

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 1999 und 2000 am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Heimbürg, in dessen Arbeitsgruppe „Membranthermodynamik“ ich meine Diplomarbeit anfertigen konnte. Ich danke ihm für die Betreuung der Arbeit, die wichtigen Anregungen und die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen. Des weiteren gilt mein Dank Herrn Professor Kree für die Betreuung der Arbeit von Seiten der Universität Göttingen. Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Membranthermodynamik danke ich für die schöne Zeit und die Hilfe bei der Endredaktion der Arbeit. Frau Fabiana Ganz war so freundlich, mir bei den Lichtstreuexperimenten behilflich zu sein. Bei den Mitarbeitern der Feinmechanik- und Elektrowerkstätten möchte ich mich für die immer schnelle und kompetente Hilfe bedanken, ebenso bei Herrn Martin Fechner für die Hilfsbereitschaft in Computerfragen.

Göttingen im März 2001

Peter Grabitz

## Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, dynamische Vorgänge in Phospholipidmembranen zu untersuchen. Messungen an einfachen Phospholipidmembranen wurden genutzt, um auf komplexere Vorgänge in biologischen Membranen zu schließen. Theoretische Überlegungen sagen eine Proportionalität zwischen Wärmekapazität und Relaxationszeit in das thermodynamische Gleichgewicht voraus. Mit wenigen Annahmen wird für die Relaxationszeit gefunden:

$$\tau \propto T^3 \cdot C_p^{-1}$$

Zur Überprüfung dieser theoretischen Annahme wurde mit Hilfe von Drucksprüngen ein thermodynamisches Ungleichgewicht induziert und die exponentielle Relaxation ins Gleichgewicht im Kalorimeter beobachtet. In der Umwandlung wurden wesentlich höhere Zeiten gefunden als außerhalb; die theoretische Vorhersage der Proportionalität zwischen Wärmekapazität und Relaxationszeiten konnte bestätigt werden. Um für neue Lipidsysteme Vorhersagen für die Relaxationszeit alleine aus dem kalorimetrischen Profil gewinnen zu können, wurde eine Proportionalitätskonstante bestimmt. Mit Hilfe dieser kann auf das Relaxationsverhalten in biologischen Membranen geschlossen werden. Exemplarisch durchgeführt wurde dies an der Membran Lungensurfactant, dem Oberflächenfilm der Lunge, in welchem breite Umwandlungen stattfinden. Des weiteren wurden Lipidsysteme untersucht, welche mit der Temperatur von einer vesikulären Struktur in eine netzwerkartige Struktur übergehen. Die Bildung dieses Netzwerkes lässt sich durch verschiedene Parameter wie Natriumionenkonzentration und pH, aber auch durch Druck steuern. In Membranen, welche diese Gestaltumwandlung normalerweise nicht eingehen, war es möglich, diese durch Zugabe bestimmter Stoffe zu induzieren. Die biologische Relevanz dieses Prozesses, beispielsweise bei der Fusion von Vesikeln mit der präsynaptischen Membran, wurde diskutiert.

---

<sup>1</sup> $\tau$  : Relaxationszeit, T: absolute Temperatur,  $C_p$ : Wärmekapazität

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Membranen in der belebten Natur . . . . .	5
1.2	Künstliche Membranen als Modelle . . . . .	7
1.2.1	Thermodynamische Eigenschaften . . . . .	8
1.2.2	Strukturelle Umwandlungen . . . . .	10
1.2.3	Relaxationen in Lipidmembranen . . . . .	11
1.3	Biologische Relevanz . . . . .	11
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1	Differentialkalorimetrie . . . . .	13
2.2	Hochdruckkalorimetrie . . . . .	15
2.3	Drucksprungkalorimetrie . . . . .	15
2.3.1	Auswertung von Relaxationsdaten . . . . .	17
2.4	Viskosimetrie . . . . .	21
2.4.1	Zur Newtonschen Viskosität . . . . .	21
2.4.2	Flüssigkeiten mit elastischem Anteil: Maxwellmodell . .	23
2.5	Dynamische Lichtstreuung . . . . .	28
2.6	Materialien und Präparation der Proben . . . . .	29
<b>3</b>	<b>Theorie</b>	<b>31</b>
3.1	Elastische Eigenschaften von Membranen . . . . .	31
3.2	Lipidmembranen unter äusserem Druck . . . . .	33
3.3	Strukturelle Umwandlungen im kalorimetrischen Profil . . . .	34
3.4	Relaxationen ins thermodynamische Gleichgewicht . . . . .	37
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
4.1	Thermodynamische Relaxationen . . . . .	39
4.1.1	Relaxationen in multilamellaren DMPC-Membranen . .	42

4.1.2	Relaxationen in multilamellaren DPPC-Membranen . .	46
4.2	Biomembranen . . . . .	50
4.2.1	Lungsurfactant . . . . .	50
4.3	Netzwerke von Lipidmembranen . . . . .	56
4.3.1	Wärmekapazität von DMPG unter Druck . . . . .	56
4.3.2	Membrannetzwerke . . . . .	58
4.3.3	Einfluss von NaCl auf Membrannetzwerke . . . . .	65
4.4	Viskoelastische Eigenschaften von DMPG-Membranen . . . . .	68
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
5.1	Relaxationszeiten in Lipidmembranen . . . . .	79
5.2	Kalorimetrie an Lungsurfactant . . . . .	82
5.3	Netzwerke in Lipidmembranen . . . . .	84

# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Membranen in der belebten Natur

Überall in der Natur begegnen wir Membranen. Diese ermöglichen es in einem wie auch immer gearteten biologischen Reaktionsraum ein Innen und ein Außen zu definieren. Durch sie werden Zellen begrenzt, Zellorganellen wie Mitochondrien und Golgi-Apparat sind von ihnen umgeben. Der Transport von Information in komplexeren Lebewesen findet entlang von langgezogenen Membranröhren, den Axonen statt. Wesentlich bei dieser Form der Informationsverarbeitung ist die gesteuerte Ausschüttung von Botenstoffen an der Synapse, der Kontaktstelle zwischen Nervenzellen. Die Synapse selbst sowie die Botenstoffe transportierenden „Behältnisse“ bestehen aus Membranen. Geprägt wird die Vorstellung über Membranen von einem Modell, das zuerst von Singer und Nicolson 1972 vorgeschlagen wurde [25]. Nach diesem Modell ist die biologische Membran aufgebaut aus einer Doppelschicht von Phospholipiden (s.u.), in welcher Proteine verankert sind (s. Abb. 1.1). Membranproteine katalysieren beispielsweise Reaktionen an der Membran, oder steuern den molekularen Transport von Ionen über die Membran.

Phospholipide, die wesentlichen Bausteine einer Membran, sind kleine, amphiphile Moleküle, d.h., sie haben sowohl einen polaren als auch einen unpolaren Teil. Der polare Teil des Lipids wird in der Regel als „Kopfgruppe“ bezeichnet. Der unpolare besteht aus (meist zwei) Kohlenwasserstoffketten. In Abbildung 1.1 ist der prinzipielle Aufbau eines Phospholipides dargestellt. Für die unpolaren Kohlenwasserstoffketten ist es energetisch ungünstig, dem Wasser ausgesetzt zu sein. Umgekehrt ist letzteres für die Kopfgruppen auf-

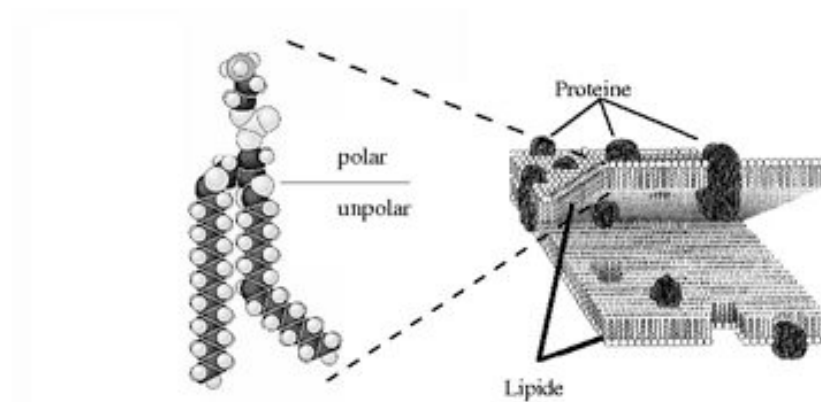


Abbildung 1.1: Ein typisches Phospholipid mit einer polaren Kopfgruppe und unpolaren Kohlenwasserstoffketten. Die energetisch günstigste Konfiguration der Lipide in Wasser ist die einer Doppelschicht, in der die unpolaren Kohlenwasserstoffketten einander zugewandt und die polaren Kopfgruppen dem ebenfalls polaren Wasser ausgesetzt sind.

grund ihrer Polarität günstig. Lipide ordnen sich deshalb in Wasser, dem Hauptbestandteil eines jeden Lebewesens, in Doppelschichten an, in welchen die Kohlenwasserstoffketten einander zugekehrt und die Kopfgruppen nach zwei Seiten dem Wasser zugewandt sind („Hydrophober Effekt“). Die so entstandene Schicht bildet die Grundlage einer jeden biologischen Membran.

In der jüngeren Vergangenheit mehren sich die Hinweise, dass das Modell von Singer und Nicolson, welches die Phospholipidmembran zu einem reinen Stützgerüst degradiert, einer Erweiterung bedarf. So bestehen Membranen aus einer Vielzahl verschiedener Lipide, deren Komposition je nach Aufgabenbereich teilweise stark variiert. Wachsen z.B. Hefen und bestimmte Bakterien bei verschiedenen Temperaturen, so passen sie ihre Lipidkomposition den veränderten Bedingungen an [3]. Die elastischen Eigenschaften von Lungensurfactant, dem Film, welcher Lungenbläschen von der umgebenden Luft trennt, hängen wesentlich von ihrer Lipidzusammensetzung ab [4]. Nicht alle Proteine sind in der Membran von Lipiden gleicher Zusammensetzung umgeben; bestimmte Proteine haben immer dieselbe Lipidumgebung. Damit wird nicht

nur eine Einteilung der Oberfläche in verschiedene Regionen ermöglicht, unter bestimmten Bedingungen ist sogar ein gerichteter Transport vorstellbar [5]. All dies weist darauf hin, dass Lipide in der Membran wesentlich mehr zu leisten haben, als ein Außen und ein Innen zu definieren und ein Gerüst für Proteine zu bilden. Die Untersuchung spezifischer Membraneigenschaften ist somit für das Verständnis biologischer Prozesse unerlässlich.

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass der prinzipielle Aufbau für alle in höheren Tieren gefundenen Membranen mehr oder weniger identisch ist, ja selbst für Membranen in Pflanzen und Bakterien können strukturelle Ähnlichkeiten festgestellt werden. Somit sollte es möglich sein, mit Hilfe von Erkenntnissen, beispielsweise zu mechanischen Eigenschaften, an einfachen Membranmodellen auf Vorgänge in komplexeren biologischen Membranen rückzuschließen [6].

## 1.2 Künstliche Membranen als Modelle

Die Vielzahl verschiedener Lipide in einer biologischen Membran und deren Wechselwirkung mit einer noch viel größeren Zahl verschiedener Proteine ist für eine Erforschung prinzipieller Eigenschaften von Vorgängen zu komplex. Versucht wird deshalb, von künstlich hergestellten Lipidmembranen bestehend aus einer einzigen oder nur wenigen Lipidsorten ohne oder mit nur einer einzigen Proteinsorte, auf prinzipielle Vorgänge zu schließen.

Lipide unterscheiden sich untereinander vom physikalischen Standpunkt aus gesehen durch folgende Eigenschaften:

- Größe und Ladungseigenschaften der Kopfgruppe. Diese kann geladen, zwitterionisch oder auch neutral sein.
- Anzahl der Kohlenstoffatome in den Ketten. Diese schwankt für die meisten Lipide zwischen 16 und 24.
- Anzahl der Doppelbindungen in den Ketten (zwischen 0 und 6).

Dies führt zu ganz unterschiedlichen Eigenschaften verschiedener Lipidmembranen. Künstliche Membranen aufgebaut aus einer kontrollierten Zusammensetzung von Lipiden, versprechen genaueren Aufschluss über spezifische Lipideigenschaften in biologischen Systemen. Eine Möglichkeit des Zugangs

mit den Methoden der Physik bietet sich in der Untersuchung wenig komplexer Modellsysteme. Insbesondere der Vielteilchencharakter der Lipidmembran bietet Ansätze einer theoretischen Behandlung mit Hilfe der Statistischen Physik. Insbesondere die mit der Statistischen Physik verknüpfte experimentelle Thermodynamik bietet Möglichkeiten des Zugangs, beispielsweise über kalorimetrische Messungen, welche Größen wie Enthalpie- und Entropieänderungen in der Membran direkt zugänglich machen.

### 1.2.1 Thermodynamische Eigenschaften

Lipide bilden in Wasser im einfachsten Falle Doppelschichten, welche sich zu vielschichtigen kugelförmigen Objekten, sogenannten Vesikeln, organisieren. Wärmekapazitäten von Lipidsuspensionen, aufgetragen über der Temperatur, zeigen ausgeprägte Maxima, welche mit Schmelzumwandlungen verknüpft werden. Bei einer näheren Betrachtung dieser Schmelzumwandlungen zeigt sich, dass in C-C Bindungen der Ketten eine Drehung um die Bindung angeregt werden kann, was mit einer Aufnahme von Wärme verbunden ist (s. Abb. 1.2). Für jede C-C Bindung existieren drei Drehwinkel, bei denen die Energie ein Minimum annimmt. Der Winkel mit der absoluten minimalen Energie wird als Trans-Konformation bezeichnet, die beiden anderen Minima gleicher Energie als  $\text{Gauche}^+$  bzw.  $\text{Gauche}^-$ -Konformation. Sind alle C-C Bindungen einer Kette in der Trans-Konformation, so spricht man von einer All-Trans Konfiguration. Die Kette befindet sich in einem Zustand minimaler Energie. Befinden sich die Kohlenwasserstoffketten aller Lipide in dieser Konfiguration, so spricht man von einer Gel-Phase der Membran, bzw. abgekürzt von einer  $L_\beta$ -Phase. Werden mit einer Temperaturerhöhung nach und nach in allen Ketten  $\text{Gauche}^-$  Konfigurationen angeregt, so spricht man von einer Flüssig-Kristallinen ( $L_\alpha$ ) Phase [7]. Abbildung 1.3 zeigt diesen Vorgang schematisch. Mit der Schmelzumwandlung einher geht nicht nur eine Aufnahme von Enthalpie durch die veränderte atomare Umgebung der Kettenatome, sondern auch eine Erhöhung der Entropie, da die Kette nun eine größere Anzahl von Anordnungsmöglichkeiten hat. Ferner ist die Umwandlung mit einer Verringerung der Membrandicke und einer Erhöhung des Volumens von Vesikeln verbunden. Das Schmelzen einzelner Lipide ohne kooperative Effekte, d. h. zwischen den Lipiden findet keine Wechselwirkung statt, führt zu einer breiten Umwandlung von ca. 60 K– erst nach und nach werden alle Rotationsfreiheitsgrade angeregt. Die mit der Aufnahme von Wärme verbundene Umwandlung in den Kohlenwasserstoffketten kann in einer kalorimetrischen



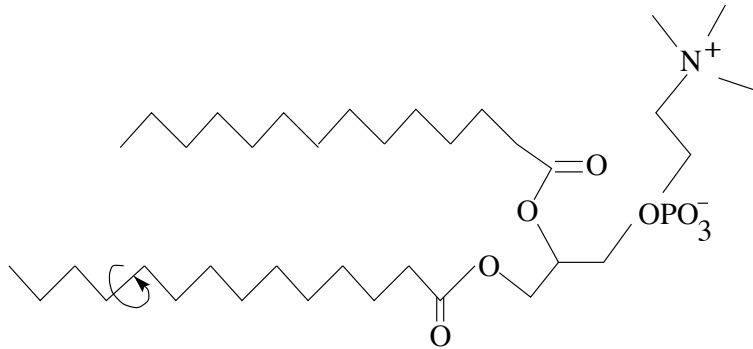


Abbildung 1.2: Schematische Zeichnung des Phospholipides DMPC (Dimyristoyl-phosphatidyl-cholin). Die Kohlenwasserstoffketten befinden sich hier in der All-Trans Konfiguration der minimalen Energie. Der Pfeil soll einen möglichen Rotationsfreiheitsgrad andeuten.

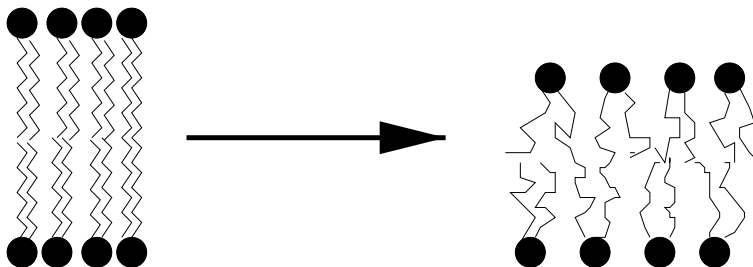


Abbildung 1.3: Eine Phospholipidmembran geht aus einer Tieftemperaturphase  $L_{\beta'}$ , in der sich die Kohlenwasserstoffketten in der All-Trans Konfiguration befinden, in eine Hochtemperatur  $L_{\alpha}$ -Phase über, in der die Ketten ungeordnet sind.

Messung als Erhöhung der Wärmekapazität verfolgt werden. Membranen nur einer Lipidsorte schmelzen meist mit einem extrem schmalen Maximum in der Wärmekapazität. So ist die Umwandlung des oben vorgestellten Lipides DMPC lediglich  $\approx 0,2$  K breit. Lipide dieser Membranen bilden Multischichten aus, mehrere Lagen von Doppelschichten, sogenannte multilamellare Vesikel. Die einzelnen Schichten und die Ketten der Phospholipide in den Schichten beeinflussen sich gegenseitig und schmelzen damit nicht mehr unabhängig voneinander, sondern tun dies kooperativ, praktisch gleichzeitig. Vor der eigentlichen Umwandlung ist bei einigen Systemen ein weiteres Maximum in der Wärmekapazität zu finden, welches mit der Aufnahme von wesentlich weniger Enthalpie verbunden ist. Diese sogenannte Vorumwandlung ist entgegen früherer Annahmen keine eigene Schmelzumwandlung sondern wie die Hauptumwandlung ein Aufschmelzen in den Kohlenwasserstoffketten. In der Literatur wird diese Phase oft als „Rippelphase“ bezeichnet [14].

Fluktuationen der Enthalpie und des Volumens um einen Gleichgewichtswert werden in der Umwandlung besonders groß. Mit Hilfe der Fluktuationen kann auf veränderte Werte von Flächen- und Volumenkompressibilität und Elastizität in der Umwandlung geschlossen werden [8][9][10]. Sind die genauen Zusammenhänge zwischen Umwandlung und mechanischen Eigenschaften bekannt, so können diese Größen direkt aus einer Messung der Wärmekapazität bestimmt werden. Oftmals ist es möglich, Lage und Form von Umwandlungen von außen zu beeinflussen, sei es durch eine Veränderung der elektrostatischen Eigenschaften des Mediums, sei es durch die kontrollierte Mischung mit anderen Lipiden. Damit wird es möglich, für eine bestimmte Temperatur Größen wie Kompressibilität und Elastizität der Membran gezielt einzustellen.

### 1.2.2 Strukturelle Umwandlungen

Neben der „einfachen“ Umwandlung, welche in erster Linie Ordnungsumwandlungen von Kohlenwasserstoffketten entspricht, können in der Membran kompliziertere Umwandlungen stattfinden, welche mit einer Änderung der Membrangestalt verbunden sind. Unter bestimmten Bedingungen kann es zu Änderungen der Form der Membran kommen. Sackmann und Käs zeigen eindrucksvoll, dass sich in Erythrozytenmembranen biochemisch induzierte Formvariabilität in einem einkomponentigen Lipidsystem durch die Veränderung des Volumen- zu Fläche- Verhältnisses der Membran ebenfalls induzieren lässt [11]. Strukturelle Umwandlungen treten in der Biologie vielfach auf

und sind in ihrem physikalischen Ablauf oft wenig verstanden, so zum Beispiel bei der Fusion und Teilung von Zellen und Zellkernen, bei der Exo- und Endocytose an der Synapse von Nervenzellen oder auch bei der ständigen Formveränderungen der Fortbewegung von Amöben. Formen von Membrangebilden können unter anderem beeinflusst werden durch das Verändern einfacher Parameter wie Membranpotential,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^{+}$ -Konzentration, pH-Wert und durch die Lipidzusammensetzung [12][29]. In dieser Arbeit soll der Übergang zwischen verschiedenen Membrantopologien eines einkomponentigen Lipidsystemes vorgestellt werden und die Induktion dieses Überganges durch verschiedene Parameter dargelegt werden. Ist die Formänderung in der Membran mit einer Wärmeänderung verbunden, wird es möglich, diese im Kalorimeter nachzuweisen. Auch hier bietet das Wärmekapazitätsprofil die Möglichkeit, Informationen über das System zu gewinnen. Der Einfluss äußerer Bedingungen auf Übergänge wird so einfach nachweisbar.

### 1.2.3 Relaxationen in Lipidmembranen

Über die kinetischen Eigenschaften insbesondere an der Schmelzumwandlung ist sehr viel weniger bekannt als zu statischen. Wie schnell reagiert eine Membran auf äußere Einflüsse, wie schnell geschehen Umordnungsprozesse verschiedener Phasen und wie ist dadurch zum Beispiel die biologisch relevante Umgebung beeinflusst? Katalytische Reaktionen von Membranproteinen können nicht unabhängig von dynamischen Eigenschaften der sie umgebenden Membran gesehen werden. Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Methode vorgestellt werden, die es erlaubt, Relaxationszeiten in das thermodynamische Gleichgewicht in der Schmelzumwandlung zu bestimmen. Diese Relaxationen sind mit mechanischen Eigenschaften der Membran gekoppelt. Insbesondere soll gezeigt werden, dass an der Schmelzumwandlung stark erhöhte Zeiten auftreten.

## 1.3 Biologische Relevanz

Umwandlungen, die mit einer Wärmeänderung einhergehen, treten auch in Biomembranen auf. Ist es möglich, zu zeigen, dass die freigewordene Wärme in erster Linie aus der Lipidmembran kommt, sollte es möglich sein, Erkenntnisse aus Messungen am Modell zu übertragen. Mittels einer Triggerung der Umwandlungstemperatur durch den Organismus, wie sie von Messungen am

Modell bekannt sind, sollten die oben aufgeführten Grössen wie Elastizität und Relaxationszeiten aktiv ansteuerbar werden. Messungen an biologischen Membranen zeigen, dass Lipidumwandlungen auftreten können, bezeichnenderweise häufig in der Nähe der Körpertemperatur.

