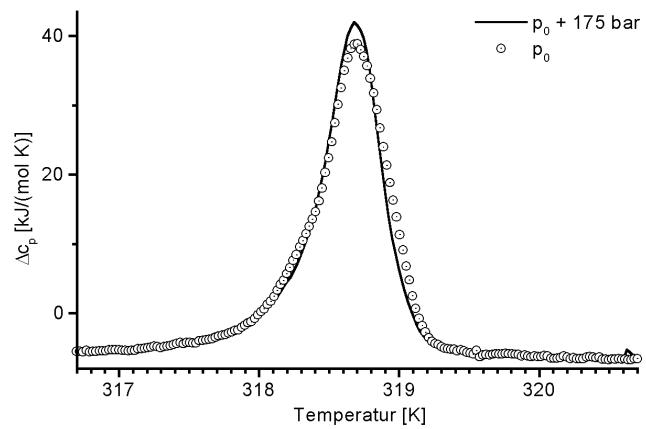


Abbildung 5.4: Reskalierung der Temperaturachse für Wärmekapazitätsprofile bei unterschiedlichen Drücken von DPPC (extrudierte Vesikel).

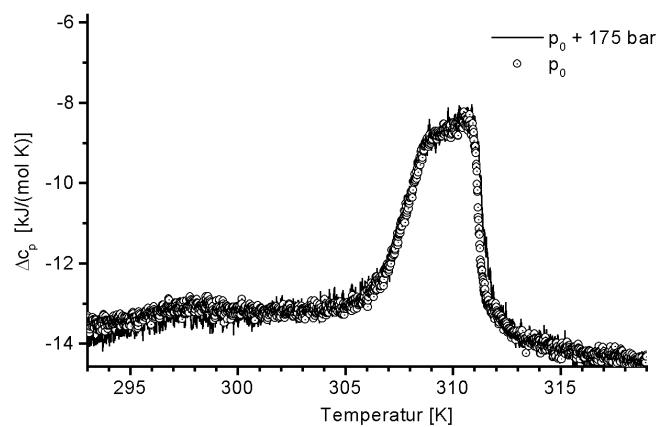


Abbildung 5.5: Reskalierung der Temperaturachse für Wärmekapazitätsprofile bei unterschiedlichen Drücken von DMPC/DPPC (Stoffmengenverhältnis 1:1, extrudierte Vesikel).

Insgesamt zeigen sowohl die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse der Druck-Kalorimetrie als auch der Vergleich mit den Arbeiten anderer Gruppen, daß die unter anderem mit der Proportionalität $\partial V / \partial T \propto \Delta C_p$ bzw. der daraus folgenden Beziehung $\Delta V_i \propto \Delta H_i$ abgeleitete Näherung (3.32) für das Verhalten von Lipid-Disperionen bei Drücken bis 200 bar im Bereich von Vor- und Hauptumwandlung zu vernünftigen Vorhersagen führt.

5.4 Bedeutung der Monofilm-Isothermen für Membraneigenschaften

Wann entspricht eine Monoschicht der Hälfte einer Doppelschicht?

Ein generelles Problem bei der Interpretation von Monoschicht-Experimenten ist die Frage, wann eine Monoschicht an einer Wasser/Luft-Grenzfläche einer Hälfte einer membranbildenden Doppelschicht entspricht. Erst dann können aus den experimentellen Ergebnissen Rückschlüsse auf das Verhalten der zugehörigen Membran gezogen werden.

In der Literatur gibt es zum Teil abweichende Ansichten zur Antwort auf diese Frage. Als Ansatz wurde generell gewählt, daß bestimmte Meßgrößen von Doppelschichten und Monoschichten bei verschiedenen Oberflächendrücken verglichen wurden, um daraus den Schluß zu ziehen, bei welchem Oberflächendruck eine Monoschicht am ehesten einer Doppelschicht entspricht. Vergleiche der molekularen Fläche für DPPC ergaben einen Wert nahe des Kollaps-Drucks von 50 mN/m (Hui et al., 1975). Albrecht et al. (1978) berücksichtigten dagegen die Übergangswärmen und -flächen und kamen damit zu 12,5 mN/m. Blume (1979) zeigte für verschiedene Phospholipide, daß die Umwandlungsentropie der Monoschicht bei höheren Oberflächendrücken etwa gleich der der Doppelschicht-Hauptumwandlung ist und schloß nach weiteren Vergleichen von molekularer Fläche und Einfluß des Lösungsmittels bzw. der Subphase auf 30 mN/m. Hinz et

al. (1985) richteten sich nach der Übereinstimmung der Umwandlungstemperaturen und schätzen einen Oberflächendruck von etwa 50 mN/m, bei denen Monoschichten aus Glucolipiden den zugehörigen Doppelschichten entsprechen sollen. MacDonald und Simon (1987) führten Messungen der Temperaturabhängigkeit des Oberflächenpotentials an DMPC-Monoschichten durch. Diese befanden sich im Gleichgewicht mit der Doppelschicht-Membran großer Vesikel, was einem Oberflächendruck von 49 mN/m entsprach. Der so erhaltene Potentialverlauf lag deckungsgleich über einer Kurve für die Lichtdurchlässigkeit einer entsprechenden Vesikeldispersion, so daß sie annahmen, daß die Monoschicht bei 49 mN/m in ihrem Eigenschaften der Hälfte einer Doppelschicht am nächsten kam. Köber et al. (1997) betrachteten zum Vergleich sowohl Enthalpie als auch Umwandlungstemperaturen für Glykolipide und kamen dementsprechend auf unterschiedliche Werte (30 mN/m bzw. 43 mN/m). Insgesamt deuten aber die meisten Daten darauf hin, daß eine Monoschicht in der Nähe des Kollaps-Druck bei 49 mN/m der Hälfte einer Doppelschicht am nächsten kommt (MacDonald, 1996), auch wenn in anderen Übersichtsartikeln ein Wert von 30...35 mN/m vertreten wird (Marsh, 1996). Kürzlich wurde der Äquivalenzdruck von 49 mN/m auch theroretisch näher begründet (Feng, 1999).

Rückschlüsse aus den Monofilm-Isothermen

Für Monofilme aus DMPC und DPPC waren in Abschnitt 4.3 aus den Π - A -Isothermen die Oberflächendrücke Π_{EC} der Umwandlung von flüssig-expandiert (LE: *liquid expanded*) nach flüssig-kondensiert (LC: *liquid expanded*) gewonnen worden (vgl. Tab. 4.5). Diese Daten sind den Ergebnissen anderer Gruppen ähnlich (Phillips und Chapman, 1968) bzw. stimmen mit diesen gut überein (Albrecht et al., 1978). Die beobachtete Unabhängigkeit der DPPC-Isothermen von der Kompressionrate findet sich ebenfalls in veröffentlichten Messungen wieder (Jyoti et al., 1996).

Die Ergebnisse aus Tabelle 4.5 sind in den Abbildungen 5.6 und 5.6 graphisch

dargestellt. Dazu sind jeweils eine lineare und eine quadratische Regression eingezeichnet (berechnet mit Origin 5.0 von MicroCal (Northampton/MA, USA)).