Ziel dieser Arbeit ist es, Relaxationszeiten in das thermodynamische Gleichgewicht in der Umwandlung von Phospholipidmembranen zu bestimmen und die Ergebnisse dieser Messungen auf biologische Systeme zu übertragen. Ferner sollen mechanische Eigenschaften eines Membrannetzwerkes und die Bedingungen seiner Entstehung untersucht werden.

# Kapitel 2

## Materialien und Methoden

### 2.1 Differentialkalorimetrie

Kalorimetrie ist für die Untersuchung thermotroper Umwandlungen in Makromolekülen von großer Bedeutung. Ein Wärmekapazitätsprofil enthält die komplette thermodynamische Information einer Umwandlung. Größen wie Umwandlungsenthalpie, -entropie und Zustandsfunktion werden bestimmbar [22][23]. Das verwendete Differentialkalorimeter VP-DSC (DSC: Differential Scanning Calorimeter) der Firma Microcal (Northhampton/MA, USA) besteht im Wesentlichen aus zwei befüllbaren Zellen (für Probe und Referenzsubstanz), umgeben von einem „adiabatischen Schild“. Die Temperatur des adiabatischen Schildes wird mit einer vorzugebenden Rate vom Gerät verändert. Gleichzeitig wird die Temperaturdifferenz  $\Delta T$  zwischen beiden Zellen ständig ausgeglichen. Der Unterschied zwischen den Zellen in der zu- bzw. abgeführten Leistung  $\Delta P$  wird aufgezeichnet. Bei bekannter Rate der Temperaturänderung  $\frac{\Delta T}{\Delta t}$  ist der Unterschied in der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  einfach bestimmbar:

Für die Wärme gilt:

$$\Delta Q = \int_t^{t+\Delta t} \Delta P dt \simeq \Delta P \Delta t \quad (2.1)$$

Für die Wärmekapazität gilt:

$$\Delta C_p := \left( \frac{\partial Q}{\partial T} \right)_p \simeq \frac{\Delta Q}{\Delta T} \simeq \frac{\Delta P}{\frac{\Delta T}{\Delta t}} \quad (2.2)$$

Ansteuerung des Gerätes und Auslesen der Messwerte erfolgen über einen Personal Computer unter einem von Microcal entwickelten Steuerprogramm. Hier ist es unter anderem möglich, dem Kalorimeter vorzugeben, über wieviele Messwerte es mitteln soll („Filter“) und wie schnell es auf Veränderungen aus der Probe zu reagieren hat („Feedback“). Der Filter glättet die Kurve, was allerdings in bestimmten Situationen, z.B. bei sehr schmalen Umwandlungen, zu Informationsverlusten führen kann. Das Feedback (none, low, mid, high) legt fest, wie stark das Gerät auf beginnende Veränderungen reagieren soll. Das kann bei einem Messfehler dazu führen, dass dieser verstärkt wird, führt aber bei einem echten Anstieg der Kurve zu einer verbesserten Reaktion des Kalorimeters. Die Messungen erfolgten, soweit nicht anders angegeben, mit einem „High-Feedback“. Zur Messung wird die Probe auf einen definierten Druck von ca. 50 psi (pound per square inch, 1 psi  $\approx$  0,07 bar) gebracht. Das verwendete Kalorimeter gilt momentan als eines der besten auf dem Markt, sowohl bezüglich der Sensitivität als auch bezüglich des Signal- zu Rauschverhältnisses, der Stabilität der Nulllinie und des geringen Messvolumens.

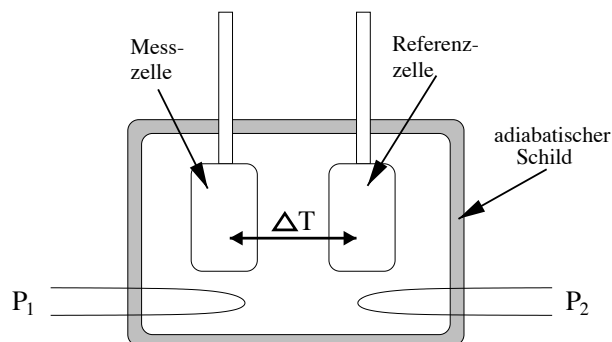


Abbildung 2.1: Aufbau des DSC (Differential Scanning Calorimeter). Die Zellen werden von oben mit Mess- bzw. Referenzsubstanz befüllt. Die Temperatur wird mit einer vorzugebenden Rate verändert. Das Kalorimeter gleicht ständig die Temperatur zwischen beiden Zellen aus. Aus der Differenz der den Zellen zugeführten Leistung ergibt sich die Wärmekapazität.

## 2.2 Hochdruckkalorimetrie

Für Messungen unter Druck ist das beschriebene Kalorimeter aufgrund seiner dünnen Zellwände nicht geeignet. Um diesen Parameter dennoch untersuchen zu können, wurde ein Zusatzgerät entwickelt. Das VP-DSC ist so empfindlich, daß eine probengefüllte Kapillare in der wassergefüllten Messzelle ausreicht, um zufriedenstellende Kurven zu erhalten. Eine solche Kapillare wurde an ein System angelötet, welches über eine 200 bar Stickstoffflasche unter Druck gesetzt werden kann (s. Abb. 2.2). Ein Druckminderer der Firma Messer Griesheim (Frankfurt, Deutschland) ermöglicht einen variablen Druck von 0..200 bar, ein flexibler Schlauch führt zu einem hochdichten Ventil, über welches das System dem Druck ausgesetzt wird; flexible Zuleitung und sämtliche Ventile stammen von Nova Swiss (Effretikon, Schweiz). Die Ventile wurden wegen ihrer hohen Dichtigkeit auch über Tage hinweg ausgewählt, nachdem Produkte anderer Firmen keine zufriedenstellenden Ergebnisse geliefert hatten [26]. Der flexible Druckschlauch derselben Firma zeigte ähnlich gute Eigenschaften. Er ist ausgelegt auf einen Arbeitsdruck von 1800 bar und erreicht einen Biegeradius von 13 mm. Eine flexible Verbindungskapillare zur Messkapillare ermöglicht ein leichtes Einführen in die Kalorimeterzelle. An dem System ist zusätzlich ein Druckaufnehmer (EBM 6045, ebenfalls von Nova Swiss) angebracht, welcher über vier druckabhängige Widerstände mit einer Genauigkeit von 0,1 bar mißt. Um für Messdaten aus der Druckzelle absolute Wärmekapazitäten zu erhalten, muss die Kurve integriert und die erhaltene, unskalierte Enthalpie mit Hilfe von Werten derselben Substanz aus normalen kalorimetrischen Messungen reskaliert werden, da die Menge der in der Messzelle vorhandenen Substanz meist nicht genau bekannt ist. Der zu Beginn der Messung eingestellte Druck variiert leicht mit der Temperatur, was zu keiner erkennbaren Veränderung der Kurve führt. Die Erfahrung zeigt, dass der Wärmeabfluss über die Kapillare während der Messung ebenfalls vernachlässigbar ist.

## 2.3 Drucksprungkalorimetrie

Mit der oben beschriebenen Anordnung zur Hochdruckkalorimetrie werden Experimente mit sich veränderndem Druck möglich. Das beschriebene Kalorimeter VP-DSC kann außer in dem oben beschriebenen auch in einem isothermen Modus betrieben werden. Hierbei hält das Kalorimeter eine einge-

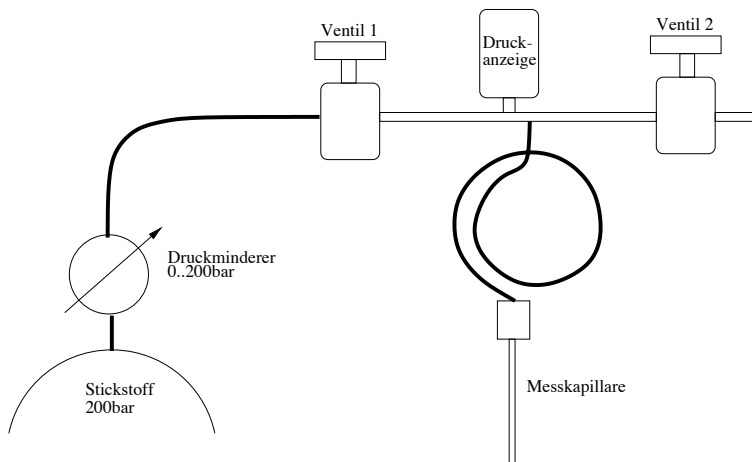


Abbildung 2.2: Um Kalorimetrie unter Druck betreiben zu können, wurde eine Kapillare an ein System gelötet, welches über eine Stickstoffflasche mit Druckminderer unter einen definierten Druck gesetzt werden kann. Ventil 1 setzt das System dem Druck aus, über Ventil 2 kann der Druck abgelassen werden. Die Anzeige ermöglicht ein Ablesen des Druckes auf 0,1 bar genau. Die befüllte Kapillare wird in die wassergefüllte Messzelle des Kalorimeters eingeführt.

stellte Temperatur und zeichnet die hierfür benötigte Leistung über der Zeit auf. Ein plötzliches Verändern des Druckes führt zu einer Wärmeveränderung im System, welche das Gerät ausgleicht. Um den Temperaturwert zu halten, liefert es Energie ins System nach bzw. führt diese ab. Dieser Vorgang soll genutzt werden, um Verzögerungen in der Leistungsaufnahme von Lipidmembranen sichtbar zu machen. Der Druck fällt nach eigenen Messungen in weniger als 100 ms ab. Das Kalorimeter selbst gibt Leistungswerte gemittelt über eine Sekunde aus.

Es ist bekannt, dass Schmelzprofile unter Druck gegenüber dem druckfreien Profil zu höheren Temperaturen hin verschoben sind [26]. Ein Druckunterschied von 40 bar entspricht dabei ungefähr einer Verschiebung um 1 K. Zur Messung wird das Kalorimeter im isothermen Modus bei einer Temperatur in der Schmelzumwandlung der druckfreien Lipidprobe gehalten (Abbildung 2.4). Die Messkapillare wird typischerweise unter 40 bar gesetzt. Das System befindet sich nun unterhalb der Schmelzumwandlung. Durch ein plötzliches



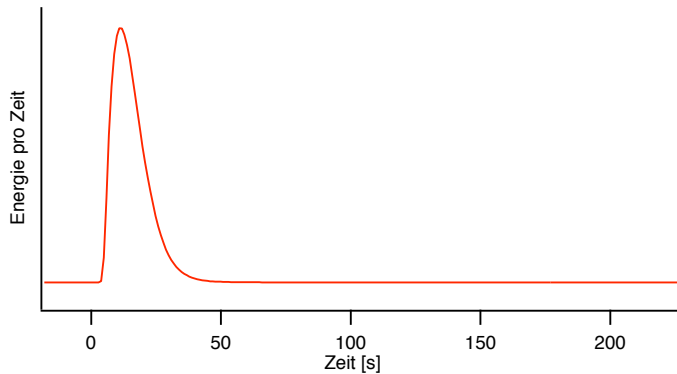


Abbildung 2.3: Antwort des Kalorimeters auf einen Drucksprung von -40 bar im isothermen Modus

Ablassen des Druckes springt das System in die Schmelzumwandlung, das Lipid nimmt Schmelzwärme auf. Die Geschwindigkeit dieser Aufnahme ist verzögert, das System braucht Zeit, um in das thermodynamische Gleichgewicht zu relaxieren. Ein Beispiel einer Antwort des Kalorimeters auf solch einen drucksprung ist in Abbildung 2.4 dargestellt. Ebenso ist natürlich das umgekehrte Vorgehen möglich, bei dem eine Temperatur in der Umwandlung unter Druck angesteuert wird und das druckfreie System plötzlich unter Druck gesetzt wird („positiver“ Drucksprung).

### 2.3.1 Auswertung von Relaxationsdaten

Um von den Rohdaten des Kalorimeters zu absoluten Relaxationszeiten der Lipide zu kommen, müssen die Daten von der Gerätefunktion entfaltet werden. Als erfolgreichste Strategie stellte sich heraus, eine „Wasserantwort“ d.h. eine Drucksprungantwort ohne Lipid mit einer Ratengleichung zu beschreiben.  $x, y, z$  sind zeitabhängige Funktionen, die die Wärme in Wasser, Zellwand und Detektor beschreiben.  $l$  und  $m$  sind Ratenkonstanten, welche den Wärmefluss beschreiben.



Dies führt zu dem Differentialgleichungssystem:

$$\dot{x} = -lx \quad (2.4)$$

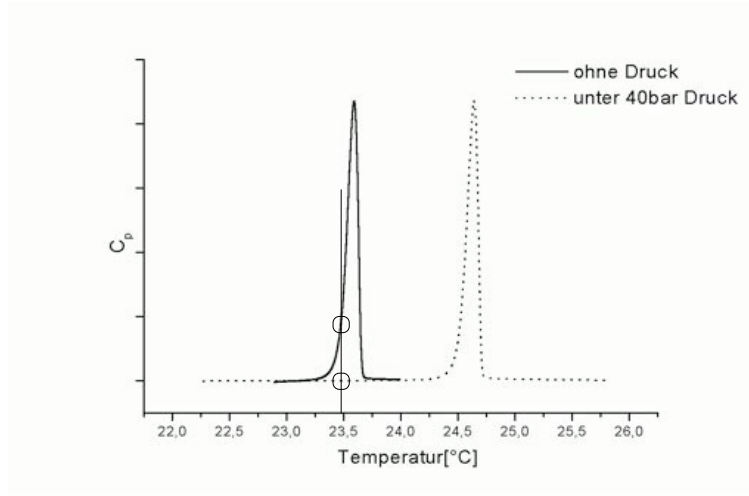


Abbildung 2.4: Das Kalorimeter hält die Temperatur an einem Punkt in der druckfreien Schmelzumwandlung. Die Probe selbst steht unter Druck, ihr Zustand ist unterhalb der Schmelzumwandlung. Ein schnelles Ablassen des Druckes führt zu einem plötzlichen Aufschmelzen der Lipide.

$$\dot{y} = lx - my$$

$$\dot{z} = my$$

Mit den Randbedingungen  $X_0 = x(0) \neq 0$ ,  $Y_0 = y(0) = 0$  findet man eine Lösung für die Antwort am Detektor:

$$\dot{z} = c \cdot (e^{-mt} - e^{-lt}), \quad c = \text{const} \quad (2.5)$$

Dies wird interpretiert als die Reaktion des Messinstrumentes auf einen „Wärmedeltapuls“, soll heißen auf einen in der relevanten Zeit schmalen Wärmepeak. Das Lipid produziert exponentiell verzögert ebenfalls Wärme bzw. nimmt diese auf (s. dazu Theorieteil 3.4). Dieser Anteil wird zusammengesetzt gedacht aus vielen schmalen Rechteckpulsen der Breite  $\tau$ , welche wiederum zu Antworten nach Gleichung (2.5) führen. Die Lipidantwort wird somit zu:

$$\sum_{n=0}^{\infty} v(\tau) \cdot e^{-kn\tau} \Theta(t - n\tau) [e^{-m(t-n\tau)} - e^{-l(t-n\tau)}] + c \cdot (e^{-mt} - e^{-lt}) \quad (2.6)$$

$v(\tau)$  ist eine anzupassende Größe, welche mit der durch die Lipidumwandlung

freigesetzten Enthalpie über

$$\Delta H = v(\tau) \cdot \sum_{n=0}^{\infty} e^{-kn\tau}$$

zusammenhängt.  $k$  ist die Ratenkonstante, welche aus dem Lipid kommt, die eigentliche Messgröße.  $\Theta$  symbolisiert die Stufenfunktion, die den negativen Ast der Exponentialfunktionen abschneidet. Für  $\tau$  wurde eine Sekunde gewählt, da dies der maximalen Auflösung des Instruments entspricht. Um die freien Parameter  $c$ ,  $m$  und  $l$  zu bestimmen, wurden Systemantworten ohne Lipid mit (2.5) gefittet. Als Mittelwerte wurden gefunden:

$$c = 90$$

$$m = 0,34$$

$$\text{und } l = 0,65$$

Eingesetzt in (2.6) führen diese Werte zu einer Funktion, mit der die Messdaten erfolgreich angepasst werden können. Es stellte sich als sinnvoll heraus, den ansteigenden Ast, welcher in der Regel aus nicht mehr als drei bis vier Punkten besteht, nicht in die Auswertung mit einzubeziehen. Gefittet wurde grundsätzlich der abfallende Ast, beginnend bei der halben Maximalhöhe (s. Abb. 2.3 bzw. 4.3).

Bei negativen Drucksprüngen in die Umwandlung kann das Gerät die Temperatur über der Messzeit in der Regel konstant halten (Abb. 2.5 A). Schwierigkeiten hat es allerdings mit positiven Sprüngen, bei denen es Wärme abführen muss, da die interne Kühlung wesentlich schlechter arbeitet als die Heizung. Eine konstante Temperatur über den gesamten Relaxationsverlauf ist hier nicht gewährleistet (s. Abb. 2.5 C). Messungen mit positivem Drucksprung sind darum nur in Ausnahmefällen sinnvoll. Ebenso kann es geschehen, dass bei negativen Sprüngen durch die ganze Umwandlung zuviel Wärme nachgeliefert werden muss. Auch hier bleibt die Temperatur nicht konstant, hat aber schon bald wieder ihren ursprünglichen Wert erreicht (Abb. 2.5 B).

Es zeigte sich, dass das Kalorimeter im „isothermal mode“ eine gegenüber dem „scanning mode“ um 0,04 K verschobene absolute Temperatur angibt. Es liegt nahe anzunehmen, dass Kalibrierungswerte von der Firma Microcal hier ungenau angegeben sind. Die Relaxationsdaten im Ergebnisteil sind alle um diesen Wert zu niedrigeren Temperaturen hin verschoben.

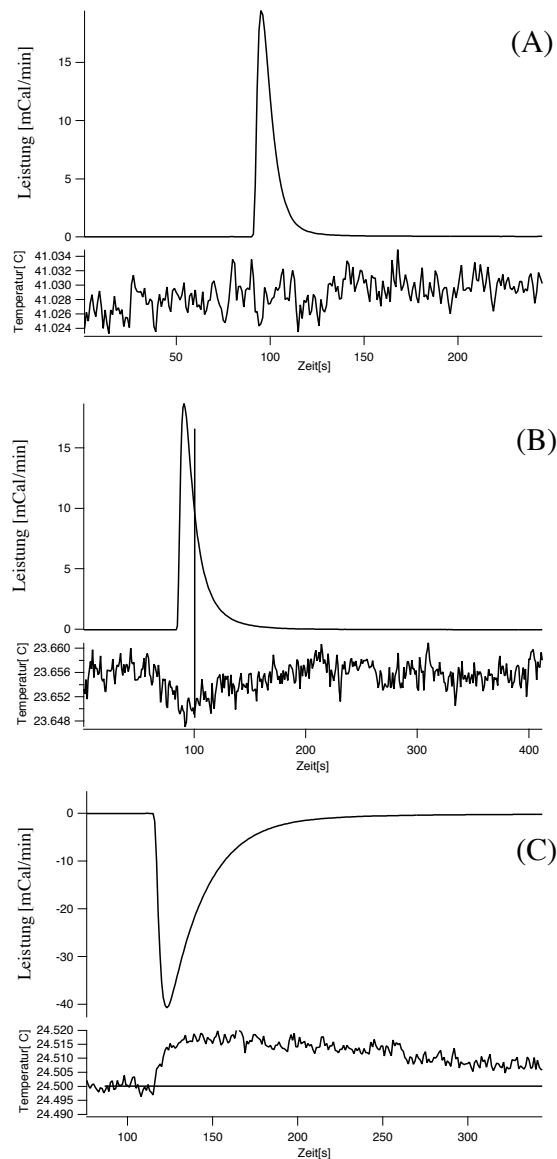


Abbildung 2.5: Drucksprungantworten einer DMPC-Membran mit den zugehörigen Temperaturen. In (A) wird mit einem negativen Drucksprung in den Anfang der Umwandlung gesprungen, die Temperatur bleibt konstant. In (B) wird auf die gleiche Weise durch die ganze Umwandlung gesprungen, die Temperatur kann nicht gehalten werden, ist aber im zu fittenden Bereich wieder nahezu auf den alten Wert zurückgegangen. In (C) wird mit einem positiven Drucksprung von oben in die Umwandlung gesprungen. Das Kalorimeter hat große Mühe, die Temperatur zu halten, die Aussage einer Auswertung erscheint fragwürdig. Man beachte die unterschiedliche Skalierung in T.

## 2.4 Viskosimetrie

Neben thermodynamischen Größen interessieren oft auch strukturelle bzw. topologische Veränderungen in Lipidmembranen. Viskosimetrie ermöglicht eine Untersuchung der makroskopischen Effekte solcher Veränderungen.

### 2.4.1 Zur Newtonschen Viskosität

Eine Newtonsche Flüssigkeit wird wie folgt definiert: Man denke sich eine beliebig ausgedehnte Flüssigkeit zwischen zwei parallelen Wänden jeweils vom Inhalt  $A$ , die gegeneinander die Relativgeschwindigkeit  $v$  haben; ihre Entfernung voneinander sei  $y$ . Durch die Flüssigkeit wirkt über einen Geschwindigkeitsgradienten  $\frac{dv}{dy}$  eine resultierende Kraft  $F$  auf die unbewegte Wand, wobei von einer laminaren Strömung ausgegangen wird. Diese Kraft ist bei einer Newtonschen Flüssigkeit proportional zum Geschwindigkeitsgradienten und zur Wandfläche. Die Proportionalitätskonstante ist flüssigkeitsspezifisch und wird als Newtonsche Viskosität  $\eta$  bezeichnet[20][21].

$$F \propto \frac{dv}{dy} \cdot A \Rightarrow \eta := \frac{F}{A} \cdot \left(\frac{dv}{dy}\right)^{-1} \quad (2.7)$$

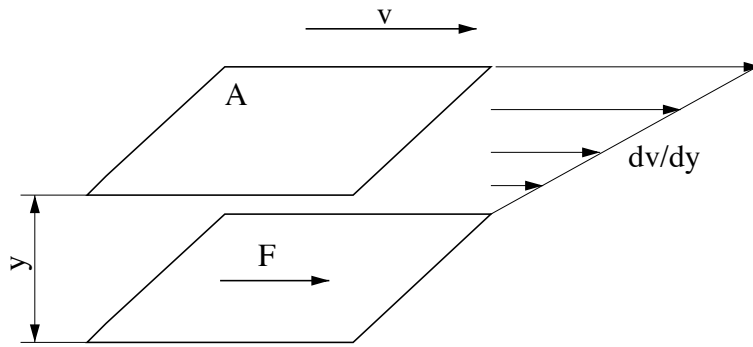


Abbildung 2.6: Die Newtonsche Viskosität wird definiert als die Eigenschaft einer Flüssigkeit, eine Kraft zwischen zwei ausgedehnten Platten zu übertragen, welche gegeneinander bewegt sind.

Zur Messung benutzt wurde ein Rotationsviskosimeter Low Shear 30 sinus der Firma Contraves (Zürich, Schweiz), heute ProRheo (Althengstett,

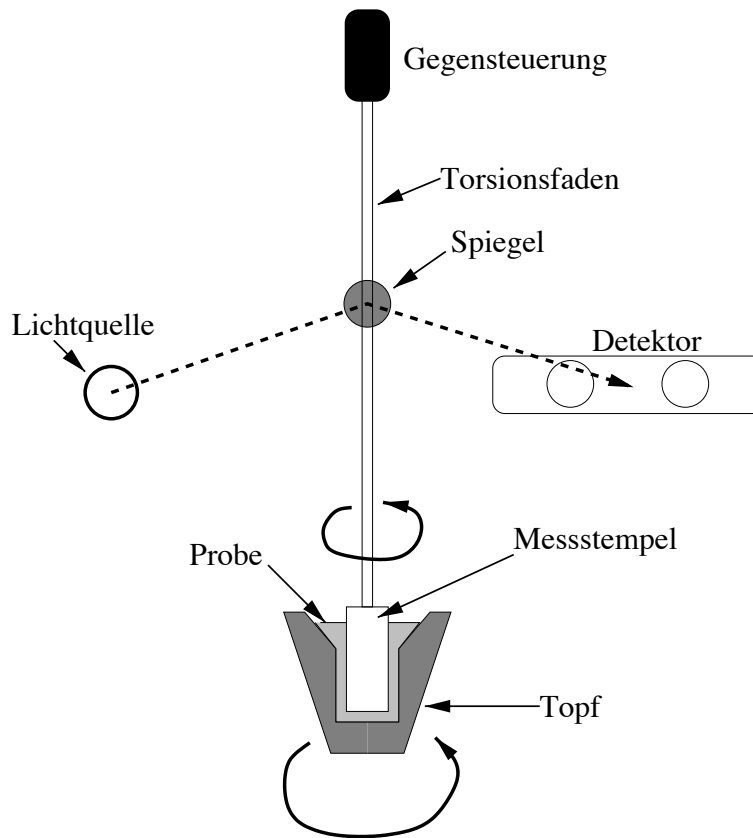


Abbildung 2.7: Zur Funktionsweise eines Rotationsviskosimeters. In den probengefüllten Topf wird ein Messstempel gehängt, welcher über einen Torsionsfaden mit der Messeinheit verbunden ist. Der Topf wird konstant bzw. sinusförmig gedreht. Die über die parallelen Zylinderwände auf den Stempel übertragene Kraft führt zu einer Torsion des Fadens. Ein diffuser Lichtstrahl fällt über einen am Faden befestigten Spiegel auf zwei Fotodetektoren. Eine Nachregelvorrichtung am Aufhängepunkt des Fadens tordiert den Faden entgegen der aufgetretenen Auslenkung bis die Fotodioden dieselbe Lichtmenge empfangen wie im unbelasteten Fall.

Deutschland). Ein probengefüllter Topf wird durch einen Synchronmotor mit konstanter bzw. sinusförmiger Geschwindigkeit gedreht (s. Abbildung 2.7). Eine Flüssigkeit im Probentopf überträgt über die parallelen Zylinderwände auf den in der Probe hängenden Messstempel eine Kraft, welche den Aufhängefaden des Stempels tordiert. Am Torsionsfaden ist ein Spiegel

befestigt, der einen diffusen Lichtstrahl auf zwei Fotodetektoren reflektiert. Eine elektronische Nachregeleinrichtung tordiert den Faden solange gegen die durch die Kraft verursachte Auslenkung, bis die Detektoren jeweils dieselbe Lichtmenge registrieren wie im unbelasteten Fall. Die Gegensteuerung erfolgt so schnell, daß sich der Stempel kaum bewegt. Die für die Gegensteuerung benötigte Spannung wird als Viskositätswert von einem Personal Computer unter dem Betriebssystem Microsoft Windows 95 (Redmond/WA, USA) erfasst. Das Viskosimeter ist über ein Wasserbad RK20 der Firma Lauda (Königshofen, Deutschland) temperierbar. Nicht nur der Probenkopf wird ständig mit Wasser einer definierten Temperatur umspült, sondern auch eine Feuchtigkeitsregelung in der Messkammer. Ein mit Wasser getränkter Schwamm erzeugt in der Messkammer denselben Dampfdruck wie er über der Probe herrscht; damit wird einer Austrocknung vorgebeugt. Das Wasserbad erlaubt eine gezielte Temperierbarkeit der Proben mit einer Genauigkeit von ca.  $\frac{2}{100}$  K. Ein Thermometer PM 135-A von Waldsee Electronic (Bad Waldsee, Deutschland) misst die Temperatur direkt unter dem Probenkopf mit einer Genauigkeit von ungefähr  $\frac{2}{1000}$  K. Die Schnittstelle zwischen PC und Geräten übernimmt eine A/D-D/A Wandlerkarte PCI-1200 von National Instruments (Austin/TX, USA). Die Gerätesteuerung und das Einlesen und Weiterverarbeiten von Rohdaten wird über ein eigenes Programm realisiert, welches unter der graphischen Programmiersprache Labview von National Instruments entwickelt wurde. Dieses Programm ermöglicht die Messung der Viskosität bei vorgebbaren Temperaturen mit konstanter Anregung des Probenkopfes. Die vom Messgerät ausgelesenen Analogwerte werden von der Wandlerkarte digitalisiert. Für jede Messung wird mit den gleichen Parametern eine Wassermessung vorgenommen, so dass die Viskosität relativ zu der von Wasser angegeben werden kann.

### 2.4.2 Flüssigkeiten mit elastischem Anteil: Maxwellmodell

Nicht jede Flüssigkeit reagiert newtonschen, d.h. nicht jede Kraftantwort hängt linear mit einer anregenden Geschwindigkeit zusammen, sondern verhält sich oftmals nach komplexeren Gesetzen. Von uns betrachtete Suspensionen zeigten bei plötzlicher Auslenkung ein „Nachschwingverhalten“, welches auf elastische Anteile schließen läßt. J.C. Maxwell schlug für solche Flüssigkeiten ein Ersatzschaltbild vor, zusammengesetzt aus Hookescher Feder und New-

tonschem Dämpfungsglied (s. Abb. 2.9) [18]. Das Viskosimeter Low shear 30 sinus ermöglicht eine sinusförmige Anregung des Probestopfes im Bereich 0,01 bis 1,5 Hz. Der newtonsche-viskose Anteil der Flüssigkeit verursacht eine Kraft auf den Stempel proportional zur Geschwindigkeit, der elastische Anteil proportional zur Auslenkung (Hookesche Feder). Eine rein viskose Substanz (z.B. Wasser, von welchem die Viskosität als Funktion der Temperatur bekannt ist) sollte somit zur Anregung eine um  $\frac{\pi}{2}$  verzögerte Antwort verursachen, eine rein elastische Substanz eine Antwort in Phase. Aus Phasenverschiebung und Amplitude der Antwort sollten die gewünschten Größen einfach bestimmbar sein. Die Spannung  $\sigma$  in einem dreidimensionalen Körper ist definiert als eine Kraft auf diesen Körper bezogen auf eine Fläche, die Dehnung  $\varepsilon$  ist definiert als eine Längenänderung bezogen auf eine Ursprungslänge. Für gewöhnlich wird das Verhältnis von Spannung zu Dehnung als komplexe Größe  $G = G' + iG''$  angegeben.  $G'$  bezeichnet den hookeschen Anteil in Phase,  $G''$  den um  $\frac{\pi}{2}$  phasenverschobenen newtonschen.  $\sigma$  bezeichnet eine Spannung,  $\varepsilon$  sei eine Dehnung der Substanz. Die Federkonstante, bzw. der Dehnungsmodul (Federkonstante bezogen auf eine Normlänge) sei mit  $s$  bezeichnet, die Viskosität mit  $\eta$ .

Gilt für den Anteil aus der Feder:  $\sigma = s\varepsilon$ ,

und für den Viskosen Anteil:  $\sigma = \eta\dot{\varepsilon}$ ,

$$\text{so folgt für ein Maxwell'sches Ersatzschaltbild: } \dot{\varepsilon} = \frac{1}{s}\dot{\sigma} + \frac{\sigma}{\eta} \quad (2.8)$$

Nimmt man an, dass die Spannung in der Probe wie in unserem Experiment oszilliert ( $\sigma = \sigma_0 e^{i\omega t}$ ), so folgt:

$$\dot{\varepsilon} = i\omega \frac{\sigma_0}{s} e^{i\omega t} + \frac{\sigma_0}{\eta} e^{i\omega t} \quad (2.9)$$

$$\text{Integration führt zu: } \varepsilon|_{t_1}^{t_2} = \frac{\sigma_0}{s} e^{i\omega t}|_{t_1}^{t_2} + \frac{\sigma_0}{\eta i\omega} e^{i\omega t}|_{t_1}^{t_2} \quad (2.10)$$

$$\Rightarrow \frac{\Delta\varepsilon}{\Delta\sigma} = \frac{1}{s} + \frac{1}{\eta i\omega} \equiv \frac{1}{G} \quad (2.11)$$



Für die Anteile der komplexen Grösse  $G = G' + iG''$  gilt dann:

$$G' = \frac{\eta^2 \omega^2 s}{\eta^2 \omega^2 + s^2} \quad (2.12)$$

$$G'' = \frac{\eta \omega s^2}{\eta^2 \omega^2 + s^2} \quad (2.13)$$

Für Die Messung einer rein viskosen Substanz, wie zum Beispiel Wasser, geht die Elastizität gegen unendlich:

$$s \rightarrow \infty \Rightarrow G' \rightarrow 0$$

$$s \rightarrow \infty \Rightarrow G'' \rightarrow \eta \omega$$

Im viskoelastischen Falle sollten in der doppeltlogarithmischen Auftragung die beiden Größen einen wie in Abbildung 2.8 schematisch dargestellten Verlauf nehmen. Oftmals ist die Annahme, der elastische Anteil setze sich aus nur einer Feder zusammen, nicht ausreichend, um des Verlauf von  $G''$  zu erklären. Das Auftreten verschiedener Stufen wird als Zusammenspiel mehrerer Federn interpretiert, welche über der Frequenz nacheinander hart werden [36]. Diese Analyseform wird auch als „mechanische Spektroskopie“ bezeichnet. Der Zusammenhang zwischen Antwort des Systems und Auslenkung ist genau dann ein linearer, wenn die Antwort die selbe Form hat wie die Anregung. Damit das vorgestellte Modell Gültigkeit erlangt, muss die Systemantwort im vorgestellten Falle ebenso wie die Anregung sinusförmig sein. Unsere Apparatur zeigt bei einer reinen Wassermessung Resonanzen im Bereich von 1 Hz. Ein im Folgenden beschriebenes erweitertes Modell erlaubte uns, trotzdem über einen weiten Bereich zu messen (Abb. 2.9).

Zur Entkopplung der Geräteantwort von der Antwort aus der Substanz wird dem Torsionsfaden mit der Regelektronik eine lineare Feder zugeordnet. Die beobachtete Resonanz setzt sich in unserem Modell somit aus den Anteilen zweier Federn zusammen.

Im Folgenden werden statt der Größen Spannung, Dehnung und Elastizitätsmodul der Einfachheit halber Größen wie Kraft, Auslenkung und Federkonstante betrachtet. Die Umrechnung erfolgt über eine multiplikative Konstante.

Es sei  $p$  die Federkonstante der Messapparatur,  $s$  die der Flüssigkeit,  $\eta$  ist die Newtonsche Viskosität der Flüssigkeit,  $z$  die Auslenkung des Probenkopfes

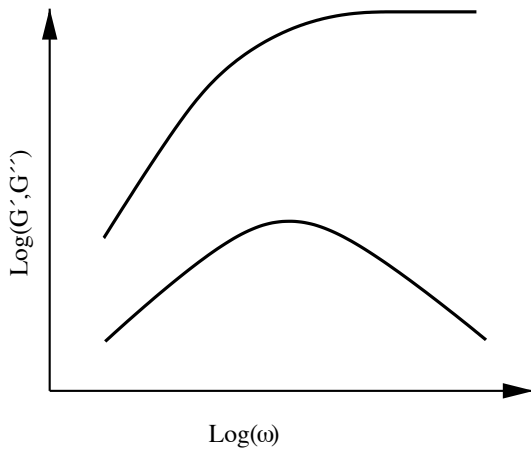


Abbildung 2.8: Erwarteter Verlauf für die Größen  $G'$  (unten) und  $G''$  (oben) über der Frequenz für ein System, in welchem genau eine Relaxationszeit auftritt.

und  $x$  die Antwort des Systems.  $y$  ist als eine virtuelle Größe zu verstehen, welche Aussagen über Vorgänge in der Flüssigkeit enthält. Die Auslenkung des Pendels selbst sei  $r$ . Da das Pendel durch die schnelle Regelelektronik praktisch nicht bewegt wird, ist  $r \approx 0$ , ebenso alle Ableitungen von  $r$ . Die Differentialgleichungen zu diesem System werden zu:

1. DGL des anregenden Teiles des Gerätes.

Die Geschwindigkeit der Auslenkung des Probenkopfes und die momentane Geschwindigkeit der Substanz selbst verursachen eine Auslenkung der der Flüssigkeit zugeordneten Feder.

$$-sy \approx s(r - y) = -\eta\dot{y} + \eta\dot{z} \quad (2.14)$$

2. DGL für den Antwortteil des Messgerätes.

Das Pendel erfährt praktisch keine Beschleunigung, die Feder des Messgerätes und die der Substanz kompensieren einander.

$$0 \approx m\ddot{r} = px - s(r - y) \approx px + sy \quad (2.15)$$

Für die Antwort wird angenommen (die Phasenverschiebung steckt in dem komplexen  $B$ ):

$$x = Be^{i\omega t} \quad B \in \mathbb{C} \quad B = |B|e^{i\delta} \quad (2.16)$$

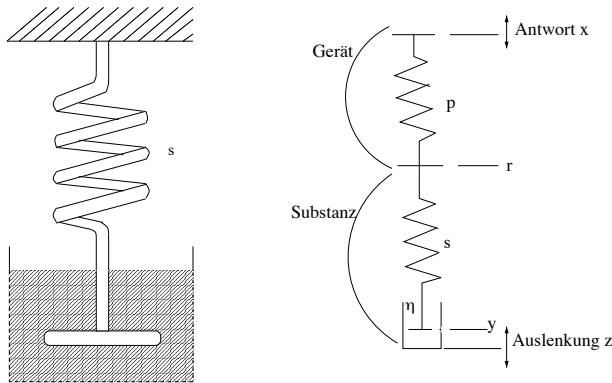


Abbildung 2.9: Maxwellmodell einer viskoelastischen Flüssigkeit und erweitertes Schaltbild der viskoelastischen Flüssigkeit und des Messgerätes. Dem Torsionsfaden mit der Regelungselektronik wird eine zur Resonanz fähige lineare Feder zugeordnet.

Für die Anregung gilt:

$$z = Ae^{i\omega t} \Rightarrow \dot{z} = i\omega Ae^{i\omega t} \quad A \in \mathbb{R} \quad (2.17)$$

Damit folgt mit (2.15)(2.16)

$$\Rightarrow 0 = pBe^{i\omega t} + sy \Rightarrow y = -\frac{pB}{s}e^{i\omega t} \quad (2.18)$$

Aus (2.14) wird damit:

$$\begin{aligned} pBe^{i\omega t} &= \eta i\omega \frac{pB}{s}e^{i\omega t} + \eta i\omega Ae^{i\omega t} \\ \Rightarrow pB &= \eta i\omega \frac{pB}{s} + \eta i\omega A \end{aligned} \quad (2.19)$$

Das Maxwellsche Ersatzschaltbild geht in das Ersatzschaltbild für Wasser über, wenn gilt:

$$s_{H_2O} \rightarrow \infty :$$

Damit folgt für eine Eichmessung mit Wasser:

$$pB_{H_2O} = \eta_{H_2O} i\omega A \quad (2.20)$$

$p \cdot B$  ist die Kraft, die vom Messgerät detektiert wird. Sie ist somit genauso gross wie die Kraft, die aus der Substanz kommt. Mit der Kenntnis von  $pB_{H_2O}$  aus (2.20) folgt:

$$\begin{aligned} G = \frac{p \cdot B}{A} &= i\eta_{H_2O}\omega \frac{|B|}{|B_{H_2O}|} e^{i(\delta - \delta_{H_2O})} \\ &= \eta_{H_2O}\omega \frac{|B|}{|B_{H_2O}|} (-\sin(\delta - \delta_{H_2O}) + i \cos(\delta - \delta_{H_2O})) \end{aligned} \quad (2.21)$$

Damit folgt für die Größen  $G'$  und  $G''$ :

$$G' = -\eta_{H_2O}\omega \frac{|B|}{|B_{H_2O}|} \sin(\delta - \delta_{H_2O}) \quad (2.22)$$

und

$$G'' = \eta_{H_2O}\omega \frac{|B|}{|B_{H_2O}|} \cos(\delta - \delta_{H_2O}) \quad (2.23)$$

Diese Größen sind bei Kenntnis der Gerätefunktion  $|B_{H_2O}|e^{i\delta_{H_2O}}$  durch eine Messung der Kraft über der Frequenz bestimmbar. Die Messung selbst wird wiederum von einem unter Labview entwickelten Programm übernommen, welches die Aufgabe hat, Motorbewegung und Reaktion des Pendels auszulesen, jeweils mit der Funktion  $A + B\sin(Ct + D)$  zu fitten und zu vergleichen. Als Messwerte abgespeichert werden Amplitude der Antwort, Phasenverschiebung, Temperatur und Frequenz. Die Standardabweichung, welche die Fitroutine ausgibt, wird als Maß für die Qualität des Fits ebenfalls mit abgespeichert.

## 2.5 Dynamische Lichtstreuung

Die Größe von Vesikeln wurde mit Hilfe dynamischer Lichtstreuung bestimmt. Zur Verfügung stand ein Nicomp 370 Autodilute Submicron Particle Sizer der Firma Particle Sizing Systems, Inc. (Santa Barbara/CA, USA). Voraussetzung für eine korrekte Bestimmung der Größenverteilung ist die Kugelform der zu vermessenden Objekte. Die Gültigkeit dieser Voraussetzung bestimmt die Korrektheit der Messung. Durchgeführt wurden die Messungen bei einer anfänglichen Lipidkonzentration von 10 mM. Das Gerät verdünnt Proben, bis es bei einer messbaren Konzentration angelangt ist. Die Endkonzentration liegt bei den vorgestellten Messungen immer oberhalb von 1 mM.

## 2.6 Materialien und Präparation der Proben

Sämtliche Lipide, welche den Messungen dieser Arbeit zugrunde liegen, stammen von der Firma Avanti Polar Lipids (Alabaster/AL, USA). Dies waren DMPC (1,2- Dimyristoyl-sn- Glycero-3- Phosphocholin) und DPPC (1,2- Dipalmitoyl-sn- Glycero-3- Phosphocholin). Geladenes Lipid (DMPG: 1,2- Dimyristoyl- sn- Glycero- 3-[Phospho- rac- (1-glycerol)]) lag als Natriumsalz vor. Sämtliche Lipide wurden tiefgekühlt als Pulver geliefert. Der Angiotensin-Rezeptorantagonist Losartan wurde uns von der Firma Merck/MSD Sharp & Dohme (Haar, Deutschland) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Er wurde als Kaliumsalz tiefgekühlt geliefert. Die Proben wurden gelöst, soweit nicht anders angegeben, in einem pH-Puffer aus HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethan -sulfonsäure) von Sigma-Aldrich (St. Louis/MO, USA) und dem Kalzium-Puffer EDTA (Ethylen- diamin- tetraessigsäure- diammoniumsalz) von Fluka (Buchs, Schweiz). Der pH-Wert wurde mit NaOH (Merck, Deutschland) bzw. HCl (Baker, Deventer, Holland) in 1-molarer Konzentration eingestellt und bei Bedarf zur fertigen Suspension zugegeben. HEPES wurde zum einen aufgrund seiner guten Puffereigenschaften über einen weiten Temperaturbereich ausgewählt, zum anderen wegen des  $pK_S$ -Wertes im physiologischen Bereich (zwischen 7 und 8). EDTA bindet stark an Kalzium und verhindert so, dass Verunreinigungen mit dieser Substanz zu Wechselwirkungen mit der Membran führen. Insbesondere Suspensionen geladener Lipide reagieren ausgesprochen sensibel auf Kalzium. Ein weiterer Effekt der Kalzium-Bindung an EDTA ist, dass die Proben weniger leicht von Mikroorganismen befallen werden. NaCl wurde von der Firma Baker (Deventer, Holland) bezogen. Sämtliche Chemikalien zur Pufferherstellung wiesen den Reinheitsgrad zur Analyse auf. Die Pufferlösungen wurden mit hochreinem Wasser hergestellt, welches durch ein mehrstufiges chemisch aktives Filtersystem Milli-Q UF Plus der Firma Millipore (Eschborn, Deutschland) gelaufen war. Der pH-Wert wurde mit Hilfe eines elektronischen pH-Meters der Firma WTW (Wien, Österreich) überprüft und eingestellt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Phospholipide einfach zum Puffer zugegeben, meist in der Konzentration 10 mM ( $\frac{mMol}{l}$ ) und oberhalb des Schmelzpunktes je nach Lipid zwischen 15 und 60 Minuten gerührt. Bei Messungen mit NaCl wurde ein Puffer mit fester Na-Konzentration hergestellt. Mischungen aus Lipiden und anderen Stoffen wurden in organischen Lösungsmitteln gelöst und dann gemischt. Zur Lösung verwendet wurde eine Mischung aus Dichlormethan und Methanol im Verhältnis 1:2 (jeweils Baker, Deventer, Holland).