Die Gleichungen für die Ausgleichskurven lauten für DMPC

$$\Pi_{EC} = (2,144 \pm 0,170) \frac{mN}{m K} T - (587.5 \pm 49,0) \frac{mN}{m} \quad (5.7)$$

$$\begin{aligned} \Pi_{EC} = & (3310.1 \pm 130) \frac{mN}{m} - (25,143 \pm 0,870) \frac{mN}{m K} T \\ & + (0,047748 \pm 0,00153) \frac{mN}{m K^2} T^2 \end{aligned} \quad (5.8)$$

und für DPPC

$$\Pi_{EC} = (1,83 \pm 1,1) \frac{mN}{m K} T - (534 \pm 31) \frac{mN}{m} \quad (5.9)$$

$$\begin{aligned} \Pi_{EC} = & (3180.6 \pm 194) \frac{mN}{m} - (22,814 \pm 1,29) \frac{mN}{m K} T \\ & + (0,04086 \pm 0,00220) \frac{mN}{m K^2} T^2 \end{aligned} \quad (5.10)$$

Dabei sind zum Teil mehr Stellen bei den Koeffizienten angegeben, als durch den Fehler gerechtfertigt ist, damit die obigen Gleichungen auch genau die eingezeichneten Kurven ergeben. Die Fehlerangaben stammen vom verwendeten Analyse-Programm Origin 5.0 und berücksichtigen die Fehler der einzelnen Datenpunkte.

Bei beiden Lipid-Systemen fällt auf, daß, gemessen an den Fehlerbalken der einzelnen Meßpunkte, die linearen Regressionen den Verlauf der Daten unzureichend darstellen. Beide Kurven zeigen nämlich eine positive Krümmung, so daß als nächste Näherung eine quadratische Regression durchgeführt wurde, die die Ergebnisse weitaus besser widerspiegelt.

In der Literatur wurden nur lineare Ausgleichsrechnungen gefunden, die zu Steigungen von 1,89 mN/(m K) (Blume, 1979, DMPC und DPPC) bzw. 1,6 mN/(m K) (Phillips und Chapman, 1968, DPPC) führen. Diese Werte stimmen mit den Ergebnissen dieser Arbeit in (5.7) und (5.9) überein, wobei jedoch im Gegensatz zu Blume ein kleiner, aber signifikanter Unterschied zwischen DMPC und DPPC festgestellt wurde.

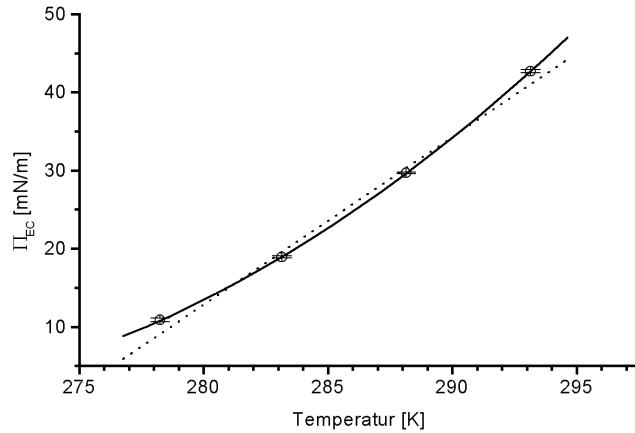


Abbildung 5.6: Umwandlungsdruck $\Pi_{EC}(T)$ für DMPC-Monofilme. Die Daten aus Tabelle 4.5 für DMPC-Monofilme sind mit zugehöriger linearer und quadratischer Regression eingezeichnet, wobei die einzelnen Meßpunkte entsprechend ihrem Fehler gewichtet wurden. Gemessen an den Fehlerbalken der einzelnen Datenpunkte, ergibt die quadratische Ausgleichskurve eine deutlich bessere Übereinstimmung.

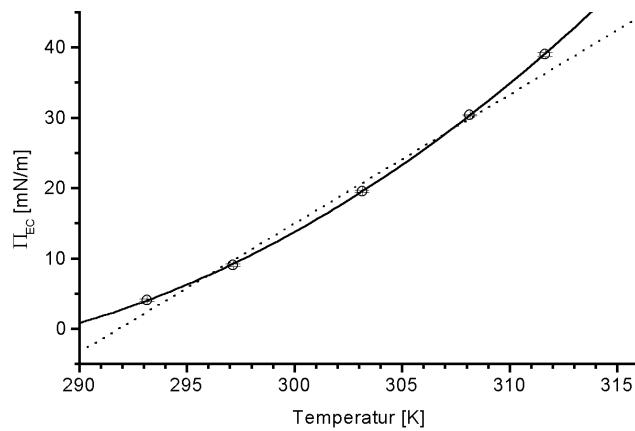


Abbildung 5.7: Umwandlungsdruck $\Pi_{EC}(T)$ für DPPC-Monofilme. Für DPPC-Monofilme wurden die Daten aus Tabelle 4.5 entnommen und lineare bzw. quadratische Regressionen durchgeführt. Die einzelnen Stützstellen gingen dabei mit ihrem Fehler gewichtet ein. Die quadratische Näherung gibt die Ergebnisse der Messungen sehr gut wieder, während die Ausgleichsgerade nur bei einem Datenpunkt im Bereich des Fehlerbalkens liegt.

Die quadratischen Näherungen erlauben nun eine genauere Untersuchung des Verhältnisses von Umwandlungsfäche ΔA und -enthalpie ΔH . In Gleichung (3.16) wurde die Proportionalität von Umwandlungswärme und -fläche für alle Makrozustände postuliert, da direkte Vergleiche von Umwandlungsenthalpie und -fläche bei Lipid-Vesikeln experimentell nur schwer zugänglich sind. Nun nutzt man die zweidimensionale Clausius-Clapeyron-Gleichung aus

$$\frac{\partial \Pi_{\text{EC}}}{\partial T} = \frac{\Delta S}{\Delta A} = \frac{\Delta H}{T \Delta A} \quad (5.11)$$

womit man für das Verhältnis von ΔA und ΔH erhält:

$$\gamma_{\text{area}} := \frac{\Delta A}{\Delta H} = \frac{1}{T \frac{\partial \Pi_{\text{EC}}}{\partial T}} \quad (5.12)$$

Aus den quadratischen Näherungen werden nun die Steigungen $\partial \Pi_{\text{EC}} / \partial T$ ausgerechnet und daraus $\gamma_{\text{area}}(T)$ bestimmt (Abb. 5.8). Zusätzlich ist in Abbildung 5.8 eine horizontale gestrichelte Linie eingezeichnet, die einen für Vesikel abgeschätzten Wert wiedergibt (Heimburg, 1998, $8930 \text{ cm}^2/\text{J}$). Die sehr großen Fehlerbalken ergeben sich bei der Fehlerfortpflanzung aus der Struktur von (5.12), in der kleine Fehler zu großen Unsicherheiten von γ_{area} führen.

Für niedrige Temperaturen der Isothermen und damit für niedrige Umwandlungsdrücke Π_{EC} weichen die γ_{area} -Faktoren stark von dem abgeschätzten Wert ab. Mit zunehmender Temperatur (zunehmenden Π_{EC}) nähern sie sich aber immer mehr an.

Zu Beginn dieses Abschnitts wurde bei der Sichtung der Literatur festgestellt, daß Monofilme bei Oberflächendrücken nahe des Kollapses Eigenschaften von Hälften entsprechender Doppelschichten haben. Im Bereich hoher Oberflächendrücke, d. h. hier bei hohen Temperaturen der Isothermen (vgl. Tab. 4.5), sollte darum der aus den Monofilm-Isothermen berechnete Faktor γ_{area} dem einer Doppelschicht gleich sein. Durch die hier vorgestellten Messungen erscheint ein Faktor in der Größenordnung von $9000 \text{ cm}^2/\text{J}$ plausibel, wobei für eine genauere Angabe weitere Isothermen bei höheren Temperaturen nötig sind.

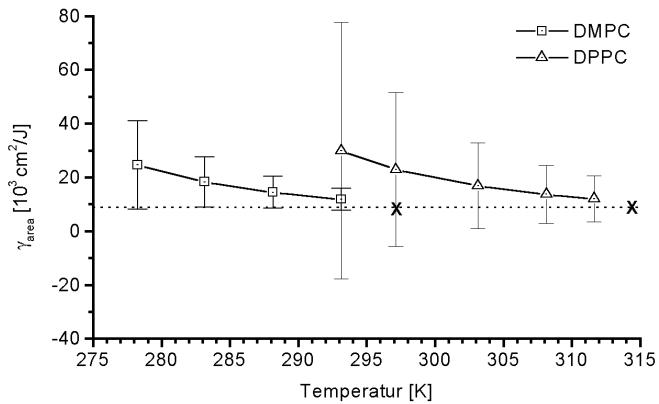


Abbildung 5.8: γ_{area} für DMPC- und DPPC-Monofilme als Funktion der Temperatur. Mit Gleichung (5.12) wurden aus den Steigungen der $\Pi_{\text{EC}}(T)$ -Kurven die Verhältnisse von Umwandlungsfläche ΔA und -enthalpie ΔH ausgerechnet. Die gestrichelte horizontale Linie gibt einen für Lipid-Vesikel abgeschätzten Wert wieder (Heimburg, 1998, 8930 cm²/J). Die beiden Kreuze stehen für die Hauptumwandlungs-Temperaturen von Membranen der beiden Lipide (linkes Kreuz: DMPC). Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Fortpflanzung der Standardabweichungen.

Um aber darauf schließen zu können, daß $\Delta A_i \propto \Delta H_i$ auch für alle Makrozustände gilt, müßte man überprüfen, ob die Meßkurven von Enthalpie und Fläche einer Membran proportional zueinander sind (vgl. Heimburg, 1998) .

5.5 Kopplung von Ordnungs- und Strukturumwandlungen

Bedeutung der Viskositätsmessungen

Neben der Beobachtung der Proportionalität von Wärmekapazität und Volumenexpansionskoeffizienten im Bereich der Hauptumwandlung wurde in Abschnitt 4.1 ein Zusammenhang von Wärmekapazitätsprofil und Viskositätsverlauf festgestellt. Immer wenn bei der Hauptumwandlung die Δc_p -Kurve mehrere Spitzen zeigte, fand sich auch ein Maximum der Viskosität. Gab es nur ein Hauptum-

wandlungs-Maximum, so konnte keine Veränderung der Viskosität beim Übergang beobachtet werden (vgl. Abb. 4.3 bzw. Abb. 4.4).

Die Viskosität einer Vesikel-Dispersion kann auf zwei Weisen beeinflusst werden. Betrachtet man zunächst nur ein Vesikel, das sich in einem Gradienten der Strömungsgeschwindigkeit befindet, so wird sich dieses um sich selbst drehend mit der Strömung fortbewegen. Es ist im folgenden zweckmäßig, die intrinsische Viskosität $[\eta]$ zu benutzen

$$[\eta] := \lim_{c_0 \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 c_0} \quad (5.13)$$

die nur den Anteil der dispergierten Teilchen an der Viskosität wiedergibt (c_0 : Konzentration der Teilchen, η : Viskosität der Dispersion, η_0 : Viskosität des Lösungsmittels). Für feste Teilchen gilt dann:

$$[\eta] = f v \quad (5.14)$$

(f : Formfaktor, v : spezifisches Volumen des Teilchens). Stellt man sich das Vesikel als Polymer aus Lipiden vor, so erhält man andererseits

$$[\eta] \propto \langle R_G^2 \rangle^\nu \quad (5.15)$$

wobei ν von der räumlichen Gestalt und den Annahmen über die Wechselwirkung der Monomere abhängt (Cantor und Schimmel, 1980, S. 1019ff.). Der „Gyrationsradius“ R_G ist der mittlere quadratische Abstand R_S eines Monomers (Lipids) zum Schwerpunkt des Vesikels

$$R_G^2 := \frac{1}{n+1} \sum_{i=0}^n R_{S,i}^2 \quad (5.16)$$

Vesikel aus Lipid-Membranen können nun abhängig von Randbedingungen wie z. B. der Temperatur vielfältige Formen annehmen (Seifert und Lipowsky, 1995; Lipowsky, 1996). Findet eine Änderung der Vesikelform statt, so ändern sich der Formfaktor f bzw. Gyrationradius R_G sowie Exponent ν und mit diesen dann die Viskosität.

Liegen viele Vesikel vor, können sich zusätzlich Wechselwirkungen untereinander bzw. Übergänge zu anderen Strukturen als einer Vesikel-Dispersion auf die Viskosität auswirken. Die Aggregation von Vesikeln zu größeren Partikeln führt dabei zu einem höheren Gyrationsradius und einer kleineren Teilchenkonzentration c_0 , während die Ausbildung einer qualitativ anderen Struktur, wie z. B. die eines Netzwerks von Membranen, eine dramatische Veränderung der Strömungseigenschaften zur Folge haben kann.

Eine Anstieg der Viskosität, wie er in Abschnitt 4.1 beobachtet wurde, lässt darum auf strukturelle Änderungen in der Vesikel-Dispersion schließen.

Die Kopplung von kalorischen und strukturellen Umwandlungen war in Abschnitt 3.3 betrachtet worden, wo ein einfaches Modell vorgestellt wurde, mit dem die Korrelation zwischen Aufspaltung der Wärmekapazitätskurven und Formumwandlungen erklärt werden konnte. Dort war ausgeführt worden, daß im Bereich eines Übergangs mit latenter Wärme, wo mit der Wärmekapazität auch die Elastizität ein Maximum annimmt (vgl. Abschn. 3.1), strukturelle Umwandlungen wahrscheinlicher werden. Entscheidend für das Zustandekommen solch einer Umwandlung war die Balance von freier Krümmungsenthalpie und freier Enthalpie der Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel. Dies korrespondiert sehr gut mit den Ergebnissen für DMPG, wo bei niedriger Ionenstärke eine strukturelle Umwandlung stattfand, die durch Erhöhung der Ionenstärke schließlich unterdrückt werden konnte.