Die Mischung wurde unter Stickstoff trockengeblasen und anschließend 12 Stunden im Exsikator unter Vakuum ( $p < 0,1$  mbar) gehalten. Das Gemisch wurde weiterverarbeitet wie reine Proben. Die meisten (ungeladenen) Lipide bilden spontan Multischichten aus (multilamellare Vesikel). Um unilamellare Vesikel dieser Lipide zu erhalten, wurden die Proben oberhalb der Schmelzumwandlung 15 mal durch Filter mit Porendurchmessern von 100 nm gepresst (extrudiert). Der verwendete Extruder LipoFast Basic stammt von der Firma Avestin (Ottawa, Kanada); zugehörige Filter derselben Firma bestehen aus einer perforierten Polycarbonatfolie. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass die resultierenden Vesikeldurchmesser der Porengröße des Filters entsprechen [24]. Für Drucksprungexperimente wurden Vesikel in hoher Konzentration benötigt (ca. 100 mM). Da der benötigte Kraftaufwand beim Extrudieren zum Reißen der Filterfolie führt, wurden diese Proben bei einer Konzentration von 10 mM extrudiert und anschließend für zehn Minuten in einer Vakuumzentrifuge bei 10.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die Vesikel sinken bei dieser Behandlung auf den Grund des Gefäßes ab. Vom Überstand wurden 90% abgenommen, so dass die verbleibende Probe eine Konzentration von 100 mM aufwies. Lungensurfactant (surfactant = surface active agent) wurde uns von Herrn Fred Possmayer (University of London, Ontario, Kanada) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Lungensurfactant ist der Oberflächenfilm der Lunge, welcher die Grenze zwischen Lungenoberfläche und Luft bildet. Zur Gewinnung wurden Lungen geschlachteter Rinder ausgewaschen, die Substanz gesäubert und gefriergetrocknet. Für die Messung wieder angesetzt wurde die Substanz bei pH7,0 mit 1,5 mM Tris-Puffer (Tris(hydromethyl)-aminomethan) der Firma Merck (New York, USA). NaCl und  $\text{CaCl}_2$  wurden in physiologischer Konzentration zugegeben, d.h. 150 mM NaCl und 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$ . Das Kalzium stammt ebenfalls von Merck. Die Lipidzusammensetzung des Lungensurfactant der Rinderlunge ergibt sich aus 79,2% Phosphatidylcholin, 11,3% Phosphatidylglycerol, 1,8% Phosphatidylinositol, 3% Cholesterin und 3,5% Phosphatidylethanolamin sowie Spuren anderer Lipide. Des weiteren besteht Lungensurfactant zu ca. zehn Gewichtsprozent aus spezifischen Proteinen. Diese Proteine lassen sich unterteilen in die vier Gruppen Surfactant-Protein A bis Surfactant-Protein D (SP-A..SP-D)[15][16] [17].

# Kapitel 3

## Theorie

### 3.1 Elastische Eigenschaften von Membranen

Die Enthalpien der zugänglichen Zustände einer Membran ergeben sich aus:

$$H_i = E_i + pV_i + \Pi A_i, \quad (3.1)$$

wobei  $E_i$  die innere Energie der Doppelschicht im Zustand  $i$  ist,  $V_i$  das Volumen mit dem Druck  $p$ , und  $A_i$  die Fläche mit dem lateralen Druck  $\Pi$ .  $H_i$  kann man als die Hamiltonenergie eines isobar-isothermen Systems betrachten. Die Zustandsfunktion eines solchen Systems ist gegeben durch:

$$Q = \sum_i \Omega_i \exp\left(-\frac{H_i}{RT}\right) \quad (3.2)$$

$\Omega_i$  bezeichnet die Entartung des Systems,  $R$  die Boltzmannkonstante. Der Mittelwert der Observablen  $X$  wird definiert über die Mittelung der möglichen Zustände :

$$\langle X \rangle = \frac{1}{Q} \sum_i X_i \Omega_i \exp\left(-\frac{H_i}{RT}\right). \quad (3.3)$$

Durch Differentiation von  $\langle H \rangle$  nach  $T$ ,  $\langle V \rangle$  nach  $p$  und  $\langle A \rangle$  nach  $\Pi$ , erhält man mit (3.3) als Suszeptibilitäten die Wärmekapazität  $C_p$  und isotherme Volumen- und Flächenkompressibilität  $\kappa_T^{vol}$  bzw.  $\kappa_T^{area}$  :

$$C_p = \left( \frac{d\langle H \rangle}{dT} \right)_p = \frac{\langle H^2 \rangle - \langle H \rangle^2}{RT^2} \quad (3.4)$$

$$\kappa_T^{vol} = -\frac{1}{\langle V \rangle} \left( \frac{d\langle V \rangle}{dp} \right)_T = \frac{\langle V^2 \rangle - \langle V \rangle^2}{\langle V \rangle RT} \quad (3.5)$$

$$\kappa_T^{area} = -\frac{1}{\langle A \rangle} \left( \frac{d\langle A \rangle}{d\Pi} \right)_T = \frac{\langle A^2 \rangle - \langle A \rangle^2}{\langle A \rangle RT} \quad (3.6)$$

Damit sind Suszeptibilitäten mit Fluktuationen des Systems verknüpft. Sei  $H_0(T)$  die intrinsische Enthalpien der Kohlenwasserstoffketten und  $\Delta H(T)$  die durch Konformationsänderungen verursachte Wärme. Für  $C_p$  folgt dann:

$$C_p = \left( \frac{dH_0}{dT} \right)_p + \left( \frac{d(\Delta H)}{dT} \right)_p \equiv C_{p,0} + \Delta C_p \quad (3.7)$$

Ähnlich definiert man die intrinsischen Größen  $V_0(T)$  und  $A_0(T)$  bzw. die Größen  $\Delta V(T)$  und  $\Delta A(T)$  aus der Umwandlung:

$$\kappa_T^{vol}(T) = -\left( \frac{1}{V} \frac{d(\Delta V_0)}{dp} \right)_T - \left( \frac{1}{V} \frac{d(\Delta V)}{dp} \right)_T \equiv \kappa_{T,0}^{vol} + \Delta \kappa_T^{vol} \quad (3.8)$$

$$\kappa_T^{area}(T) = -\left( \frac{1}{A} \frac{d(\Delta A_0)}{d\Pi} \right)_T - \left( \frac{1}{A} \frac{d(\Delta A)}{d\Pi} \right)_T \equiv \kappa_{T,0}^{area} + \Delta \kappa_T^{area} \quad (3.9)$$

Mit der experimentell gut bestätigten [26] Annahme

$$\Delta V \propto \Delta H$$

bzw.

$$\Delta V = \gamma_{vol} \Delta H$$

kann man zeigen, dass



$$\Delta V_i = \gamma_{vol} \Delta H_i \quad (3.10)$$

für alle zugänglichen Zustände gilt [8]. Mit Hilfe der Gleichungen (3.4), (3.5) und (3.6) findet man für die Kompressibilität aus der Kettenschmelze:

$$\Delta \kappa_T^{vol} = \frac{\gamma_{vol}^2 T}{\langle V \rangle} \Delta C_p \quad (3.11)$$

Damit ist eine Proportionalität zwischen der Veränderung von Kompressibilität und Wärmekapazitätsprofil gezeigt. Insbesondere in der Umwandlung der Membran ist somit ein Maximum der Kompressibilität zu erwarten[8]. Ebel [26] zeigt mit einer entsprechenden Gleichung für die isotherme laterale Kompressibilität die Proportionalität von Biegeelastizität und Wärmekapazität:

$$\kappa_b = \kappa_{b,0}(T) + \frac{16\gamma_{area}^2 T}{D^2 A} \Delta C_p \quad (3.12)$$

## 3.2 Lipidmembranen unter äusserem Druck

Die Eigenschaft (3.10) soll genutzt werden, um Schlussfolgerungen zur Druckabhängigkeit der Umwandlung zu ziehen. Um deutlicher zu machen, dass 3.10 für einen festen Druck  $p_0$  gilt, wird Gleichung 3.10 umformuliert zu:

$$\Delta V_i^{p_0} = \gamma_{vol}^{p_0} \Delta H_i^{p_0} \quad (3.13)$$

Zusätzlich wird vorausgesetzt, dass weder die Anzahl der zugänglichen Zustände und deren Entartung  $\Omega_i$  (s. Abb.3.3) noch innere Energie und Volumenänderung des Zustandes  $i$  vom Druck  $p$  abhängen:

$$\Delta E_i^p = \Delta E_i^{p_0} \quad (3.14)$$

$$\Delta V_i^p = \Delta V_i^{p_0} \quad (3.15)$$

Bei einer Druckänderung  $\Delta p$  findet man für die Enthalpie:

$$\Delta H_i^{p_0} = \Delta E_i^{p_0} + p_0 \Delta V_i^{p_0} \quad (3.16)$$

$$\Delta H_i^p = \Delta E_i^p + (p_0 + \Delta p) \Delta V_i^p \quad (3.17)$$

Mit (3.10), (3.14), (3.15) folgt daraus:

$$\begin{aligned} \Delta H_i^p &= \Delta E_i^{p_0} + p_0 \Delta V_i^{p_0} + \Delta p \gamma_{vol}^{p_0} \Delta H_i^{p_0} \\ &= \Delta H_i^{p_0} (1 + \Delta p \gamma_{vol}^{p_0}), \end{aligned} \quad (3.18)$$

Mit (3.3) folgt für  $\Delta H^p$ :

$$\langle \Delta H \rangle_T^p = (1 + \Delta p \gamma_{vol}^{p_0}) \frac{\sum_i \Omega_i \Delta H_i^{p_0} \exp \left( - (1 + \Delta p \gamma_{vol}^{p_0}) \frac{\Delta H_i}{RT} \right)}{\sum_i \Omega_i \exp \left( - (1 + \Delta p \gamma_{vol}^{p_0}) \frac{\Delta H_i}{RT} \right)} \quad (3.19)$$

Mit der neuen Temperatur

$$T^* \equiv \frac{T}{1 + \Delta p \gamma_{vol}^{p_0}} \quad (3.20)$$

wird aus (3.19):

$$\langle \Delta H \rangle_T^{p_0} = (1 + \Delta p \gamma_{vol}^{p_0}) \langle \Delta H \rangle_{T^*}^{p_0} \quad (3.21)$$

Das bedeutet, dass die Enthalpie unter Druck linear auf den druckfreien Fall reskalierbar ist. Der Umkehrschluss gilt ebenfalls, ist die Enthalpie unter Druck auf den druckfreien Fall reskalierbar, so verhalten sich Volumenänderung und Enthalpieänderung der Umwandlung proportional zueinander.

### 3.3 Strukturelle Umwandlungen im kalorimetrischen Profil

Wie in Kapitel 3.1 gezeigt wurde, sind elastische Eigenschaften nicht unabhängig von Schmelzumwandlungen der Lipidmembran. Größen wie Kompressibilität nehmen in der Umwandlung maximale Werte an. Umwandlungen der Gestalt der Membran bis hin zu topologischen Veränderungen erscheinen

### 3.3. STRUKTURELLE UMWANDLUNGEN IM KALORIMETRISCHEN PROFIL 35

in diesem Bereich somit am wahrscheinlichsten. Einige dieser Gestaltumwandlungen lassen sich mit Hilfe elastischer Konstanten theoretisch verstehen [28]. Ausgehend von einem Modell von Heimburg und Schneider [29] soll hier der Zusammenhang zwischen der Bildung eines Membrannetzwerkes und dem kalorimetrischen Profil des Systems vorgestellt werden.

Für eine planare und eine gekrümmte Membran ist die Gibbsche Freie Energie jeweils gegeben durch:

$$\begin{aligned} G(T) &= G_0 + G_{solv} + \Delta H(T) - T \cdot \Delta S(T) \\ &= G_0 + G_{solv} + \int_{T_0}^T \Delta C_p dT - T \cdot \int_{T_0}^T \frac{\Delta C_p}{T} dT, \end{aligned} \quad (3.22)$$

wobei  $G_{solv}$  für die Freie Enthalpie der Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel stehen soll. Die restlichen Größen bezeichnen wie üblich Enthalpie, Temperatur, Entropie und die isobare Wärmekapazität. Der Unterschied in der Gibbschen Freien Enthalpie zwischen der gekrümmten (*curved*) und der planaren (*planar*) Membran wird somit zu:

$$\begin{aligned} \Delta G(T) &= \underbrace{G_{solv}^{curved} - G_{solv}^{planar}}_{\Delta G_{solv}} \\ &+ \underbrace{\int_{T_0}^T (\Delta C_p^{curved} - \Delta C_p^{planar}) dT - T \cdot \int_{T_0}^T \frac{\Delta C_p^{curved} - \Delta C_p^{planar}}{T} dT}_{\Delta G_{elast}} \end{aligned} \quad (3.23)$$

$\Delta G(T)_{elast}$  ist definiert als die Freie Enthalpie, welche benötigt wird, um eine planare Membran zu einer gekrümmten zu verbiegen.  $\Delta G(T)_{solv}$  repräsentiert die veränderte Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel. Der Einfachheit halber wird angenommen, dass die Temperaturabhängigkeit von  $\Delta G_{solv}$  im Umwandlungsbereich klein ist. Simuliert man wie in [29] mit Monte-Carlo-Verfahren die Wärmekapazitätsprofile gekrümmter und planarer Membranen, so findet man Ausdrücke für  $C_p$  in (3.23) und kennt die Freie Enthalpie bis auf den Anteil, der aus der veränderten Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel kommt. Wählt man den Beitrag von  $\Delta G_{solv}$  so, dass sich die simulierten Kurven der Freien Enthalpie schneiden, so wird in einem bestimmten Bereich der Übergang von einer planaren zu einer gekrümmten Membran energetisch begünstigt (s. Abb. 3.1). Aus dem Unterschied der Freien Enthalpien  $\Delta G$  gewinnt man durch Differentiation nach der Temperatur

das zu erwartende Wärmekapazitätsprofil einer solchen Umwandlung. Eine Aufspaltung in drei Maxima ist die theoretische Vorhersage für die Wärmekapazitätskurve einer Umwandlung, welche mit einer Krümmungsänderung einhergeht.

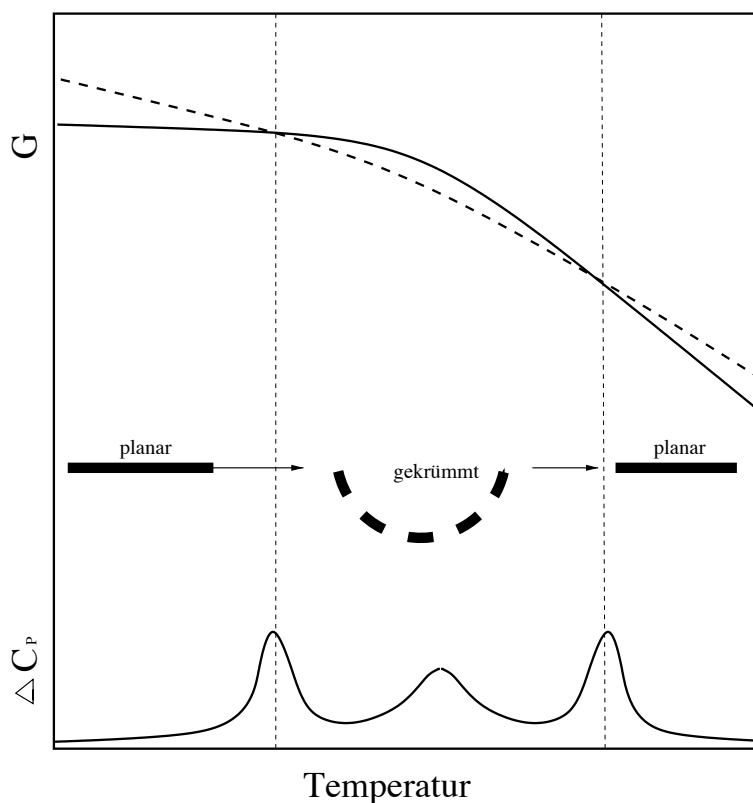


Abbildung 3.1: Simulation der Gibbs'schen Freien Enthalpie einer gekrümmten (gestrichelt) und einer planaren (durchgezogene Linie) Membran. Ist der Beitrag der Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel zur freien Enthalpie geeignet gewählt, so überschneiden sich die Kurven. In einem bestimmten Temperaturbereich wird eine Veränderung der Krümmung energetisch günstiger ( $\Delta G$  schematisch). Im Wärmekapazitätsprofil  $C_p$  erwartet man eine Dreipeakeaufspaltung.

### 3.4 Relaxationen ins thermodynamische Gleichgewicht

In Abschnitt 3.1 wurde bereits auf die Bedeutung von Fluktuationen thermodynamischer Größen hingewiesen. Aus Monte-Carlo-Simulationen einer Lipidmembran mit der Annahme, dass es für jedes Lipid genau die Zustände „fluid“ und „gelförmig“ gibt (Ising-Modell) [31], lassen sich die Enthalpiefluktuationen um das thermodynamische Gleichgewicht bestimmen. Die Wahrscheinlichkeit, einen bestimmten Zustand mit einer Enthalpie  $H$  zu finden sei  $P(H)$ . Für die Gibbsche Freie Enthalpie gilt:

$$G(H) = -\ln P(H) + C, C = \text{const} \quad (3.24)$$

Daraus berechnet sich die Entropie einfach zu

$$S(H) = \frac{H + \ln P(H) - C}{T} \quad (3.25)$$

Approximiert man die Wahrscheinlichkeitsverteilung um  $H_0$  in der Nähe des Gleichgewichtes mit einer Gaussverteilung:

$$P(H) = P_0 \exp \left( -\frac{(H(t) - H_0)^2}{\sigma^2} \right) \quad (3.26)$$

wobei  $(H(t) - H_0)$  kleine Fluktuationen um das Gleichgewicht  $H_0$  sind, so folgt für die Gibbsche Freie Enthalpie eine einfache, in  $(H(t) - H_0)$  quadratische Form:

$$G(H) = \frac{(H(t) - H_0)^2}{\sigma^2} - \ln P_0 + C \quad (3.27)$$

Daraus folgt für die Entropie:

$$S(H) = \frac{H - \Delta G(H)}{T} = \frac{H}{T} - \frac{(H - H_0)^2}{T\sigma^2} - \frac{\ln P_0 + C}{T} \quad (3.28)$$

Die thermodynamischen Kräfte in den Gleichgewichtszustand können allgemein aus der Entropie berechnet werden [33]:

$$X_i = \sum_j \left( \frac{\partial^2 S}{\partial \alpha_i \partial \alpha_j} \right) \alpha_j \quad (3.29)$$

wobei die  $\alpha_j$  den Fluktuationen der Grössen entsprechen, von denen  $S$  abhängt. In der linearen Nichtgleichgewichtsthermodynamik sind die Flüsse lineare Funktionen der entsprechenden thermodynamischen Kräfte, d.h.:

$$J_i = \frac{d\alpha_i}{dt} = \sum_j L_{ij} X_j \quad (3.30)$$

$L_{ij}$  sind hier phänomenologische Koeffizienten. In unserem Beispiel gilt damit für die Kraft in Richtung der maximalen Entropie, da  $S$  nur von  $H$  abhängt:

$$X_H = \frac{\partial^2 S}{\partial(H - H_0)^2} \cdot (H - H_0) = -\frac{2(H - H_0)}{T\sigma^2} \quad (3.31)$$

und für die entsprechende Kraft folgt aus (3.30):

$$J_H = \frac{d(H - H_0)}{dt} = -\frac{2L}{T\sigma^2} \cdot (H - H_0) \quad (3.32)$$

Diese Differentialgleichung in  $(H(t) - H_0)$  führt zu einer einfach-exponentiellen Zeitabhängigkeit für die Relaxation der Fluktuationen  $(H(t) - H_0)$ :

$$(H(t) - H_0) = \exp\left(-\frac{2L}{T\sigma^2}t\right) \equiv \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (3.33)$$

mit einer Relaxationszeit

$$\tau \equiv \frac{T\sigma^2}{2L} \quad (3.34)$$

Gleichzeitig gilt für die Wärmekapazität<sup>1</sup> (3.4):

$$C_p = \frac{\langle H^2 \rangle - \langle H \rangle^2}{RT^2} = \frac{\sigma^2}{RT^2} \quad (3.35)$$

und damit

$$\tau = \frac{RT^3}{2L} \cdot C_p \quad (3.36)$$

Das heißt, die Relaxationszeit  $\tau$  der Energie ins thermodynamische Gleichgewicht ist proportional zur Wärmekapazität multipliziert mit der Temperatur zur dritten Potenz. Damit sollte es bei Kenntnis der Konstanten  $L$  möglich sein, Relaxationszeiten aus kalorimetrischen Messungen vorherzusagen.

---

<sup>1</sup> $\langle H^2 \rangle - \langle H \rangle^2$  entspricht im Fall einer Gaussverteilung genau der Breite der Verteilung zum Quadrat s. z.B. [34].

# Kapitel 4

## Ergebnisse

### 4.1 Thermodynamische Relaxationen

Zu dynamischen Vorgängen in biologischen Systemen, welche nicht auf einer molekularen Längenskala, sondern unter der Beteiligung vieler Moleküle stattfinden, ist bislang wenig bekannt. Im vorliegenden Abschnitt soll das Verhalten künstlicher und biologischer Membranen in der Nähe des thermodynamischen Gleichgewichtes untersucht werden.

Theoretische Überlegungen führen zu der Vorhersage, dass Relaxationszeiten in das thermodynamische Gleichgewicht in der Umwandlung von Lipidmembranen proportional zur Wärmekapazität der Umwandlung sind (Abschnitt 3.4, Gleichung 3.36). Im Rahmen dieser Arbeit werden Messungen von Relaxationszeiten vorgestellt und eine Proportionalität zum Wärmekapazitätsprofil gezeigt.

Um Relaxationsmessungen in ein Gleichgewicht durchführen zu können, muss zuvor ein Ungleichgewicht präpariert werden. Ausgenutzt wird hierfür in den folgenden Messungen eine Volumenänderung der Membran, welche mit der Umwandlung einher geht. Durch die Volumenänderung verschiebt Druck die Umwandlungstemperatur hin zu höheren Temperaturen. Zur Messung wird eine Temperatur angesteuert, bei der sich das druckfreie System in der Umwandlung befinden würde. Der Druck wird schnell abgelassen, wodurch sich das Lipidsystem plötzlich in der Umwandlung befindet. Die dabei aufgenommene bzw. abgegebene Wärme wird detektiert. Eine verzögerte Wärmeaufnahme wird als die Zeit interpretiert, welche benötigt wird, um in das Gleichgewicht zu finden.