Beobachtung struktureller Umwandlungen

Daß bei dem Viskositätsmaximum, das für DMPG bei niedriger Ionenstärke gemessen wurde, wirklich ein Übergang zu einer anderen Struktur stattfindet, ist in der Literatur belegt. So beobachteten Heimburg und Biltonen (1994) bei DMPG-Dispersionen zwischen 20 °C und 28 °C neben einer erhöhten Viskosität mit elektronenmikroskopischen Methoden ein „Netzwerk von Schläuchen“. Experimente mit Kernresonanz-Spektroskopie zeigten weiter, daß die Lipide in der netzwerk-

artigen Phase in einer lamellaren Struktur vorlagen.

Dispersionen von DMPG bei hoher und niedriger Ionenstärke wurden von Schneider et al. detailliert untersucht (Schneider et al., 1999, zur Veröffentlichung eingereicht). Unabhängig von der Ionenstärke wurden mit verschiedenen elektronenmikroskopischen Methoden ober- und unterhalb der Hauptumwandlung Vesikel beobachtet, während nur bei niedriger Ionenstärke in der Hauptumwandlung eine netzwerkartige Phase auftrat. Die Vesikelpopulationen oberhalb und unterhalb der Umwandlung unterschieden sich dabei in Form und Größe (rund bzw. rund-kantig, 100...400 nm bzw. 400...1400 nm Durchmesser). Letzteres kann für die genauere Erklärung des Wärmekapazitätsprofil herangezogen werden, das im Gegensatz zu dem modellhaft in Abschnitt 3.3 berechneten (vgl. Abb. 3.1) eine unsymmetrische Feinstruktur des Maximums der Hauptumwandlung zeigte (Abb. 4.3).

Für extrudierte DMPC-Vesikeln, bei denen ebenfalls ein Viskositäts-Maximum in der Umwandlung beobachtet wurde, gibt es in der Literatur Hinweise auf eine Formänderung in der Hauptumwandlung. Zunächst kann die Präparation mittels Extrusion im Gegensatz zu anderen Techniken zu einer nicht-sphärischen Vesikel-Population führen. Dies wurde für DOPE⁷ (100 mmol/l NaCl) (Talmon et al., 1990) und EPC⁸/Cholesterin-Gemische (Stoffmengenverhältnis 55:45, 150 mmol/l NaCl) (Mui et al., 1993) untersucht, wobei Mui et al. beobachteten, daß bei Präparationen von EPC/Cholesterin in destilliertem Wasser nur sphärische Vesikel auftraten. Dies erklärten sie damit, daß die Vesikel dazu tendieren, ihre nicht-sphärische Form nach der Extrusion durch Erhöhung des Innenvolumens zur Kugelgestalt umzuwandeln. Eine Aufnahme von Wasser ist aber bei Anwesenheit von Ionen wegen osmotischer Effekte nicht möglich, da eine Lipid-Membran für Ionen im Gegensatz zu Wasser kaum durchlässig ist.

Die Form von DPPC-Vesikeln mit großen (100 nm) und sehr großen (400...4000

⁷DOPE: Dioleoylphosphatidylethanolamin

⁸EPC: *egg phosphatidylcholine*, aus Eigelb gewonnenes Phosphatidylcholin-Gemisch

nm) Durchmessern (50 mmol/l KCl) wurde von Parente et al. (1985) vor und nach der Hauptumwandlung untersucht. Die Autoren fanden dabei unterhalb der Hauptumwandlung facettierte Vesikel, während solche oberhalb des Übergangs vollständig abgerundet waren. Ein ähnliches Ergebnis erzielten Chestnut et al. (1992) mit extrudierten DMPC-Vesikeln (100mM NaCl), die bei Temperaturen unterhalb der Hauptumwandlung eine polygonale Gestalt zeigten und bei höheren Temperaturen schließlich vollständig rund waren. Auch Vesikel, die von einer Temperatur oberhalb der Hauptumwandlung abgekühlt wurden, wiesen eine polygonale Beschaffenheit auf. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der Interpretation von Mui et al., wo die nicht-sphärische Vesikel-Gestalt von osmotischen Kräften abhing. Denn wäre beim Übergang durch die Hauptumwandlung einmal die Kugelgestalt erreicht (z. B. durch erhöhte Permeabilität für Ionen beim Übergang), so sollte das Vesikel beim Abkühlen nicht mehr zur „kantigen“ Morphologie zurückkehren.

Da in dieser Arbeit für Phosphatidylcholine keine Abhängigkeit der Wärmekapazitätsverläufe von der Verwendung eines Puffers oder bidestillierten Wassers als Lösungsmittel festgestellt wurde, wird aus den oben aufgeführten Ergebnissen der anderen Gruppen geschlossen, daß die extrudierten Vesikel unterhalb ihrer jeweiligen Umwandlungstemperatur in nur ungefähr kugelförmiger Gestalt und oberhalb als sphärische Vesikel vorlagen. Ein Erklärungsansatz für die „kantige“ Form kann eine unterschiedliche Elastizität in Gel-Zustand und flüssigkristallinem Zustand sein.

Informationen über die Zustände im Temperaturbereich der etwa 1 K breiten Hauptumwandlung von extrudierten DMPC-Vesikeln fanden sich nur bei Jin et al. (1998), die mit einer speziellen Form der Kalorimetrie in destilliertem Wasser und in NaCl-Lösung bei 23,76 °C, also mitten in der Hauptumwandlung (vgl. Abb. 4.2), Anzeichen für eine längerreichweitige strukturelle Korrelation der Dispersion als bei anderen Temperaturen in der Nähe des Hauptübergangs beobachten konnten.

Zusammenfassend liegen nach Interpretation der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sowie der Resultate anderer Gruppen extrudierte Phosphatidylcholin-Vesikel unterhalb ihrer Hauptübergänge als nicht-sphärische Vesikel vor. Oberhalb des Übergangs nehmen sie eine kugelförmige Gestalt an. Bei DMPC-Vesikeln deuten Messungen der Viskosität sowie von Wärmekapazität und thermischer Leitfähigkeit (Jin et al., 1998) darauf hin, daß im Bereich der Hauptumwandlung eine strukturell andere Phase vorliegt. Für Vesikel des Lipids DPPC, bei dem keine Aufspaltung des Umwandlungsmaximums gemessen wurde, konnten in Übereinstimmung mit dem Modell aus Abschnitt 3.3 keine Anzeichen für eine strukturelle Umwandlung beobachtet werden.