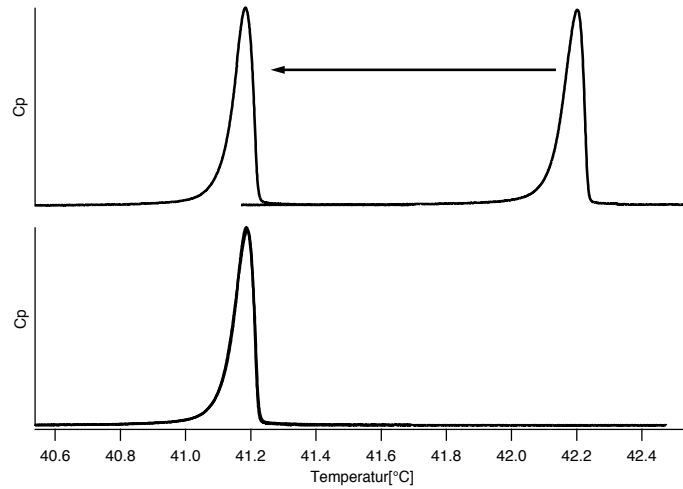


Abbildung 4.1: Wärmekapazitätsprofil einer Multilamellaren DPPC-Membran ohne (links) und unter 40 bar Druck (rechts). Ein lineares Reskalieren der Temperaturachse für die Umwandlung unter Druck führt zu einer Deckungsgleichheit der Profile.

Induziert wird das Ungleichgewicht, indem eine in der Umwandlung auftretende Änderung des Volumens ( $\Delta V$ ) ausgenutzt wird; detektiert wird wiederum ein Unterschied in der Enthalpie ( $\Delta H$ ), welcher aus einem Aufschmelzen der Kohlenwasserstoffketten stammt. Für die Zulässigkeit der Messung ist somit zu prüfen, ob Änderungen des Volumens und der Enthalpie proportional zueinander auftreten (Abschnitt 3.4). Im theoretischen Teil dieser Arbeit (Abschnitt 3.1) wurde gezeigt, dass eine Proportionalität zwischen Volumen- und Enthalpieänderung in der Umwandlung äquivalent ist zu einer Verschiebung der Umwandlung mit Druck, falls es möglich ist, das durch Druck verschobene Profil allein durch ein lineares Reskalieren der Temperaturachse in das druckfreie Profil zu überführen. Abbildung 4.1 zeigt exemplarisch das Umwandlungsprofil multilamellarer DPPC-Vesikel mit und ohne Druck. Wird die Temperaturachse der Umwandlung unter Druck nach Gleichung (3.20) reskaliert, so wird dieses Profil mit dem druckfreien nahezu deckungsgleich. Für eine Proportionalitätskonstante  $\gamma$  nach Gleichung (3.20:  $\Delta V = \gamma \Delta H$ ) wird nach dieser Messung ein Wert von  $7,95 \cdot 10^{-4} \frac{\text{ml}}{\text{J}}$  gefunden. Für einige Lipidsysteme wurden nacheinander verschiedene Temperaturen in der druckfreien Umwandlung angesteuert. Durch einen Drucksprung von -40



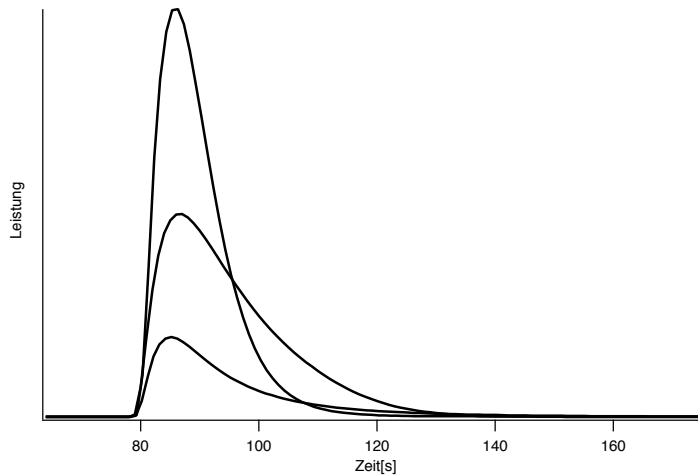


Abbildung 4.2: *Typische Rohdaten einer Drucksprungantwort. Deutlich sind Unterschiede in der Menge der frei gewordenen Enthalpie sowie in den Relaxationen zu erkennen, je nachdem an welchem Punkt der Umwandlung gemessen wird.*

bar wurde für jede dieser Temperaturen ein Ungleichgewicht induziert. Abbildung 4.2 zeigt verschiedene typische Antwortprofile des Gerätes auf einen Drucksprung. Deutlich ist ein Unterschied in der aufgenommenen Enthalpie (Integral der Kurven) und in der Zeit zu erkennen, welche das System braucht, um die Wärme aufzunehmen, je nachdem an welchen Punkt der Umwandlung gesprungen wird. Wesentlich für die Richtigkeit der in Abschnitt 3.4 dargelegten theoretischen Überlegungen ist, dass Wahrscheinlichkeitsverteilungen von Zuständen um das Gleichgewicht gaussverteilt sind. Eine Gaussverteilung dieser Zustände ist genau dann gegeben, wenn Relaxationen nach einem einfach-exponentiellen Gesetz erfolgen. Der abfallende Ast der gemessenen Kurven kann erfolgreich nach einem einfach-exponentiellen Gesetz angepasst werden (Abb. 4.3). Die theoretische Annahme zur Herleitung von Gleichung (3.36) scheint somit gerechtfertigt. Das Angeben von absoluten Relaxationswerten verlangt ein Entfalten der Messkurven von der Gerätefunktion, wie es in Abschnitt 2.3.1 beschrieben ist. Alle folgenden Zeiten sind nach dieser Methode bestimmt. Um bei vorhandener Proportionalität eine Proportionalitätskonstante zwischen Wärmekapazität und Relaxationszeiten zu bestimmen, bedarf es absoluter Wärmekapazitäten. Da sich zur Druckmessung die Substanz in einer Kapillare befindet, deren effektiver In-

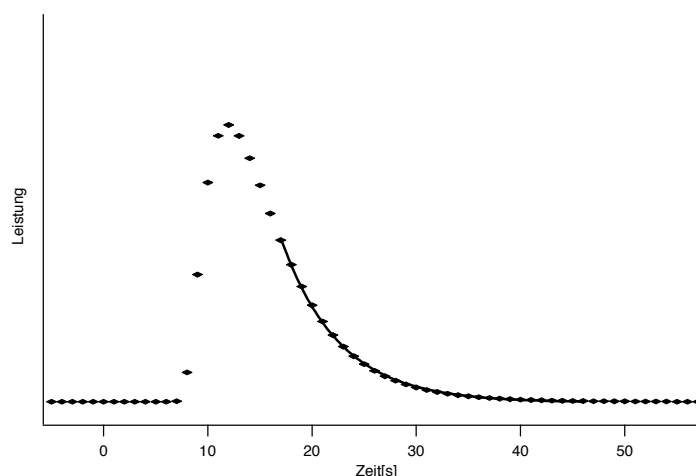


Abbildung 4.3: Der abfallende Ast der Antwortkurve lässt sich einfach-exponentiell fitten. Für Relaxationszeiten, von denen die Gerätekonstante entfaltet ist, war ein aufwendigeres Verfahren nötig.

halt nicht exakt bekannt ist, können absolute Wärmekapazitäten hier nicht genau bestimmt werden. Profile werden dennoch aufgenommen, integriert und mit den bekannten molaren Schmelzenthalpien der Lipide verglichen. Die ursprünglichen Profile können jetzt einfach zu absoluten Werten reskaliert werden. Für DMPC-Membranen beträgt der Wert der Umwandlungsenthalpie  $27,2 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ , für DPPC-Membranen  $36,4 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$  [45]. Sämtliche Messungen wurden mit einer Lipidkonzentration von 100 mM in einem 10 mM HEPES, 1 mM EDTA-Puffer bei pH7,0 durchgeführt. Drucksprünge erfolgten, falls nicht anders angegeben, um -40 bar.

#### 4.1.1 Relaxationen in multilamellaren DMPC-Membranen

Für erste Messungen wurden multilamellare DMPC-Membranen gewählt, da diese ein extrem schmales und damit mit einer hohen maximalen Wärmekapazität verbundenes Schmelzprofil aufweisen. Ist die vorausgesagte Proportionalität richtig, so sind in diesen Membranen besonders hohe Zeiten zu erwarten.

In Abbildung 4.4 sind mit der molaren Wärmekapazität aus Drucksprungmessungen ausgewertete Relaxationszeiten für multilamellare DMPC-Membranen dargestellt. Zwar liegen die Relaxationszeiten in dieser Messung nicht

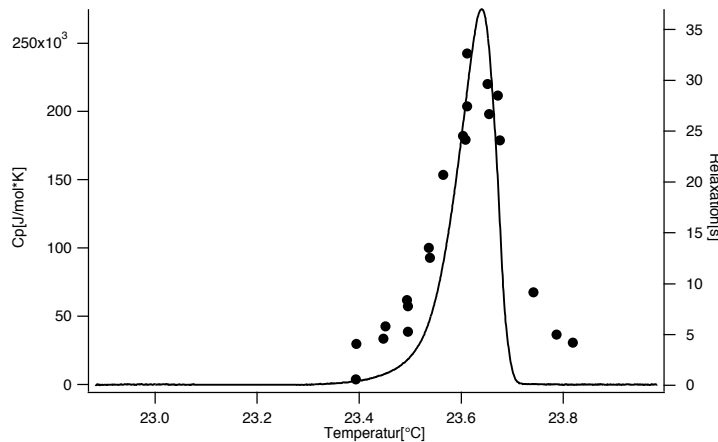


Abbildung 4.4: Molare Wärmekapazität und Relaxationszeiten von multilamellaren DMPC-Membranen.

genau auf dem Wärmekapazitätsprofil, dennoch sind in der Umwandlung selbst erhöhte Zeiten gut zu erkennen. Unterhalb des Scheitelpunktes ist der Verlauf der Wärmekapazität  $C_P$  annähernd parallel zu dem der Relaxationszeiten  $\tau$ ; nicht so oberhalb des Scheitelpunktes: die Unsymmetrie im Verlauf der Wärmekapazität wird von den Relaxationszeiten nicht wiedergegeben. Ein möglicher Grund könnte darin liegen, dass für diese Messpunkte durch die ganze Umwandlung gesprungen werden muss. Das Kalorimeter muss hier die gesamte Schmelzenthalpie in kurzer Zeit zur Verfügung stellen. Das Kalorimeter kommt an diesen Messpunkten oft an seine Leistungsgrenze, so dass die Temperatur nicht mehr konstant bleibt. Zwar ist die Temperatur an der Stelle, an welcher ausgewertet wird, wieder auf den ursprünglichen Wert zurückgeregelt, dennoch sind hier durch das Gerät bedingte Fehler denkbar. Um diesen Sachverhalt genauer zu überprüfen, bietet es sich an, statt durch negative Drucksprünge durch positive Sprünge in der Umwandlung unter Druck ein Ungleichgewicht zu induzieren. Das Ungleichgewicht wird nun in der bereits aufgeschmolzenen Membran verursacht, es wird gleichsam von oben in die Umwandlung gesprungen. Das Gerät muss nun an der Seite hin zu höheren Temperaturen nicht mehr Lipide aufschmelzen, sondern Leistung aufnehmen, welche durch den Übergang fluid-gel in einem Teil der Lipide frei wird. Das so entstandene Profil ist gemeinsam mit der Messung aus negativen Sprüngen in Abbildung 4.5 dargestellt. Dem zur Messung verwendeten Kalorimeter bereitet es sehr viel mehr Schwierigkei-

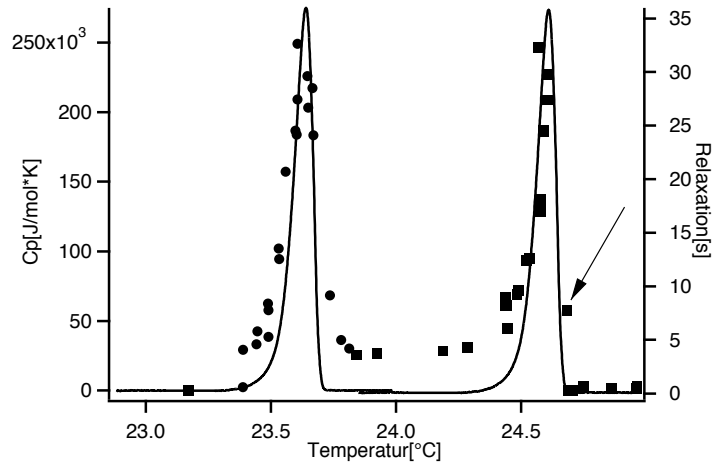


Abbildung 4.5: Wärmekapazitäten multilamellarer DMPC-Membranen mit Relaxationszeiten aus negativen (runde Symbole) und positiven (eckige Symbole) Drucksprüngen.

ten, Wärme ab- als zuzuführen. Messungen von Relaxationszeiten mit Hilfe positiver Drucksprünge, bei denen die Membran von dem fluiden in den gelförmigen Zustand übergeht und somit Wärme frei wird, sind deshalb nur unter bestimmten Bedingungen sinnvoll. Muss von dem Gerät in kurzer Zeit mehr Wärme abgeführt werden, als es zu kompensieren vermag, so bleibt die Temperatur während der Messung nicht mehr konstant. Die Relaxationszeit aus einer solchen Messung ist sicherlich verfälscht, da nicht mehr klar ist, an welchem Punkt in der Umwandlung die Relaxation stattfindet. Beispiele für Temperaturverläufe während der Relaxation sind in Abbildung 2.5 wiedergegeben. Die Temperaturkonstanz während der Messung war nur bei den Relaxationszeiten oberhalb des mit einem Pfeil gekennzeichneten Messpunktes gewährleistet. Bei allen Messungen, in denen das Kalorimeter mehr Wärme abführen musste, war die Temperatur während der Messung nicht konstant. In Abbildung 4.6 ist der Verlauf der Antwort auf einen Drucksprung an dem mit einem Pfeil gekennzeichneten Messpunkt dargestellt. Zu Beginn dieses Kapitels und ausführlich in Abschnitt 3.1 wird dargelegt, dass Daten unter Druck nach einem linearen Gesetz (Gleichung 3.20) auf den druckfreien Fall reskaliert werden können. Ausgewählte Daten aus negativen und reskalierten positiven Drucksprungmessungen sind gemeinsam mit der druckfreien Wärmekapazität in Abbildung 4.7 aufgetragen. In dieser Auf-

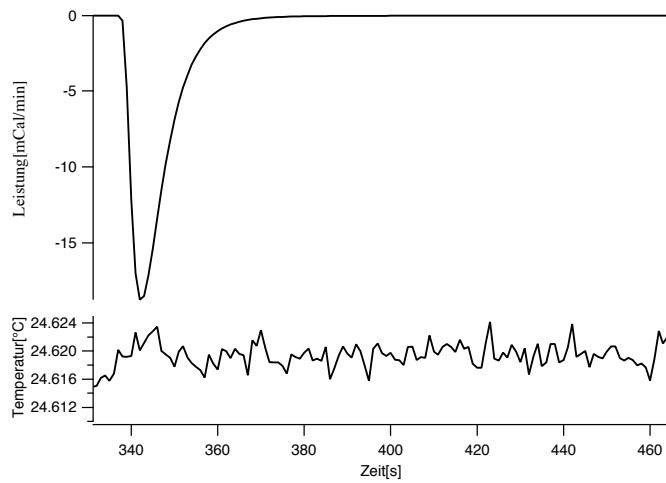


Abbildung 4.6: Der Datensatz dieses Drucksprunges kann ausgewertet werden. Die aus dem Lipid kommende Wärme kann vom Kalorimeter schnell genug abgeführt werden, deshalb bleibt die Temperatur konstant

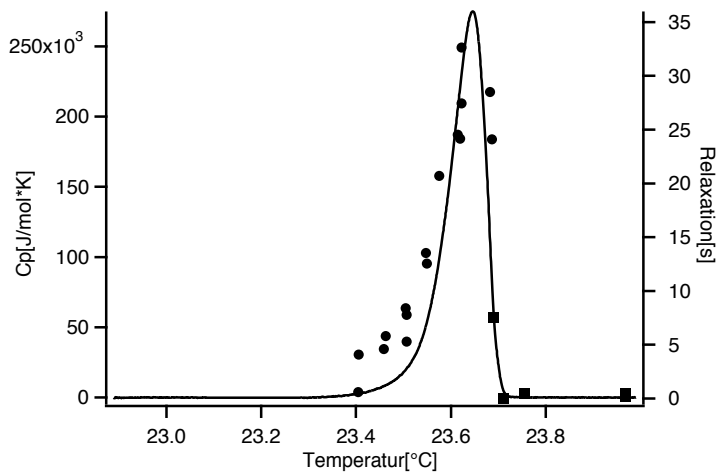


Abbildung 4.7: Auswahl von Relaxationszeiten aus negativen (runde Symbole) und positiven (eckige Symbole) Drucksprüngen. Die Daten aus den positiven Sprüngen sind nach Gleichung (3.20) reskaliert.

tragung wurden all jene Punkte vernachlässigt, bei denen die Temperatur, wenn auch nur für kurze Zeit, nicht konstant gehalten werden konnte. Dies sind bei den negativen Drucksprüngen all jene, bei denen durch die gesamte Umwandlung gesprungen werden musste, bei den positiven Drucksprüngen die, bei denen die Wärme nicht schnell genug abgeführt werden konnte. In diesem Gemeinsamen Profil ist eine Proportionalität im Rahmen der Genauigkeit zu erkennen. Selbst die Unsymmetrie im Verlauf der Wärmekapazität wird wiedergegeben.

### 4.1.2 Relaxationen in multilamellaren DPPC-Membranen

Falls es möglich ist, eine Proportionalität zwischen Wärmekapazität und Relaxationszeiten nachzuweisen, so sollte dies für verschiedene Membransysteme nachgeprüft werden. Eine zu bestimmende Proportionalitätskonstante kann so auf ihre Universalität hin überprüft werden. Erst wenn feststeht, dass diese Konstante lipidunabhängig ist, wird es möglich, für ganz neue Messungen alleine aus der Wärmekapazitätskurve Relaxationszeiten zu bestimmen.

Ein ausgeprägtes Maximum in der Wärmekapazität wie das oben vorgestellte System zeigen auch multilamellare DPPC- Vesikel, welche erst bei  $\approx 41,3^\circ\text{C}$  schmelzen. Für dieses Lipid wurden ganz ähnliche Messungen wie für DMPC-Membranen durchgeführt. In Abbildung 4.8 sind mit der molaren Wärmekapazität aus Drucksprungmessungen ausgewertete Relaxationszeiten für multilamellare DPPC-Membranen dargestellt. Zwar beginnt in dieser Messung die Relaxationszeit ausserhalb der Umwandlung nicht bei null Sekunden, in der Umwandlung selbst sind erhöhte Zeiten dennoch gut zu erkennen. Die höchste Zeit an der Spitze der Umwandlung liegt bei 46 Sekunden. Viele der Relaxationszeiten liegen in der Umwandlung nahezu deckungsgleich mit dem Wärmekapazitätsprofil. Lediglich die Unsymmetrie in der Wärmekapazität hin zu höheren Temperaturen wird wie im Falle des DMPC nicht wiedergegeben. Der Grund scheint der gleiche zu sein, wie im oben beschriebenen Falle.

Eine weitere, sehr viel ausführlichere Messung zeigt den Anstieg der Zeiten in der Umwandlung ebenfalls (4.9). Auch hier sind die Relaxationswerte im Bereich der Schmelzumwandlung stark erhöht.

Ausserhalb der Umwandlung können hier wesentlich kleinere Werte als im vorigen Falle gefunden werden. Der Grund ist wohl darin zu suchen, dass für die erste Messung in Abbildung 4.8 nur eine unvollständige Apparatur zu

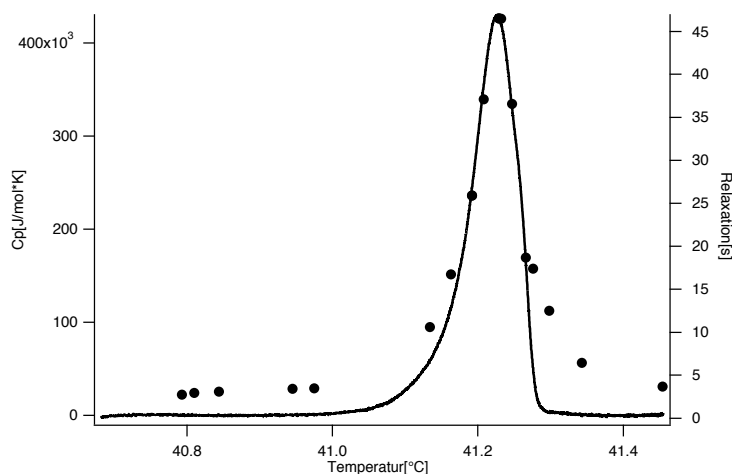


Abbildung 4.8: Molare Wärmekapazität und Relaxationszeiten von multilamellaren DPPC-Membranen.

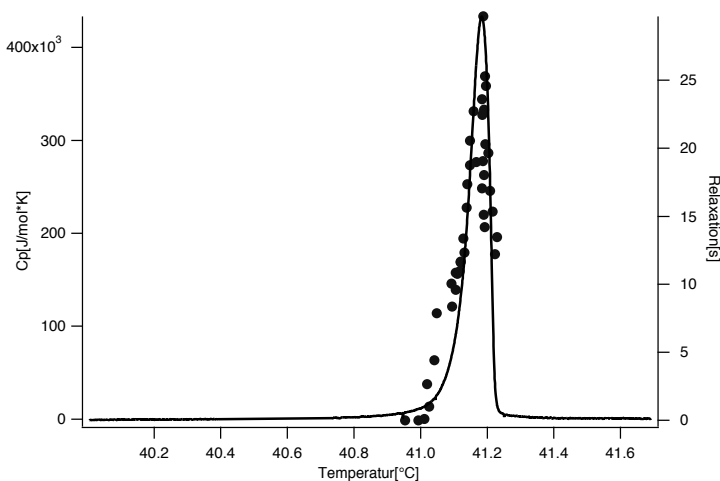


Abbildung 4.9: Wiederholungsmessung von Wärmekapazität und Relaxationszeiten einer multilamellaren DPPC-Membran.