Führt man die in Abschnitt 3.3 ausgeführten Betrachtungen zur Kopplung von kalorischen und strukturellen Umwandlungen weiter, so kann man zu einer neuen Interpretation der Vorumwandlung gelangen. Da bei dieser ein signifikanter Anteil des Kettenschmelzens stattfindet (vgl. Abschn. 5.1), kann man nun annehmen, daß die beiden Maxima von Vor- und Hauptumwandlung aus der Kopplung einer morphologischen Umwandlung, der Ausbildung einer gerippten Oberfläche, mit der Schmelzumwandlung der Lipid-Ketten hervorgehen. Damit hätte man es nicht mehr mit zwei getrennten Übergängen zu tun, sondern mit einer Feinstruktur des Ordnungsübergangs der Lipid-Ketten. Dies wird auch dadurch unterstützt, daß Wärmekapazität und Volumenexpansionskoeffizient zwischen den Spitzen von Vor- und Hauptumwandlung einen Wert deutlich über der Nulllinie haben (Daten nicht gezeigt).

6 Schlußbetrachtung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden thermodynamische Eigenschaften der Vor- und Hauptumwandlung verschiedener Lipid-Systeme untersucht. Mit Spin-Label-ESR wurde gezeigt, daß neben der Hauptumwandlung auch die Vorumwandlung mit einem zwar kleineren, aber signifikanten Anteil des Kettenschmelzens verbunden ist. Mittels Densitometrie und Kalorimetrie konnte für die Hauptumwandlung unilamellarer Vesikel eine Proportionalität von Volumenexpansionskoeffizienten und Wärmekapazität nachgewiesen werden.

$$\frac{\partial \hat{V}}{\partial T} = \gamma_{\text{vol}} \Delta c_p$$

Für die Vorumwandlung beobachtete man mit diesen Verfahren ein ähnliches Verhalten. Ausgehend von obiger Proportionalität führen theoretische Betrachtungen der thermodynamischen Fluktuationen im Bereich des Phasenübergangs zu einem ebenfalls proportionalen Verhalten von Wärmekapazität und Elastizität (Heimbürg, 1998). Die in diese Überlegungen eingeflossene Annahme, daß auch Fläche und Enthalpie der Umwandlung proportional zueinander sind, konnte durch Messungen von Oberflächendruck-Fläche-Isothermen an Monofilmen unterstützt werden. Es wurden aus den theoretischen Betrachtungen Voraussagen über das Verhalten von Lipid-Membranen bei hohen Drücken gemacht. Bei Druckerhöhung sollte sich die Umwandlungstemperatur in erster Näherung proportional zum Druck nach oben verschieben, während die Form der Wärmekapazitätskurven erhalten bleiben sollte. Dies wurde im Bereich bis 200 bar mit einem dafür modi-

fizierten Kalorimeter nachgewiesen. Da in die Voraussagen die Proportionalitätskonstante γ_{vol} einging, konnte diese aus den Druckmessungen für uni- und auch multilamellare Vesikel bestimmt werden. Die Werte von γ_{vol} stimmten durchweg mit den γ -Faktoren überein, die mit Hilfe der Densitometrie gewonnen worden waren. Insgesamt wurde in dieser Arbeit für die Hauptumwandlung ein Wert von $(8,15 \pm 0,49) \cdot 10^{-4}$ ml/J gefunden, während die Messungen für die Vorumwandlung zu einem deutlich unsichereren Faktor von $(4,8 \pm 3,1) \cdot 10^{-4}$ ml/J führten.

Ein Modell von Heimburg zur Kopplung von strukturellen Umwandlungen der Membranen mit dem Kettenschmelzen der Lipide wurde vorgestellt, mit dem die Viskositätsmessungen an Vesikel-Dispersionen im Bereich der Übergänge erklärt werden konnten. Danach führt die mit der Wärmekapazität am Übergang erhöhte Elastizität zu einer höheren Wahrscheinlichkeit struktureller Umwandlungen. Lassen dann die Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel eine solche Formumwandlung zu, so hat diese eine Aufspaltung des Wärmekapazitätsmaximums in mehrere Spitzen zur Folge. Dies konnte bei den untersuchten Systemen bestätigt werden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse stehen im Einklang mit in anderen Zusammenhängen veröffentlichten Daten anderer Gruppen. Sie bieten eine neue Sichtweise auf die Phasenübergänge in Lipid-Membranen an, die mit einfachen theoretischen Überlegungen zu weiteren Voraussagen, z. B. für die Schallgeschwindigkeit von Vesikel-Dispersionen (Halstenberg et al., 1998; Heimburg, 1998) führt.

Die Betrachtung von Ordnungsübergängen, mechanischen Eigenschaften und Formumwandlungen bei Lipid-Vesikeln kann zu einem besseren Verständnis der Funktion von Lipiden in Biomembranen beitragen. Dazu aber wird man schrittweise mit den an einfachen Modellmembranen gewonnenen Prinzipien zu immer komplexeren Systemen übergehen müssen, um herauszufinden, welche physikalischen Eigenschaften die Funktionalität der Organelle Membran entscheidend beeinflussen. In unserer Gruppe wird deshalb gegenwärtig mit der Untersuchung von *pulmonary surfactant* begonnen, einem Gemisch, das zu 90 % aus Lipiden

(vor allem Phosphatidylcholine und Phosphatidylglycerole) und zu 10 % aus Proteinen besteht. Diese auch *lung surfactant* genannte Substanz dient dazu, die Oberfläche von Lungen zu stabilisieren, indem sie die Oberflächenspannung der Luft/Flüssigkeit-Grenzfläche reduziert (s. z. B. Veldhuizen et al., 1998). Erste densitometrische und kalorimetrische Messungen zeigen auch für dieses komplexe biologische System ähnliche Verläufe von Wärmekapazität und Volumenexpansionskoeffizienten.

Es gibt viele Hinweise, daß Organismen aktiv physikalische Größen ihrer Membranen, wie z. B. die Umwandlungstemperatur, an veränderte Umgebungsbedingungen anpassen. Die Frage nach den Gründen dafür steht am Horizont der Erforschung der Eigenschaften von Modellmembranen.

Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., und Watson, J. D. (1994). *Molecular biology of the cell*. New York, London: Garland Publishing, 3. Auflage.
- Albrecht, O., Gruler, H., und Sackmann, E. (1978). Polymorphism of phospholipid monolayers. *Le Journal de Physique*, 39(3), 301–313.
- Anthony, F. H., Biltonen, R. L., und Freire, E. (1981). Modification of an vibrating-tube density meter for precise temperature scanning. *Analytical Biochemistry*, 116, 161–167.
- Bartlett, G. R. (1958). Phosphorus assay in column chromatography. *Journal of Biological Chemistry*, 234, 466–469.
- Becker, R. (1985). *Theorie der Wärme*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 3. Auflage.
- Bernsdorff, C., Wolf, A., und Winter, R. (1996). The effect of temperature and pressure on structural and dynamic properties of phospholipid/sterol mixtures - a steady state and time-resolved fluorescence anisotropy study. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 193, 151–173.
- Bettin, H. und Spieweck, F. (1990). Die Dichte des Wassers als Funktion der Temperatur nach Einführung der Internationalen Temperaturskala von 1990. *PTB-Mitteilungen*, 100(3), 195–196.
- Blazyk, J. F., Melchior, D. L., und Steim, J. M. (1975). An automated differential scanning dilatometer. *Analytical Biochemistry*, 68, 586–599.
- Blume, A. (1979). A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 557, 32–44.
- Böttner, M., Ceh, D., Jacobs, U., und Winter, R. (1994). High pressure volumetric measurements on phospholipid bilayers. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 184, 205–218.

- Boyer, R. F. (1993). *Modern experimental biochemistry*. Redwood City: Benjamin/Cumming, 2. Auflage.
- Braganza, L. F. und Worcester, D. L. (1986). Hydrostatic pressure induces hydrocarbon chain interdigitation in single-component phospholipid bilayers. *Biochemistry*, 25, 2591–2596.
- Brockman, H. L., Jones, C. M., Schwebke, C. J., Smaby, J. M., und Jarvis, D. E. (1980). Application of a microcomputer-controlled film balance system to collection and analysis of data from mixed monolayers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 78(2), 502–512.
- Brockman, H. L., Smaby, J. M., und Jarvis, D. E. (1984). Automation of surface cleaning and sample addition for surface balances. *Journal of Physics E: Scientific Instruments*, 17, 351–353.
- Brown, R. E. (1998). Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *Journal of Cell Science*, 111, 1–9.
- Cantor, C. P. und Schimmel, P. R. (1980). *Biophysical Chemistry*, Band 3. Freeman: New York.
- Cantor, R. S. (1997). Lateral pressures in cell membranes: A mechanism for modulation of protein function. *Journal of Physical Chemistry B*, 101, 1723–1725.
- Chestnut, M. H., Siegel, D. P., Burns, J. L., und Talmon, Y. (1992). A temperature-jump device for time-resolved cryo-transmission electron microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 20(1), 95–101.
- Cossins, A. R. und Macdonald, A. G. (1989). The adaption of biological membranes to temperature and pressure: fish from the deep and cold. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 21(1), 115–135.
- Eibl, H. und Kaufmann-Kolle, P. (1995). Medical application of synthetic phospholipids as liposomes and drugs. *Journal of Liposome Research*, 5(1), 131–148.
- Epand, R. M. und Epand, R. F. (1980). Studies of thermotropic phospholipid phasetransitions using scanning densitometry. *Chemistry and Physics of Lipids*, 27, 139–150.
- Evans, E. A. (1974). Bending resistance and chemically induced moments in membrane bilayers. *Biophysical Journal*, 14, 923–931.

- Feng, S.-S. (1999). Interpretation of mechanochemical properties of lipid bilayer vesicles from the equation of state or pressure-area measurements of the monolayer at the air-water or oil-water interface. *Langmuir*, 15, 998–1010.
- Feynman, R. P., Leighton, R. B., und Sands, M. (1977). *The Feynman Lectures on Physics*, Band 2. Reading, Menlo Park, London, Amsterdam, Don Millis, Sydney: Addison-Wesley.
- Franks, N. P. und Lieb, W. R. (1978). Where do general anaesthetics act? *Nature*, 274, 339–342.
- Freire, E. (1995). Differential scanning calorimetry. In B. A. Shirley (Hrsg.), *Methods in Molecular Biology Vol. 40: Protein Stability and Folding: Theory and Practice*. Kapitel 9, (191–218). Totowa, NJ: Humana Press.
- Freire, E. und Biltonen, R. L. (1978). Statistical mechanical convolution of thermal transitions in macromolecules. I. Theory and application to homogeneous systems. *Biopolymers*, 17, 463–479.
- Gõni, F. M., Alonso, A., und Chapman, D. (1986). Biotechnological applications of model membranes and phospholipid polymers. In G. Pifat-Mrzljak (Hrsg.), *Supramolecular Structure and Function* (19–37). Heidelberg: Springer.
- Gruner, S. M. (1985). Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 3665–3669.
- Halstenberg, S., Heimburg, T., Kaatze, U., und Krivanek, R. (1998). Cholesterol-induced variations in the volume and enthalpy fluctuations of lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 75, 264–271.
- Heimburg, T. (1989). *Untersuchungen der physikalischen Eigenschaften von biologischen – und Modellmembranen*. Dissertation, Georg-August-Universität, Göttingen.
- Heimburg, T. (1998). Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1415, 147–162.
- Heimburg, T. und Biltonen, R. L. (1994). Thermotropic behavior of dimyristoylphosphatidylglycerol and its interaction with cytochrome c. *Biochemistry*, 33, 9477–9488.
- Heimburg, T. und Biltonen, R. L. (1996). A monte carlo simulation study of protein-induced heat capacity changes and lipid-induced protein clustering. *Biophysical Journal*, 70, 84–96.

- Heimburg, T. und Marsh, D. (1996). Thermodynamics of the interaction of proteins with lipid membranes. In K. M. Merz und B. Roux (Hrsg.), *Biological Membranes: a Molecular Perspective from Computation and Experiment*. Kapitel 13, (405–462). Boston, Basel, Berlin: Birkhäuser.
- Heimburg, T., Würz, U., und Marsh, D. (1992). Binary phase diagram of hydrated dimyristoylglycerol-dimyristoylphosphatidylcholine mixtures. *Biophysical Journal*, 63, 1369–1378.
- Hinz, H.-J., Six, L., Ruess, K.-P., und Liefländer, M. (1985). Head-group contributions to bilayer stability: monolayer and calorimetric studies on synthetic, stereochemically uniform glucolipids. *Biochemistry*, 24, 806–813.
- Hui, S. W., Cowden, M., Papahadjopoulos, D., und Parsons, D. F. (1975). Electron diffraction study of hydrated phospholipid single bilayers. Effects of temperature, hydration and surface pressure of the precursor monolayer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 382, 265–275.
- Ichimori, H., Hata, T., Yoshioka, T., Matsuki, H., und Kaneshina, S. (1997). Thermotropic and barotropic phase transition on bilayer membranes of phospholipids with varying acyl chain-lengths. *Chemistry and Physics of Lipids*, 89, 97–105.
- Jacobson, K., Sheets, E. D., und Simson, R. (1995). Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science*, 268, 1441–1442.
- Janiak, M. J., Small, D. M., und Shipley, G. G. (1976). Nature of the thermal pretransition of synthetic phospholipids: dimyristoyl- and dipalmitoyllecithin. *Biochemistry*, 15(21), 4575–4580.
- Jin, A. J., Mudd, C. P., und Gershfeld, N. L. (1998). Unusual structural transformations in large unilamellar vesicle suspensions of dmpc by cp lambda-1 calorimetry. *Biophysical Journal*, 74(2), A312.
- Jolicoeur, C. (1981). Thermodynamic flow methods in biochemistry. In D. Glick (Hrsg.), *Methods of Biochemical Analysis* (246–251). New York: Wiley.
- Jyoti, A., Prokop, R. M., Li, J., Vollhardt, D., Kwok, D. Y., Miller, R., Möhwald, H., und Neumann, A. W. (1996). An investigation of the compression rate dependence on the surface pressure-surface area isotherms for a dipalmitoyl phosphatidylcholine monolayer at the air/water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 116, 173–180.
- Kinnunen, P. K. J. (1991). On the principles of functional ordering in biological membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 57, 375–399.