Verfügung stand. Der in Abbildung 2.2 dargestellte Verbindungsschlauch zur Druckflasche war hier noch nicht vorhanden, so dass für jede Relaxationszeit die Messkapillare aus der Kalorimeterzelle entnommen werden musste, um erneut unter Druck gesetzt zu werden. Erst ein flexibler Druckschlauch löste dieses Problem (Details s. Abschnitt 2.2). Trotz der Vielzahl der Messpunk-

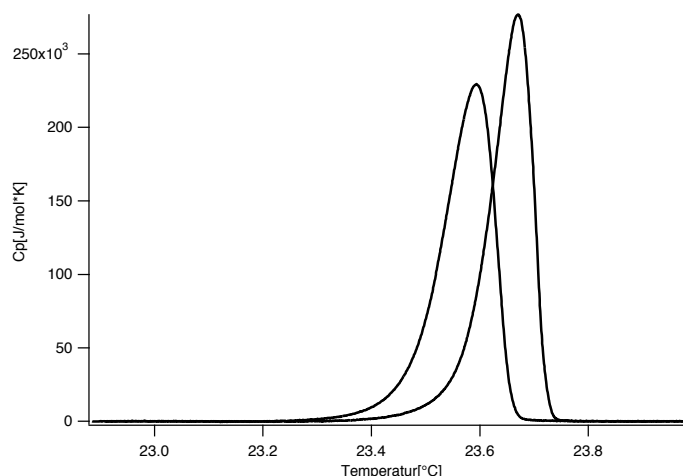


Abbildung 4.10: *Wärmekapazitätskurven multilamellarer Membranen bleiben die ersten Tage nach der Zubereitung nicht stabil. Zwischen diesen beiden Messungen liegen sechs Tage*

te konnte in dieser Messung aus Abbildung 4.9 nicht die gleiche maximale Zeit von 46 Sekunden festgestellt werden. Erst im Nachhinein wurde festgestellt, dass sich Eigenschaften multilamellarer Membranen mit der Zeit etwas ändern können (s. Abb. 4.10). Insbesondere die ersten Tage nach der Zubereitung der Probe wird das Wärmekapazitätsprofil breiter und damit weniger hoch. Das gemessene Wärmekapazitätsprofil muss somit nicht unbedingt exakt dem zur Zeit der Relaxationsmessung gültigen entsprechen. In der Berechnung einer Proportionalitätskonstanten wird dies zu berücksichtigen sein.

Extrudierte, somit unilamellare DPPC- Membranen zeigen im kalorimetrischen Profil bei gleicher Schmelzenthalpie ein wesentlich breiteres Profil (s. Abb. 4.11). Relaxationszeiten sind in dieser Lipidsuspension wesentlich niedriger, als in den oben vorgestellten Messungen, dennoch mit der Umwandlung verknüpft. Die Antwortzeit des Kalorimeters liegt bei knapp 5 Sekunden. Die gemessenen Relaxationswerte liegen mit ca. 3 Sekunden deutlich unterhalb dieser Zeit. Mit der Methode der Entfaltung der Messwerte von der Gerätefunktion (Abschnitt 2.3.1) wird es dennoch möglich, erhöhte Zeiten zu finden. Dessen ungeachtet leidet die Genauigkeit der Messung, die Auflösungsgrenze ist wohl eben erreicht.



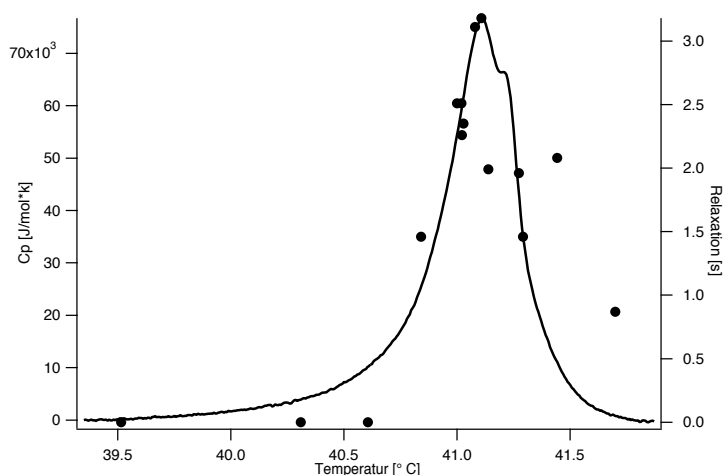


Abbildung 4.11: Wärmekapazität und Relaxationszeiten einer multilamellaren, extrudierten DPPC- Membran. Die Relaxationszeiten sind hier wesentlich niedriger als in den vorigen Fällen. Die gemessenen Werte liegen unterhalb der Responsezeit des Kalorimeters, die Auflösungsgrenze ist eben erreicht.

In der folgenden Tabelle sind für die einzelnen Messungen Proportionalitätskonstanten  $L$  zwischen Relaxationszeit und Wärmekapazität nach Formel 3.36 dargestellt.

Lipid	$L$ in $10^{12} \frac{K \cdot J^2}{mol^2 s}$	Abb. Nr.
DMPC MLV	1,242	4.7
DPPC MLV	1,246	4.8
DPPC MLV	1,773	4.9
DPPC LUV	(3,110)	4.11
Durchschnitt 1	$1,843 \pm 0,881$	
Durchschnitt 2	$1,420 \pm 0,305$	

Der erste Durchschnittswert bezieht sich auf den Durchschnitt aus allen Werten. In dem zweiten Durchschnittswert ist die Messung für große unilamellare Vesikel vernachlässigt. Diese fand an der Auflösungsgrenze der Apparatur statt – große Fehler sind hier kaum zu vermeiden. Die Abweichung der zweiten DPPC-MLV Messung von den beiden vorhergehenden Werten ist am

ehesten darin zu suchen, dass die Messung über einen zu langen Zeitraum stattfand und sich die Wärmekapazitätskurve wie beschrieben verschoben hatte.

## 4.2 Biomembranen

Messungen an künstlichen Lipidmembranen, wie zum Beispiel zu Relaxationszeiten, können immer nur auf Vorgänge in der Biologie hinweisen. Grundsätzliche Überlegungen an Modellsystemen sollten auf ihre Relevanz in „realen“, biologischen Systemen geprüft werden. Im folgenden Abschnitt soll deshalb das Verhalten einer einfachen biologischen Membran untersucht werden.

### 4.2.1 Lungensurfactant

Lungensurfactant (surfactant = surface active agent) ist der Oberflächenfilm der Lunge, welcher die Alveolen (Lungenbläschen) von der sie umgebenden Luft trennt. Lungensurfactant besteht zu 90 Gewichtsprozent aus Lipiden. Die Lipidmischung selbst besteht im Wesentlichen aus DPPC (80%). Zusätzlich sind im Surfactant spezifische Proteine eingelagert, Surfactantprotein (SP) A bis D. Gewaschener Lungensurfactant wurde von peripheren Proteinen, insbesondere SP-A, befreit.

#### Relaxationszeiten in Lungensurfactant

In der kalorimetrischen Messung zeigt der gewaschene Surfactant eine breite Umwandlung. Abbildung (4.12) zeigt das zugehörige Wärmekapazitätsprofil in physiologischer Kochsalz- und Kalziumumgebung (150 mM NaCl und 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) bei pH7,0 in einem Trispuffer unter verschiedenen Drucken. Das Ende der Umwandlung liegt im druckfreien Fall bei 33,44 °C, unter 100 bar bei 35,67 °C und unter 196 bar bei 37,89 °C. Gemessen wurde jeweils mit einer Messrate von  $60 \frac{\text{K}}{\text{h}}$ . Werden die Kurven unter Druck mit Hilfe der bekannten Gleichung (3.20):  $T^* = T(1 + \gamma \Delta p)^{-1}$  auf den druckfreien Fall reskaliert, so liegen sie praktisch deckungsgleich aufeinander (Abb. 4.13). Für die Konstante  $\gamma$  ergibt sich hier ein Wert von  $\gamma = 7,71 \cdot 10^{-4} \frac{\text{mJ}}{\text{J}}$ . Ebel et al. geben für diesen an künstlichen Modellmembranen gemessenen Skalierungsfaktor einen Wert von  $\gamma = 7,79 \cdot 10^{-4} \pm 0,11 \frac{\text{mJ}}{\text{J}}$  an [27]. Im Rahmen der angegebenen Genauigkeit reskaliert die Verschiebung von Lungensurfactant

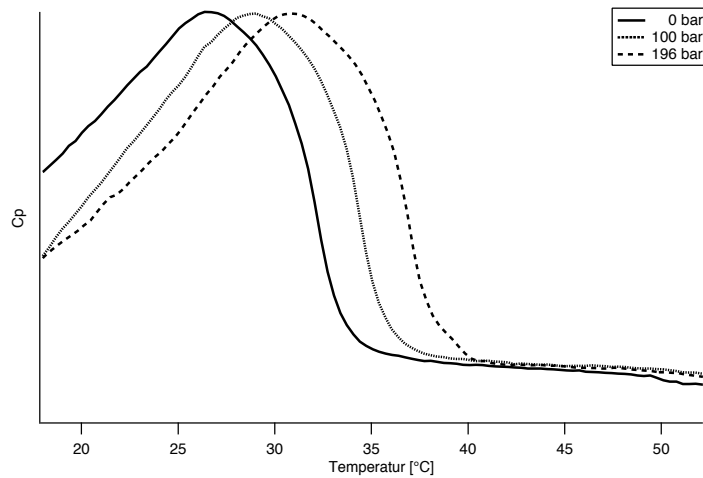


Abbildung 4.12: Oberflächenfilm der Lunge (Lungsurfactant) unter physiologischen Bedingungen (150 mM NaCl, 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$  in einem Tris-Puffer bei pH7,0). Kalorimetrische Messung in der Druckzelle bei 196, 100 und 0 bar.

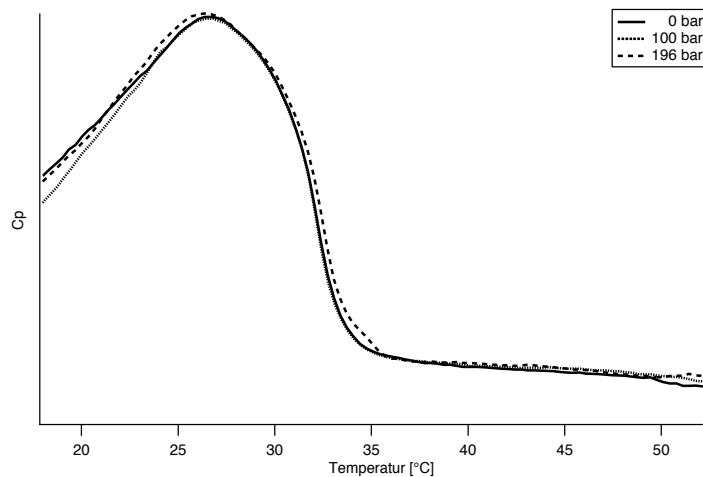


Abbildung 4.13: Wärmekapazität von Lungsurfactant reskaliert nach Gl.(3.20). Der Wert für den Skalierungsfaktor wurde Messungen an künstlichen Membranen entnommen.

genau wie die künstlicher Membranen auch. Aus dieser linearen Reskalierbarkeit sowie aus der Tatsache, dass die Umwandlung in dieser Substanz vollständig reversibel ist, liegt es nahe anzunehmen, es handele sich um eine reine Lipidumwandlung. Konformationsänderungen in Proteinen sind zwar in aller Regel auch mit einer Wärmeänderung verbunden und somit in einer kalorimetrischen Messung detektierbar, meist aber nicht reversibel. Die entfalteten Proteine bilden häufig Aggregate, eine Faltung in die ursprüngliche Form ist nicht mehr möglich.

Die Erfüllung des Kriteriums der linearen Reskalierbarkeit mit einem Faktor  $(1 + p \cdot \gamma)^{-1}$ , wie er aus Messungen an Modellmembranen bekannt ist, ermutigt zu Überlegungen über Relaxationsmessungen an dieser Membran. Voraussetzung für die korrekte Messung mit Hilfe der vorgestellten Drucksprungmethode ist die lineare Reskalierbarkeit der Wärmekapazitätskurve unter Druck. Eine direkte Messung der Relaxationszeiten in der Umwandlung von Lungensurfactant zeigt keinerlei Ergebnis. Die Auflösungsgrenze der verwendeten Apparatur liegt bei ca. 2 Sekunden (s. Abschnitt 4.1). Relaxationszeiten sollten somit unterhalb dieses Wertes liegen.

Geht man von einer Proportionalität zwischen Wärmekapazität und Relaxationszeit aus, so bietet sich die Möglichkeit, aus dem Wärmekapazitätsprofil von Lungensurfactant bei Kenntnis der Proportionalitätskonstanten aus Messungen an künstlichen Membranen Relaxationszeiten in der Umwandlung von Lungensurfactant abzuschätzen. Aus den im vorigen Abschnitt vorgestellten Relaxationsmessungen berechnet sich eine Relaxationskonstante nach der Gleichung  $\tau = \frac{RT^3}{2 \cdot L} \cdot C_p$  zu  $L = 1,42 \cdot 10^{12} \frac{K \cdot J^2}{mol^2 s}$  (Ausführliche Auswertung in Abschnitt 5.1). Für eine Abschätzung der Relaxationszeit bedarf es der Kenntnis der absoluten molaren Wärmekapazität. Da aufgrund der Heterogenität der Zusammensetzung von Lungensurfactant die Angabe eines exakten Molgewichtes nicht sinnvoll ist, wird die Wärmekapazität auf die Menge der gemessenen Substanz bezogen ( $C_p$  in  $\frac{J}{g \cdot K}$ ). Ungereinigter Lungensurfactant besteht zu 90 Gewichtsprozent aus Phospholipiden. Die für die Messung benutzte Substanz war von einem Großteil der Proteine gereinigt. Geht man somit davon aus, dass die erhaltene Wärme in erster Näherung aus dem Lipidanteil stammt und nimmt man ferner ein durchschnittliches molares Gewicht von  $700 \frac{g}{mol}$  an, so ergibt sich daraus eine grobe Abschätzung der molaren Wärmekapazität mit  $C_p = 1060 \frac{J}{mol \cdot K}$  an der Spitze der Umwandlung (s. Abb. 4.14). Mit Hilfe dieser Werte ergibt die Berechnung der Relaxationszeit an der Spitze der Umwandlung einen Wert von ca. 150 ms. Dieser Wert liegt weit unterhalb der Auflösungsgrenze der verwendeten Apparatur.

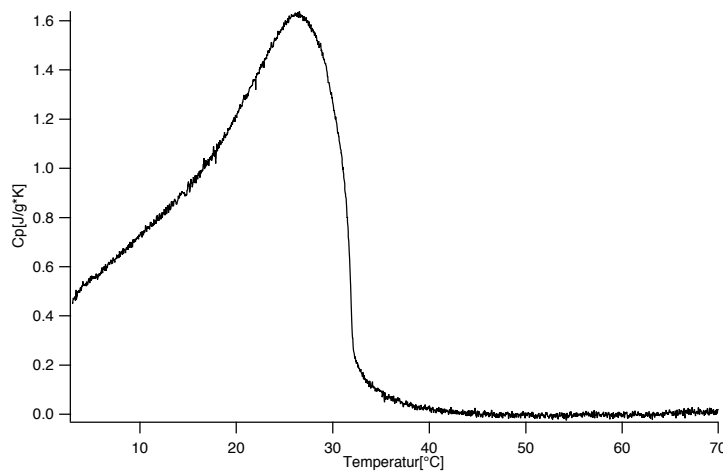


Abbildung 4.14: Da die Angabe eines Molgewichtes von Lungensurfactant aufgrund der Heterogenität der Mischung nicht sinnvoll ist, muss die Wärmekapazität für absolute Kurven in  $\frac{\text{J}}{\text{g}\cdot\text{K}}$  angegeben werden. Für diese absolute Kurve wurde die ursprüngliche um eine Grundlinie korrigiert.

### Ungereinigter Lungensurfactant

Die bisherigen Messungen erfolgten an gereinigtem Surfactant, aus dem für seine Funktion wesentliche Proteine entfernt waren. Die folgenden Messungen wurden an Surfactant durchgeführt, welcher nicht von peripheren Proteinen gereinigt ist. Der eigentliche Unterschied zur gesäuberten Probe besteht im Vorhandensein des Surfactantproteins SP-A. Abbildung (4.15) zeigt kalorimetrische Messungen, welche direkt aufeinander folgten (von oben nach unten). Die erste Messung endet bei 45 °C, weit über einer für Säuger erträglichen Körpertemperatur. Dennoch bleibt die Umwandlung dieselbe wie im Falle der gereinigten Substanz. Erst in der Wiederholungsmessung bis 55 °C tritt eine Veränderung gegenüber dem bekannten Profil auf. In einem weiteren Scan bis 80 °C tritt an genau derselben Stelle eine erhöhte Wärmekapazität mit einem Maximum bei 56,5 °C auf. Diese verschwindet in einem weiteren Scan. Das erste Maximum, welches im vorigen Abschnitt mit einer Lipidumwandlung identifiziert wurde, behält seine Form über den einzelnen Scans bei. Es liegt nahe anzunehmen, dass das zweite Maximum mit der Denaturierung des Proteines SP-A verbunden ist, da der Peak nur in der Probe mit diesem Protein zu finden ist und er, anders als bei Lipidumwandlungen,

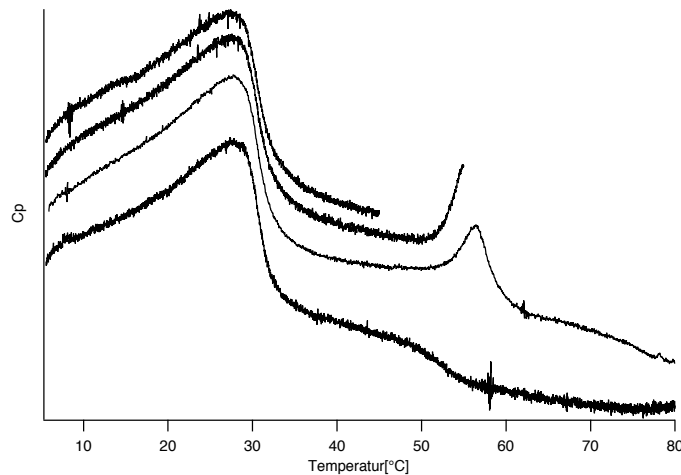


Abbildung 4.15: Lungensurfactant mit Surfactantprotein-A unter physiologischen Bedingungen in der normalen Zelle des Kalorimeters gemessen. Die Lipidumwandlung hat sich gegenüber der proteinfreien Probe nicht verändert. Der zweite Peak liegt bei 56,46 °C (Mitte des Peakprofils).

nicht reversibel ist.

Eine Messung der Wärmekapazität unter 150 bar Druck zeigt die bereits bekannte Verschiebung der Lipidumwandlung. Das zweite Maximum bei ca. 57,8 °C dagegen ist gegenüber dem einer druckfreien Messung kaum verschoben (s. Abb. 4.16). Offensichtlich ist die Entfaltung des Proteines mit einer nur sehr geringen Volumenänderung verbunden.

Auffallend bei der Wiederholungsmessung ist ein Effekt, welcher sich in der in Abb. (4.15) dargestellten Messung nur andeutet (s. Abb. 4.17). Nach der Denaturierung des Proteins verteilt sich die Lipidumwandlung auf einen weiteren Temperaturbereich, in dem eine Schulter hin zu höheren Temperaturen zu finden ist. Ivanova und Heimbürg [31][32] identifizieren eine Schulterbildung bei Umwandlungsprofilen von Lipidmembranen mit in der Membran löslichen Stoffen als Aggregation dieser Stoffe in der Lipidphase, auf deren Seite sich die Schulter bildet. Im vorliegenden Falle würde das einer Aggregation des denaturierten Proteines SP-A in der fluiden Phase des Lungensurfactant entsprechen.

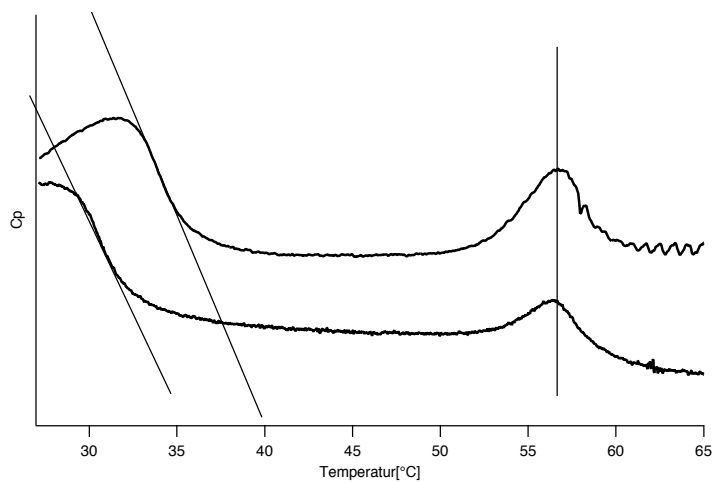


Abbildung 4.16: Wärmekapazitätsprofil von Lungensurfactant unter 150 bar Druck (obere Kurve) und ohne Druck (untere Kurve). Das erste Maximum ist wie im Falle der gereinigten Substanz verschoben. Der zweite Peak dagegen kaum. Die mit diesem Maximum identifizierte Proteindenaturierung scheint mit keiner nennenswerten Volumenveränderung verbunden zu sein.

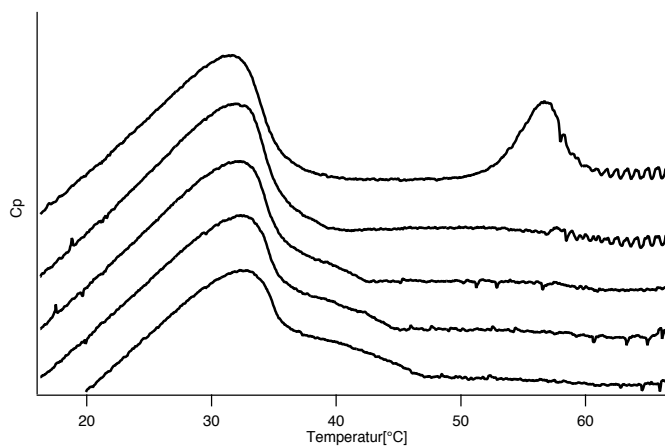


Abbildung 4.17: Folgemessungen von Lungensurfactant mit Surfactantprotein SP-A unter 150 bar Druck. Dargestellt sind Folgemessungen, nach der Denaturierung des Proteins. Die Schulter in den Folgescans weist auf eine Aggregation des denaturierten Proteins in der fluiden Membran hin.

## 4.3 Netzwerke von Lipidmembranen

Alle bisher untersuchten Membranen erfüllen die notwendigen Kriterien für die Auswertbarkeit einer Messung der Relaxationszeit nach der oben beschriebenen Methode, d.h. unter Druck verschiebt sich die Umwandlung, ohne dass sich die Form dieser ändert. Für das Phospholipid DMPG kann diese Eigenschaft nicht mehr nachgewiesen werden. Das ungewöhnliche Wärmekapazitätsprofil verschiebt sich zwar mit dem Druck hin zu höheren Temperaturen, verändert aber dabei seine Form. Dadurch ist die Proportionalität zwischen Volumen- und Enthalpieänderung während der Umwandlung nicht mehr gewährleistet. Die Messung von Relaxationszeiten nach der oben vorgestellten Methode stellt keine eindeutigen Ergebnisse mehr in Aussicht. Das Verhalten dieser Membran soll im Folgenden näher untersucht werden.

### 4.3.1 Wärmekapazität von DMPG unter Druck

Anders als alle von uns untersuchten Membranen zeigt das einfach negativ geladene Phospholipid DMPG keine lineare Verschiebung der Wärmekapazität unter Druck. Die Profile zeigen im Unterschied zu den Profilen gewöhnlicher Lipide eine verbreiterte Umwandlung mit einer Aufspaltung in drei Maxima. Mit einem Erhöhen des Druckes wandern erster und letzter Peak auseinander (s. Abb. 4.18).

Das hat zur Folge, dass die Voraussetzungen für eine im Rahmen der oben angeführten Theorie (Abschnitt 3.4) auswertbaren Relaxationsmessung in das thermodynamische Gleichgewicht nicht gegeben sind. Dennoch wurden versuchsweise Drucksprünge in die Umwandlung unternommen. Die Antworten des Kalorimeters auf Drucksprünge zeigten in der Zeitkonstanten der Relaxation keinen Unterschied zur lipidfreien Kalibrierungsprobe. Überträgt man die Überlegungen zu Lungensurfactant, bei dem versucht wurde, auf dessen Relaxationsverhalten aus Relaxationsmessungen an Modellmembranen zu schliessen, würden dies im Falle von DMPG zu einem Wert von ca. 1,7 s am absoluten Maximum der Umwandlung führen. Dieser Wert liegt knapp unterhalb der Auflösungsgrenze der Apparatur.

Die Aufspaltung eines Lipidumwandlungsprofiles in drei Maxima kann mit Hilfe eines auf Schneider und Heimburg zurückgehenden einfachen Modells verstanden werden, so wie es in Abschnitt 3.3 beschrieben ist [29]. Zum Verständnis einer Dreipeakaufspaltung wird (z.B. mit Hilfe von Simulationen) die Gibbssche Freie Enthalpie über der Temperatur jeweils für eine



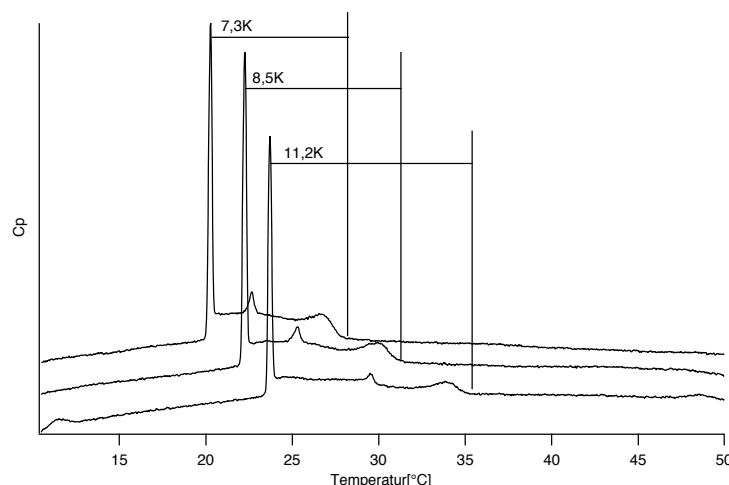


Abbildung 4.18: Anders als bei „normalen“ Membranen spaltet sich das Wärmekapazitätsprofil von DMPG auf in drei Maxima. Dieses Profil behält unter Druck seine Form nicht bei.

gekrümmte und eine planare Membran bestimmt. Zum Wert der Freien Enthalpien wird zusätzlich ein Parameter der Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel addiert. Ist der Unterschied in diesen Wechselwirkungsparametern für gekrümmte und planare Membran geeignet gewählt, so schneiden sich die Kurven der Freien Enthalpien. Für bestimmte Membranen wird es somit in einem bestimmten Temperaturbereich günstiger, vom planaren in den gekrümmten Zustand überzugehen (s. Abschnitt 3.3 bzw. Abb. 3.1). Im zugehörigen Wärmekapazitätsprofil spiegelt sich dies als eine Aufspaltung in drei Peaks wider. Genau diese Art der Aufspaltung wird in DMPG gefunden. Der erste Peak wird hierbei als Übergang von einer planaren zu einer gekrümmten Membran verstanden, der zweite als Resultat einer Kettenschmelze (der eigentlichen Umwandlung) und der dritte Peak als Übergang von der gekrümmten zurück zu einer planaren Membran. Im Rahmen dieser Theorie wird es auch möglich zu verstehen, aus welchem Grund das Profil des DMPG unter Druck seine Form respektive seine Breite verändert. Geht man davon aus, dass der Unterschied in den Wechselwirkungsparametern  $G_{solv}$  zwischen Lipid und Lösungsmittel nach Gleichung (3.23) abhängig ist vom Umgebungsdruck, so verschieben sich die Schnittpunkte der Freien Enthalpie der gekrümmten und der planaren Membran. Das hiermit gekoppelte Wärmekapazitätsprofil verbreitert sich, was in Abb.(4.19) schematisch angedeutet ist.

### 4.3.2 Membrannetzwerke

Bei der Untersuchung von DMPG-Suspensionen fällt auf, dass diese im Unterschied zu anderen Lipidsuspensionen im Bereich der Umwandlung eine stark erhöhte Viskosität aufweisen. Die je nach Präparation der Probe um einen Faktor 25 bis 120 gegenüber Wasser erhöhte Viskosität setzt mit dem ersten Peak im Wärmekapazitätsprofil ein und endet ungefähr mit dem dritten der Maxima (Abb. 4.20). Schneider und Heimbürg [29] identifizieren dies mit der Umwandlung einer Vesikelstruktur in ein langreichweitiges Membrannetzwerk am ersten Maximum des Wärmekapazitätsprofils und mit einer Umwandlung zurück in eine vesikuläre Struktur am letzten Maximum. Zur Untermauerung dieser These wurden elektronenmikroskopische freeze-fracture-Aufnahmen gemacht. Bei diesem Verfahren wird die Lipidprobe bei einer bestimmten Temperatur mit mehr als  $10.000 \frac{K}{s}$  schockgefroren. Die Probe wird zerbrochen, mit Kohlenstoff und Metall bedampft und unter einem Elektronenmikroskop untersucht. Es wird davon ausgegangen, dass die Probe in der kurzen Zeit des Gefrierens keine strukturellen Veränderungen erfährt. Bei den Aufnahmen sind unterhalb der Schmelzumwandlung Vesikel mit einem Durchmesser von ungefähr 1000 nm zu erkennen. Im Bereich der Umwandlung sind keine identifizierbaren Strukturen zu sehen, oberhalb des dritten Peaks sind wiederum Vesikel, allerdings mit einem Durchmesser von ca. 20 nm zu beobachten (s. Abb. 4.21). Nicht nur die unidentifizierbare Struktur und die hohe Viskosität in der Umwandlung sprechen für das postulierte Netzwerk, sondern auch die Tatsache, dass Vesikel bei tiefen Temperaturen deutlich grösser sind als bei hohen Temperaturen. Damit dies möglich ist, bedarf es eines irgendwie gearteten reversiblen Verschmelzungsprozesses, bzw. Teilungsprozesses der Vesikel, je nachdem in welche Richtung die Temperatur verändert wird.

Um die beobachtete Größenveränderung der Vesikel quantitativ fassen zu können, wurden Lichtstreuexperimente bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt (Abb. 4.22). Bei 40 °C, oberhalb der Umwandlung, haben DMPG-Vesikel einen mittleren Durchmesser von ca. 40 nm. Unterhalb der Umwandlung, bei 13 °C ist der Durchmesser mit 300 nm um fast eine Größenordnung größer.

Bei einer Vergleichsmessung mit DMPC, welches sich von DMPG durch die ungeladene Kopfgruppe unterscheidet und eine „gewöhnliche“ Umwandlung

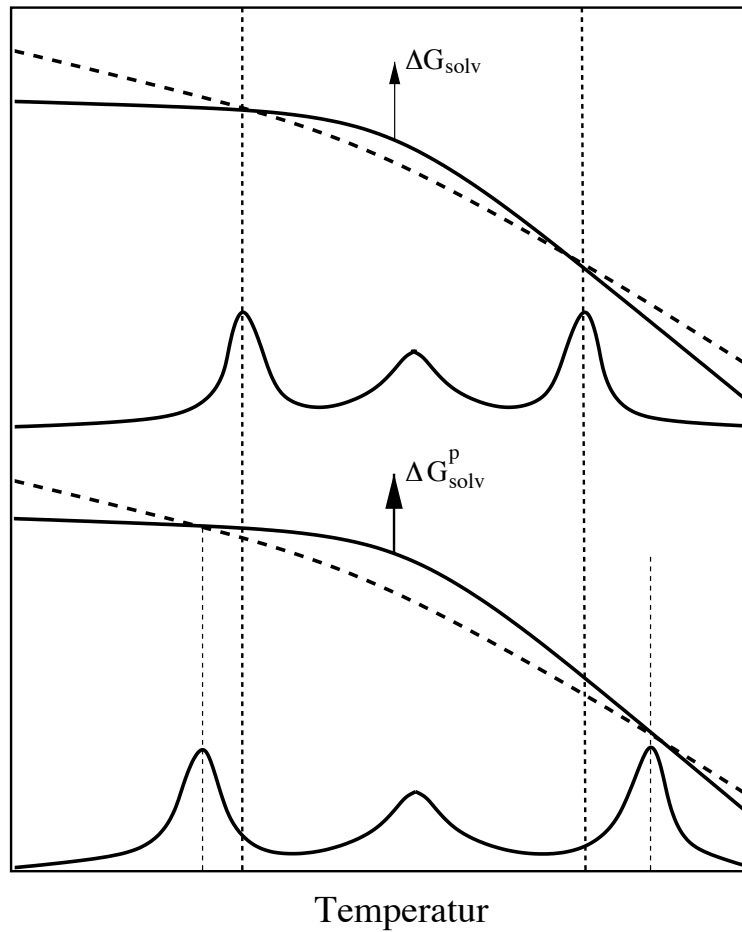


Abbildung 4.19: Bei einer Druckabhängigkeit der Wechselwirkungsparameter mit dem Lösungsmittel erscheint es denkbar, dass die Schnittpunkte der Freien Enthalpien (s. Abschn. 3.3) unter Druck auseinanderwandern, was, wie hier schematisch angedeutet, zu einer Verbreiterung des Wärmekapazitätsprofils führen würde.

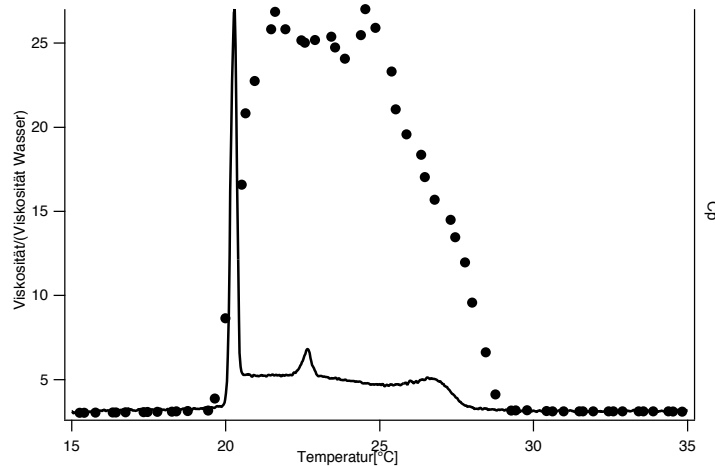


Abbildung 4.20: *Im Bereich der Umwandlung von DMPG erhöht sich die Viskosität stark. Schneider und Heimbürg identifizieren dies mit einem langreichweitigen Membrannetzwerk.*

zeigt, kann keine so starke Veränderung des mittleren Durchmessers gefunden werden (Abb. 4.23). Er bleibt mit 110 nm bei 13 °C und 70 nm bei 40 °C im gleichen Größenbereich. Der trotzdem unverständliche Unterschied in der Größenverteilung bei einer niedrigen und einer hohen Temperatur könnte aus der hohen Temperaturdifferenz zwischen den Messungen resultieren. Für die Bestimmung der Grösse in der Lichtstreuung wird von der Voraussetzung ausgegangen, es handle sich um kugelförmige Objekte. Diese Annahme trifft hier eventuell nicht mehr zu. Membranen sind im fluiden Zustand sehr viel weicher als im gelförmigen. Sind die Vesikel bei 40 °C z.B. oval verformt, wird eine Abweichung verständlich. Bei dem viel grösseren Unterschied bei DMPG erscheint dies nicht mehr wahrscheinlich. Ebel [26] findet für den Unterschied in der Größenverteilung von DMPC unterhalb und oberhalb der Schmelzumwandlung 104 nm (bei 22 °C), bzw. 106 nm Durchmesser (bei 24 °C). Wird mit anderen Worten direkt unterhalb und oberhalb der Umwandlung gemessen, verschwindet der Unterschied im Durchmesser praktisch vollständig.

Der Unterschied in der absoluten Größenverteilung zu den elektronenmikroskopischen Aufnahmen des DMPG (Durchmesser von 1000 nm oberhalb und 200 nm unterhalb der Umwandlung) mag an der Zubereitung der Probe liegen. Der Probe müssen mehrere chemische Zusätze zugegeben werden, damit

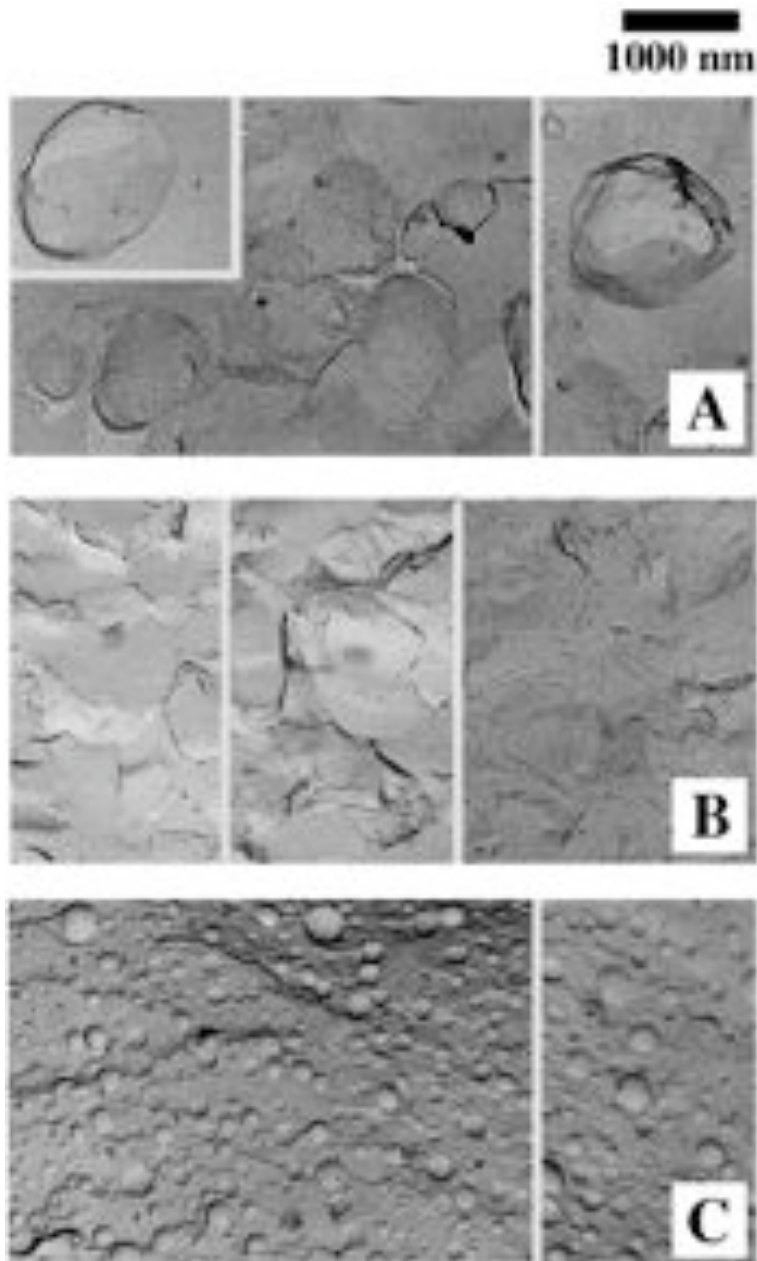


Abbildung 4.21: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von DMPG unterhalb (A bei 9°C), in (B bei 24,5°C) und oberhalb (C bei 50°C) der Schmelzwandlung. Unterhalb der Umwandlung sind grosse, oberhalb der Umwandlung kleine Vesikel zu erkennen. In der Umwandlung ist eine nicht-vesikuläre Struktur zu sehen. Abb. aus [29].

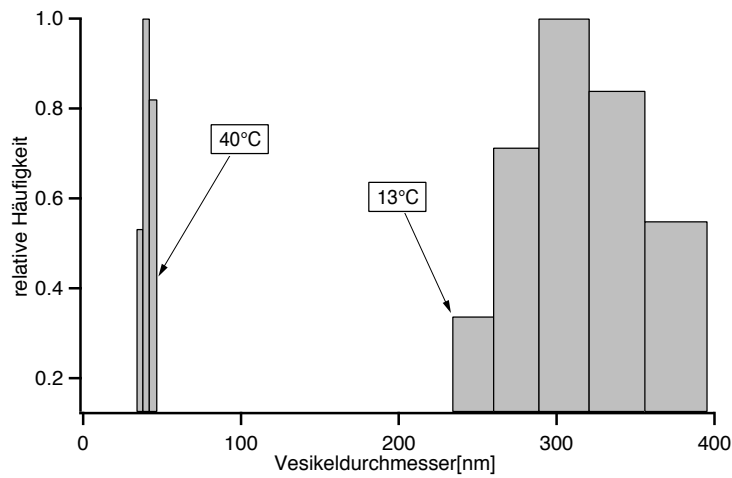


Abbildung 4.22: Lichtstreuexperimente zeigen, dass der mittlere Durchmesser von DMPG-Vesikeln unterhalb der Schmelzumwandlung mit 40 nm deutlich unter dem Wert bei 13 °C von ca. 300 nm liegt. In die Berechnung dieser Werte geht die Annahme ein, es handle sich um kugelförmige Objekte.

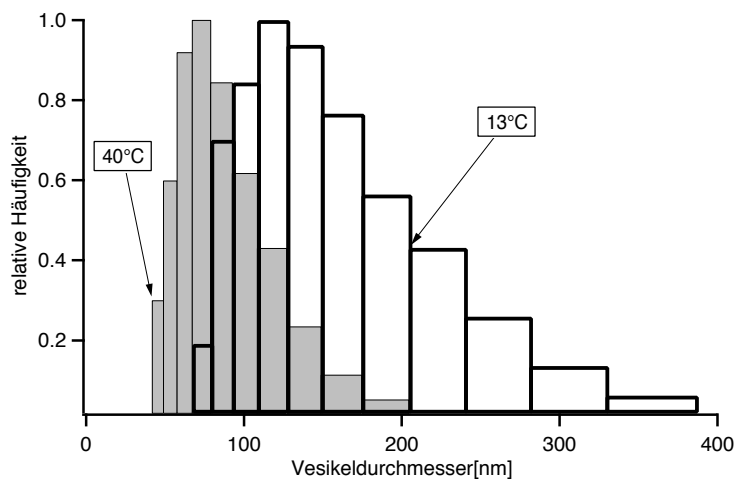


Abbildung 4.23: Lichtstreuexperimente zeigen, dass der Unterschied in der Vesikelgröße von DMPC unterhalb und oberhalb der Schmelzumwandlung nicht allzu gross ist.

sich während des Einfrierprozesses keine Eiskristalle bilden, ferner wurde dieses Experiment bei einer Lipidkonzentration von 45 mM durchgeführt: Die vorliegenden Lichtstreuexperimente fanden bei einer Lipidkonzentration von weniger als 10 mM statt (s. Abschn. 2.5). Auf die Ausbildung einer Dreipeak-aufspaltung im Wärmekapazitätsprofil haben die erwähnten Zusätze keinen Einfluss.

Die Annahme einer Umwandlung von einer vesikulären Struktur hin zu einer netzwerkartigen scheint somit plausibel. Biologisch könnte dieses einfache Prinzip der Netzbildung aufgrund einer Minimierung der Freien Enthalpie helfen, Fusions- und Teilungsprozesse zu verstehen, die in der Natur häufig vorkommen.

**Biologische Relevanz** Biologisch relevant kann die vorgestellte Netzbildung bzw. der Fusionsprozess nur sein, wenn der Vorgang von einem Organismus gesteuert werden kann. Die Fusion der DMPC-Vesikel ist bestimmt von thermodynamischen Größen wie Temperatur und Druck. Weiter unten wird gezeigt werden, dass durch eine veränderte Natriumionenkonzentration die Umwandlung verändert und damit die Fusionstemperatur in einem gewissen Rahmen beeinflussbar wird. Schneider [30] weist darauf hin, dass insbesondere freies Kalzium, von dem man annimmt, dass es bei Fusionsprozessen eine wichtige Rolle spielt (s. z.B. [35]), zu einer starken Veränderung der Umwandlungstemperatur bzw. des Wärmekapazitätsprofils führt. Hier soll gezeigt werden, dass es möglich ist, in Membranen, die unter normalen Bedingungen nur Vesikel bilden, eine Dreipeak-aufspaltung mit einer erhöhten Viskosität zu erzeugen.