- Köberl, M., Hinz, H.-J., und Rapp, G. (1997). Enthalpy is a proper criterion for comparability of monolayer and bilayer studies: isobaric temperature scanning measurements on glycolipid monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 85, 23–43.
- Kohlrausch, F. (1985). *Praktische Physik*, Band 2. Stuttgart: Teubner, 23. Auflage.
- Kohlrausch, F. (1996). *Praktische Physik*, Band 1. Stuttgart: Teubner, 24. Auflage.
- Kratky, O., Leopold, H., und Stabinger, H. (1969). Determination of density of liquids and gases to an accuracy of 10^{-6} g/cm³, with a sample volume of only 0,6 cm³. *Zeitschrift für Angewandte Physik*, 27(4), 273–277.
- Kratky, O., Leopold, H., und Stabinger, H. (1973). The determination of the partial specific volume of proteins by the mechanical oscillator technique. In C. W. H. Hirs und S. N. Timasheff (Hrsg.), *Methods in Enzymology Vol. XXVII*, Nummer 27 (98–110). London: Academic Press.
- Laggner, P. und Kriechbaum, M. (1991). Phospholipid phase transitions: kinetics and structural mechanisms. *Chemistry and Physics of Lipids*, 57, 121–145.
- Laggner, P. und Stabinger, H. (1976). The partial specific volume changes involved in the thermotropic phase transitions of pure and mixed lecithins. In M. Kerker (Hrsg.), *Proceedings of the International Conference on Colloids and Surfaces: Colloid and Interface Science Vol. 5 (91–96)*. New York, San Francisco, London: Academic Press.
- Landwehr, A. und Winter, R. (1994). The T,p,x-phase diagram of binary phospholipid mixtures. *Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie*, 98(12), 1585–1589.
- Lasic, D. D. (1988). The mechanism of vesicle formation. *Biochemical Journal*, 256, 1–11.
- Lentz, B. R., Freire, E., und Biltonen, R. L. (1978). Fluorescence and calorimetric studies of phase transitions in phosphatidylcholine multilayers: kinetics of the pretransition. *Biochemistry*, 17(21), 4475–4480.
- Lide, D. R. und Frederikse, H. P. R., Eds. (1996). *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. Boca Raton, New York, London, Tokyo: CRC Press, 77. Auflage.
- Lipowsky, R. (1996). Kooperatives Verhalten von Membranen. *Physikalische Blätter*, 52(6), 555–560.

- Liu, N.-I. und Kay, R. L. (1977). Redetermination of the pressure dependence of the lipid bilayer phase transition. *Biochemistry*, 16(15), 3484–3486.
- Mabrey, S. und Sturtevant, J. M. (1978). High-sensitivity differential scanning calorimetry in the study of biomembranes and related model systems. In E. Korn (Hrsg.), *Methods in Membrane Biology. Vol. 9* (237–274). New York: Plenum Press.
- MacDonald, A. G. (1978). A dilatometric investigation of the effects of general anaesthetics, alcohols and hydrostatic pressure on the phase transition in smectic mesophases of dipalmitoylphosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 507, 26–37.
- MacDonald, R. C. (1996). The relationship and interactions between lipid bilayers vesicles and lipid monolayers at the air/water interface. In M. Rosoff (Hrsg.), *Vesicles* (3–48). New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker.
- MacDonald, R. C., MacDonald, R. I., Menco, B. P. M., Takeshita, K., Subbarao, N. K., und Hu, L.-R. (1991). Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1061, 297–303.
- MacDonald, R. C. und Simon, S. A. (1987). Lipid monolayer states and their relationships to bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 4089–4093.
- Marsh, D. (1986). Spin label esr spectroscopy and molecular mobility in biological systems. In G. Pifat-Mrzljak (Hrsg.), *Supramolecular Structure and Function* (48–62). Heidelberg: Springer.
- Marsh, D. (1991). General features of phospholipid phase transitions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 57, 109–120.
- Marsh, D. (1996). Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1286, 183–223.
- Maruyama, S., Matsuki, H., Ichimori, H., und Kaneshina, S. (1996). Thermotropic and barotropic phase behavior of dihexadecylphosphatidylcholine bilayer membrane. *Chemistry and Physics of Lipids*, 82, 125–132.
- Melchior, D. L., Scavitto, F. J., und Steim, J. M. (1980). Dilatometry of dipalmitoyllecithin-cholesterol bilayers. *Biochemistry*, 19, 4828–4834.
- Metropolis, N., Rosenbluth, A. W., Rosenbluth, M. N., Teller, A. H., und Teller, E. (1953). Equation of state calculations by fast computing machines. *Journal of Chemical Physics*, 21(6), 1087–1092.

- Möhwald, H. (1995). Phospholipid monolayers. In R. Lipowsky und E. Sackmann (Hrsg.), *Handbook of Biological Physics. Volume 1A. Structure and Dynamics of Membranes: from Cells to Vesicles*. Kapitel 4, (161–212). Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier.
- Möhwald, H., Dietrich, A., Böhm, C., Brezesinski, G., und Thoma, M. (1995). Domain formation in monolayers. *Molecular Membrane Biology*, 12, 29–38.
- Mountcastle, D. B., Biltonen, R. L., und Halsey, M. J. (1978). Effect of anesthetics and pressure on the thermotropic behavior of multilamellar dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(10), 4906–4910.
- Mouritsen, O. G. und Jørgensen, K. (1998). A new look at lipid-membrane structure in relation to drug research. *Pharmaceutical Research*, 15(10), 1507–1519.
- Mui, B. L.-S., Cullis, P. R., Evans, E. A., und Madden, T. D. (1993). Osmotic properties of large unilamellar vesicles prepared by extrusion. *Biophysical Journal*, 64, 443–453.
- Nagle, J. F. und Wilkinson, D. A. (1978). Lecitin bilayers: Density measurements and molecular interactions. *Biophysical Journal*, 23, 159–175.
- Ohki, K., Tamura, K., und Hatta, I. (1990). Ethanol induces interdigitated gel phase ($L_{\beta I}$) between lamellar gel phase ($L_{\beta'}$) and ripple phase ($P_{\beta'}$) in phosphatidylcholine membranes: a scanning density meter study. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1028, 215–222.
- Parente, R. A., Höchli, M., und Lentz, B. R. (1985). Morphology and phase behavior of two types of unilamellar vesicles prepared from synthetic phosphatidylcholines studied by freeze-fracture electron microscopy and calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta*, 812, 493–502.
- Phillips, M. C. und Chapman, D. (1968). Monolayer characteristics of saturated 1,2-diacyl phosphatidylcholines (lecithins) and phosphatidylethanolamines at the air-water interface. *Biochimica et Biophysica Acta*, 163, 301–313.
- Picker, P., Tremblay, E., und Jolicoeur, C. (1974). A high-precision digital readout flow densimeter for liquids. *Journal of Solution Chemistry*, 3(5), 377–384.
- Plotnikov, V. V., Brandts, J. M., Lin, L.-N., und Brandts, J. F. (1997). A new ultrasensitive scanning calorimeter. *Analytical Biochemistry*, 250, 237–244.
- Posch, M., Rakusch, U., Mollay, C., und Laggner, P. (1983). Cooperative effects in the interaction between melittin and phosphatidylcholine model membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 258(3), 1761–1766.

- Rapp, G., Rappolt, M., und Laggner, P. (1993). Time-resolved simultaneous small- and wide-angle x-ray diffraction on dipalmitoylphosphatidylcholine by laser temperature-jump. *Progress in Colloid & Polymer Science*, 93, 25–29.
- Rappolt, M. und Rapp, G. (1996). Structure of the stable and metastable ripple phase of dipalmitoylphosphatidylcholine. *European Biophysics Journal*, 24, 381–386.
- Rogers, P. S. Z. und Pitzer, K. S. (1982). Volumetric properties of aqueous sodium chloride solutions. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 11(1), 15–48.
- Ruocco, M. J. und Shipley, G. G. (1982). Characterization of the sub-transition of hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 691, 309–320.
- Sachse, J.-H., King, M. D., und Marsh, D. (1987). ESR determination of lipid translational diffusion coefficients at low spin-label concentrations in biological membranes, using exchange broadening, exchange narrowing, and dipole-dipole interactions. *Journal of Magnetic Resonance*, 71, 385–404.
- Sachse, J.-H. und Marsh, D. (1986). Line intensities in spin-exchanged nitroxide ESR spectra. *Journal of Magnetic Resonance*, 68, 540–543.
- Sackmann, E. (1995a). Biological membranes: architecture and function. In R. Lipowsky und E. Sackmann (Hrsg.), *Handbook of Biological Physics. Volume 1A. Structure and Dynamics of Vesicles: from Cells to Vesicles*. Kapitel 1, (1–63). Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier.
- Sackmann, E. (1995b). Physical basis of self-organization and function of vesicles: physics of vesicles. In R. Lipowsky und E. Sackmann (Hrsg.), *Handbook of Biological Physics. Volume 1A. Structure and Dynamics of Membranes: from Cells to Vesicles*. Kapitel 5, (213–304). Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier.
- Saran, A., Srivastava, S., Coutinho, E., Wong, P. T. T., und Eibl, H. (1996). Conformation of hexadecylphosphocholine, an anticancer drug, by molecular dynamics and NMR methods. *Journal of Molecular Structure*, 382, 23–31.
- Schneider, M. F. (1999). Diplomarbeit, Georg-August-Universität, Göttingen. *Diese Arbeit ist in Vorbereitung und wird 1999 eingereicht werden.*
- Schneider, M. F., Marsh, D., Jahn, W., Kloesgen, B., und Heimburg, T. (1999). Network formation of lipid membranes - triggering structural transitions by chain melting. *Zur Veröffentlichung eingereicht.*

- Seifert, U. und Lipowsky, R. (1995). Morphology of vesicles. In R. Lipowsky und E. Sackmann (Hrsg.), *Handbook of Biological Physics. Volume 1A. Structure and Dynamics of Membranes: from Cells to Vesicles*. Kapitel 8, (403–463). Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier.
- Sillerud, L. O. und Barnett, R. E. (1978). Lack of transbilayer coupling in phase transitions of phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry*, 21, 1756–1760.
- Simons, K. und Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, 569–572.
- Singer, S. J. und Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175, 720–731.
- Szoka, Jr., F. und Papahadjopoulos, D. (1980). Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 9, 467–508.
- Talmon, Y., Burns, J. L., Chestnut, M. H., und Siegel, D. P. (1990). Time-resolved cryotransmission electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 14, 6–12.
- Tardieu, A., Luzzati, V., und Reman, F. C. (1973). Structure and polymorphism of the hydrocarbon chains of lipids: a study of lecithin-water phases. *Journal of Molecular Biology*, 75, 711–733.
- Tsuchida, K. und Hatta, I. (1988). ESR studies on the ripple phase in multilamellar phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 945, 73–80.
- Umstätter, H., Hrsg. (1952). *Einführung in die Viskosität und Rheometrie*. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer.
- Utoh, S. und Takemura, T. (1985). Phase transition of lipid multilamellar aqueous suspension under high pressure. I. Investigation of phase diagram of dipalmitoyl phosphatidylcholine bimembrane by high pressure-DTA and -dilatometry. *Japanese Journal of Applied Physics*, 24(3), 356–360.
- Van Osdol, W. W., Johnson, M. L., Ye, Q., und Biltonen, R. L. (1991). Relaxation dynamics of the gel to liquid-crystalline transition of phosphatidylcholine bilayers. *Biophysical Journal*, 59, 775–785.
- Veldhuijen, R., Nag, K., Orgeig, S., und Possmayer, F. (1998). The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1408, 90–108.
- Verkade, P. und Simons, K. (1997). Lipid microdomains and membrane trafficking in mammalian cells. *Histochemistry and Cell Biology*, 108, 211–220.

- Wack, D. C. und Webb, W. W. (1989). Synchrotron x-ray study of the modulated lamellar phase $P_{\beta'}$ in the lecithin-water system. *Physical Review A*, 40(5), 2712–2730.
- Walcher, W. (1994). *Praktikum der Physik*. Stuttgart: Teubner, 7. Auflage.
- Wiener, M. C., Tristam-Nagle, S., Wilkinson, D. A., Campbell, L. E., und Nagle, J. F. (1988). Specific volumes of lipids in fully hydrated bilayer dispersions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 938, 135–142.
- Wilkinson, D. A. und Nagle, J. F. (1978). A differential dilatometer. *Analytical Biochemistry*, 84, 263–271.
- Wilkinson, D. A. und Nagle, J. F. (1981). Dilatometry and calorimetry of saturated phosphatidylethanolamine dispersions. *Biochemistry*, 20(1), 187–192.
- Winter, R. und Pilgrim, W.-C. (1989). A SANS study of high pressure phase transitions in model biomembranes. *Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie*, 93, 708–717.
- Wittebort, R. J., Blume, A., Huang, T.-H., Das Gupta, S. K., und Griffin, R. G. (1982). Carbon-13 nuclear magnetic resonance investigation of phase transitions and phase equilibria in pure and mixed phospholipid bilayers. *Biochemistry*, 21, 3487–3502.
- Wittebort, R. J., Schmidt, C. F., und Griffin, R. J. (1981). Solid state carbon-13 nuclear magnetic resonance of the lecithin gel to liquid-crystalline phase transition. *Biochemistry*, 20, 4223–4228.
- Wong, P. T. T., Siminovitch, D. J., und Mantsch, H. H. (1988). Structure and properties of model membranes: new knowledge from high-pressure vibrational spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 947, 139–171.
- Woodward, J. T. I. und Zasadzinski, J. A. (1996). Amplitude, wave form, and temperature dependence of bilayer ripples in the $P_{\beta'}$ phase. *Physical Review E*, 53(4), R3044–R3047.