Das Phospholipid DMPC unterscheidet sich von dem netzwerkbildenden DMPG durch seine ungeladene Kopfgruppe. Die Umwandlung von DMPC erfolgt in einem Schritt, ohne dass die Viskosität an dieser Stelle ansteigt (s. Abb. 4.24). Mit dem Molekül Losartan (Struktur Abb. 4.25) wurde ein Stoff gefunden, welcher sich in Membranen löst und einfach negativ geladen ist. Marsh und Theodoropoulou konnten zeigen, dass sich bei Zugabe dieses Stoffes zu DMPC und DPPC das Wärmekapazitätsprofil signifikant ändert [37]. Das Profil geht von einer schmalen Umwandlung in ein stark verbreitertes Profil mit einer Aufspaltung in drei Maxima über. Eine Messung der Viskosität im Bereich der Aufspaltung unter den angegebenen äusseren Bedingungen zeigt eine um einen Faktor 2000 gegenüber Wasser erhöhte Viskosität (Abb. 4.26). Für den Fusionsprozess, bzw. für die Bildung eines Membrannetzwer-

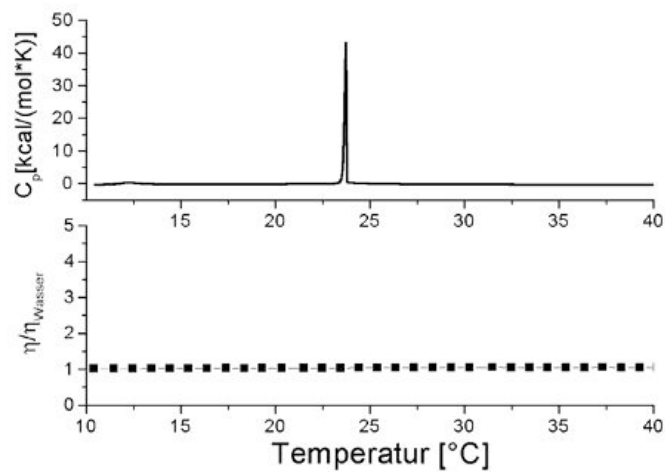


Abbildung 4.24: Wärmekapazitätsprofil und Viskosität einer multilamellaren DMPC-Membran. Die Umwandlung erfolgt in einem Schritt, in der Viskosität ist keine Veränderung zu finden.

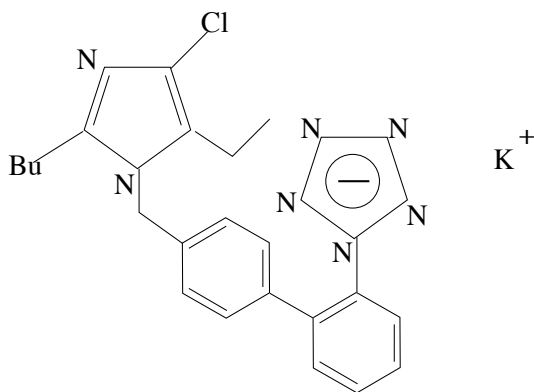


Abbildung 4.25: Struktur des einfach negativ geladenen Moleküles Losartan



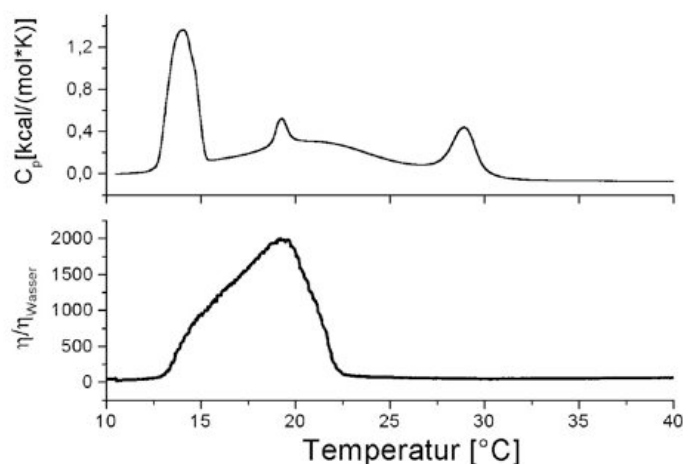


Abbildung 4.26: Wärmekapazitätsprofil von DMPC mit Losartan. Eine Aufspaltung in drei Peaks mit einer stark erhöhten Viskosität tritt auf.

kes scheint die geladene Membran entscheidend zu sein. Eine Veränderung der Elektrostatik in der Flüssigkeit z.B. durch Zugabe von Ionen beeinflusst, wie im folgenden Paragraphen gezeigt werden wird, die Ausbildung solcher Strukturen.

### 4.3.3 Einfluss von NaCl auf Membrannetzwerke

Einfluss auf das Wärmekapazitätsprofil von DMPG und damit auf den Prozess der Netzbildung respektive der Fusion von Vesikeln hat ausser den genannten Faktoren Druck und  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die Konzentration von Natriumionen im Lösungsmittel. Natrium unterdrückt mit zunehmender Konzentration die Ausbildung eines Netzwerkes (s. Abb. 4.27). Mit zunehmender Natriumionenkonzentration wird das Umwandlungsprofil von DMPG immer schmaler, bis bei einer Konzentration von 200 mM die Aufspaltung ganz verschwindet. Die Umwandlung wird damit der des ungeladenen DMPC sehr ähnlich. Für jede der Natriumionenkonzentrationen wurde bei Drucken von 0 bar, 100 bar und 193 bar gemessen. Druck verbreitert auch bei veränderter Natriumumgebung das Umwandlungsprofil in DMPG und verschiebt dieses hin zu höheren Temperaturen.

Trägt man für verschiedene Drücke Anfang und Ende der Umwandlungs-

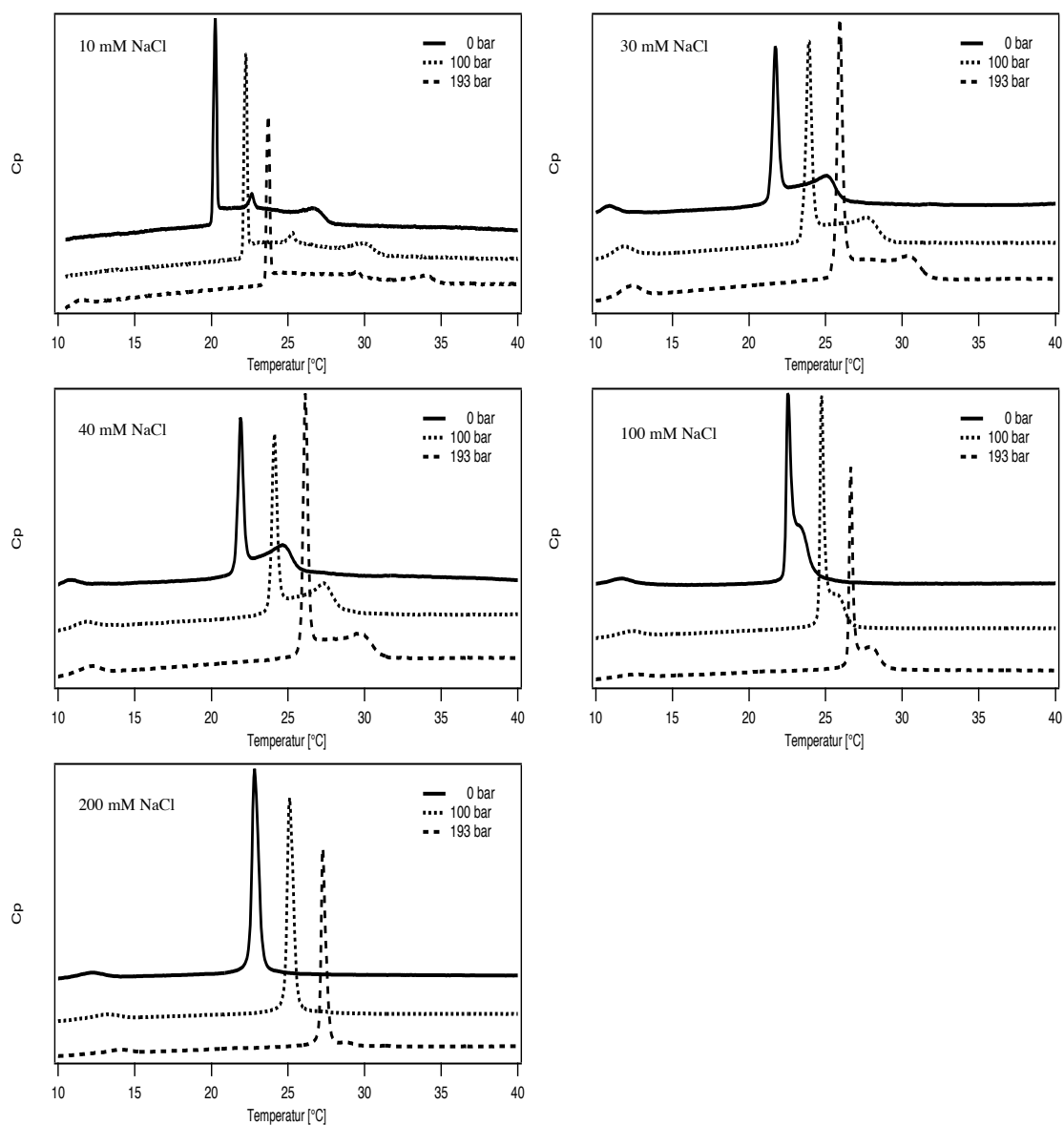


Abbildung 4.27: Wärmekapazitäten von DMPG unter Druck bei verschiedenen  $\text{Na}^+$ -Ionenkonzentrationen. Von oben links nach unten rechts: 10 mM NaCl, 30 mM NaCl, 40 mM NaCl, 100 mM NaCl, 200 mM NaCl. Die Breite der Umwandlung nimmt mit steigender Natriumkonzentration ab, Druck verbreitert die Aufspaltung nach wie vor. Bei einer Konzentration von 200 mM Natriumchlorid ist die Aufspaltung vollständig verschwunden.

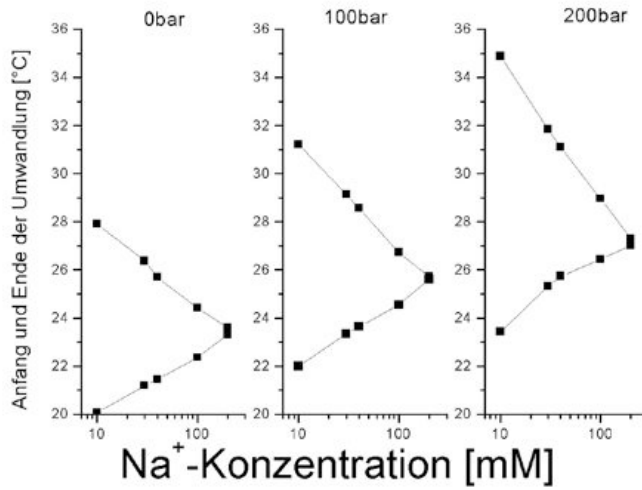


Abbildung 4.28: *Breite der Umwandlung von DMPG bei verschiedenen Natriumkonzentrationen unter verschiedenen Drucken. In der logarithmischen Auftragung ist im betrachteten Bereich ein näherungsweise linearer Zusammenhang zwischen  $\text{Na}^+$ -Konzentration und Anfang und Ende der Umwandlungstemperatur erkennbar.*

temperatur über der logarithmierten  $\text{Na}^+$ -Konzentration auf, so ist im betrachteten Bereich für jeden der untersuchten Drucke ein näherungsweise linearer Zusammenhang zu erkennen (Abb. 4.28). Diesen logarithmischen Zusammenhang kann man versuchen, mit Hilfe der Gouy-Chapman Theorie zu verstehen. Diese beschreibt den Einfluss freier Ladungsträger auf die Elektrostatik geladener Oberflächen. Das einfach negativ geladene Phospholipid DMPG bildet solch eine geladene Oberfläche, welche durch die positiven Natriumionen abgeschirmt wird. Nach der Gouy-Chapman Theorie verringert die Konzentration freier Gegenionen das Oberflächenpotential um [72]:<sup>1</sup>

$$\Psi = -\frac{kT}{e} \ln \left\{ \left( \frac{\sqrt{\frac{2\varepsilon kT}{\pi}}}{2\sigma} \right)^2 c \right\}$$

Der logarithmische Zusammenhang zwischen Natriumionenkonzentration und Breite der Umwandlung deutet somit darauf hin, dass die Bildung eines Netz-

<sup>1</sup> $k$ : Boltzmannkonstante,  $e$ : Elementarladung,  $\varepsilon$ : Dielektrizitätskonstante,  $\sigma$ : Oberflächenladung,  $c$ : Gegenionenkonzentration

werkes stark von der Elektrostatik der Substanz abhängt. Neben Temperatur und Druck ist es möglich, mit einer Veränderung der äusseren Bedingungen Membrannetzwerke zu induzieren und dies sogar in Lipidsystemen, welche unter normalen Bedingungen lediglich in einer einfachen vesikulären Struktur vorkommen, ist es durch Zugabe bestimmter Stoffe möglich, eine Fusion einzelner Vesikel zu induzieren. Ob in der Natur lokal ähnliche Prozesse tatsächlich auftreten, läßt sich mit diesen Messungen freilich nicht zeigen. Dennoch erscheint es zumindest plausibel, dass solche Vorgänge eine Rolle spielen könnten.

## 4.4 Viskoelastische Eigenschaften von DMPG-Membranen

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die Bedingungen einer Netzwerkbildung in Membranen beschrieben. Relaxationsmessungen in das thermodynamische Gleichgewicht konnten nicht durchgeführt werden. Die Messung des viskoelastischen Verhaltens dieser Netzwerkphase soll im folgenden Abschnitt einen Eindruck von mechanischen Relaxationsphänomenen vermitteln.

Zur Charakterisierung viskoelastischer Flüssigkeiten wird üblicherweise die Spannung  $\sigma$  (diese hat die Einheiten einer Kraft pro Fläche) als Antwort auf eine oszillatorische Dehnung  $\varepsilon$  angegeben. Die komplexe GröÙe  $G = \frac{\sigma}{\varepsilon}$  (Spannung pro Dehnung) besteht aus einem Anteil  $G'$  in Phase mit der Anregung und einem Teil  $G''$  um  $\frac{\pi}{2}$  gegen die Anregung phasenverschoben. Für den Verlauf dieser GröÙen erwartet man für eine rein viskose Substanz für  $G'$  den Wert Null und für  $G''$  einen linearen Anstieg mit der Frequenz, für Substanzen mit elastischem Anteil den in Abb. 2.8 dargestellten Verlauf. Dabei wurde die Annahme gemacht, die mechanischen Eigenschaften der Flüssigkeit könnten durch ein Feder-Dämpfer-System in Reihe dargestellt werden (Maxwell-Modell). Für den Verlauf von  $G'$  wird in der doppeltlogarithmischen Auftragung ein Anstieg mit der Steigung 2 erwartet. Bei der „Resonanzfrequenz“ der Feder wird  $G'$  konstant.  $G''$  sollte mit einer Steigung +1 ansteigen, bei der Resonanz ein Maximum erreichen und dann mit einer Steigung von -1 abfallen. In Abbildung 4.29 ist der theoretisch zu erwartende Verlauf einer viskoelastischen Flüssigkeit, welche mit dem Maxwellmodell beschrieben wird, aufgetragen.

#### 4.4. VISKOELASTISCHE EIGENSCHAFTEN VON DMPG-MEMBRANEN 69

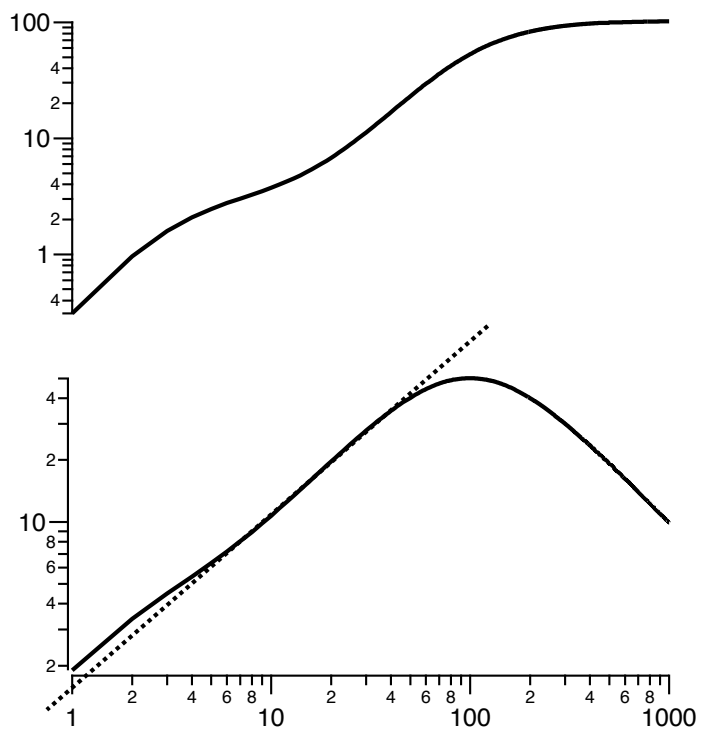


Abbildung 4.29: Schematischer Verlauf der zu erwartenden Kurve für  $G'$  (oben) und  $G''$  (unten), wenn in der Substanz mehrere Resonanzbereiche zu finden sind.

Es erscheint vorstellbar, dass in einer viskoelastischen Flüssigkeit verschiedene Resonanzen angeregt werden können. Das führt zu mehreren hintereinanderfolgenden Plateaus in  $G'$ . Der Verlauf von  $G''$  ist davon nicht unabhängig. Wird ein Plateau erreicht, so ist für den Verlauf von  $G''$  ein Maximum zu erwarten. Kurven aus Substanzen mit mehreren Relaxationszeiten addieren sich zu einer Resultierenden auf, wie in Abbildung 4.29 schematisch verdeutlicht. Für im betrachteten Frequenzbereich rein viskose Substanzen sollte  $G'$  null sein und  $G''$  linear mit der Frequenz ansteigen.

Gemessen wurde eine 10 mM DMPG-Suspension in einem 10 mM HEPES-Puffer bei pH7,0 mit 1 mM EDTA und 10 mM NaCl bei verschiedenen Temperaturen unterhalb und in der Umwandlung (Abb. 4.30). Zur Messung wurde ein Antwortprofil über der Frequenz der Anregung aufgenommen. In Abschnitt 2.4.2 wird beschrieben, wie bei dem benutzten oszillatorisch angeregten Rotationsviskosimeter Messdaten von einer Gerätefunktion zu entfalten sind. Die aufgetragenen Werte der Größen  $G'$  und  $G''$  sind relativ zur Viskosität von Wasser aufgetragen. Der Wert der Konstanten  $\eta_{H_2O}$  in den Gleichungen zur Auswertung 2.22 und 2.23 ist auf 1 gesetzt. Die Viskosität von Wasser hängt von der Temperatur ab. Im betrachteten Temperaturbereich führt dieser Fehler aber nur zu einem geringfügigen Offset in  $G'$  und  $G''$ .

Notwendige Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Maxwellmodells auf eine viskoelastische Flüssigkeit ist der lineare Zusammenhang zwischen Anregung und Antwort des Systems. Auf einen anregenden Sinus antwortete die vorgestellte Flüssigkeit immer mit einem (wenn auch phasenverschobenen) ebenfalls reinen Sinus. In Abbildung 4.31 ist die Amplitude einer Wasserantwort mit dem Amplitudenverlauf aus einer DMPG-Messung bei 20 °C, d.h. kurz unterhalb der Schmelzumwandlung, aufgezeichnet. Die Amplitude von DMPG ist geringfügig größer als die von Wasser. Im Phasenunterschied zur Anregung ist keine Differenz auflösbar (s. Abb. 4.32). In Abbildung 4.33 sind Verhältnis der Amplituden und Differenz der Phasen unterhalb der Umwandlung von DMPG dargestellt. Daraus ergibt sich für  $G'$  und  $G''$  der in Abbildung 4.34 dargestellte Verlauf. DMPG reagiert unterhalb der Schmelzumwandlung wie für eine rein viskose Substanz zu erwarten; der Anteil in Phase ( $G'$ ) ist praktisch null, der um  $\frac{\pi}{2}$  verschobene Anteil,  $G''$  steigt linear mit der Frequenz an. Die Steigung sollte wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben der Viskosität relativ zu der von Wasser entsprechen. Der Wert ist mit  $0,94 \pm 0,12$  etwas zu klein. Man erwartet nach den vorangegangenen Messungen ohne oszillierende Anregung eine mindestens so hohe Viskosität wie bei

#### 4.4. VISKOELASTISCHE EIGENSCHAFTEN VON DMPG-MEMBRANEN 71

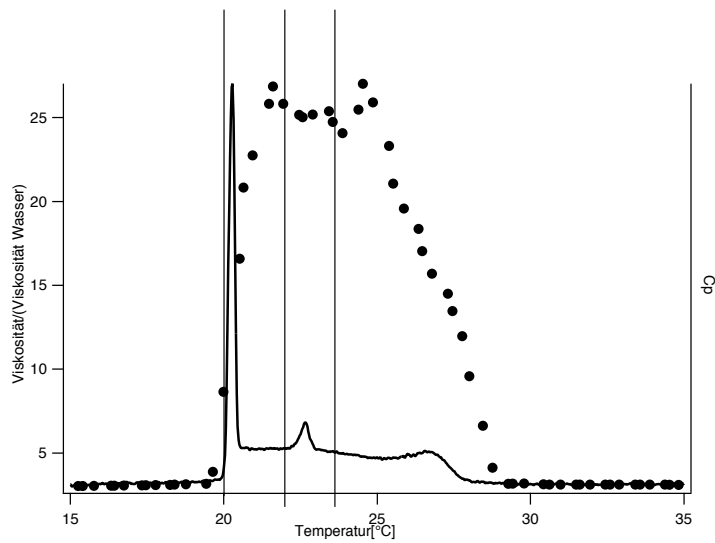


Abbildung 4.30:  $C_p$ -Profil von DMPG mit Viskositätsmessung. Die Linien bei 20 °C, 22 °C und 23 °C deuten an, an welcher Stelle in der Schmelzumschmelzung viskoelastische Messungen durchgeführt wurden.

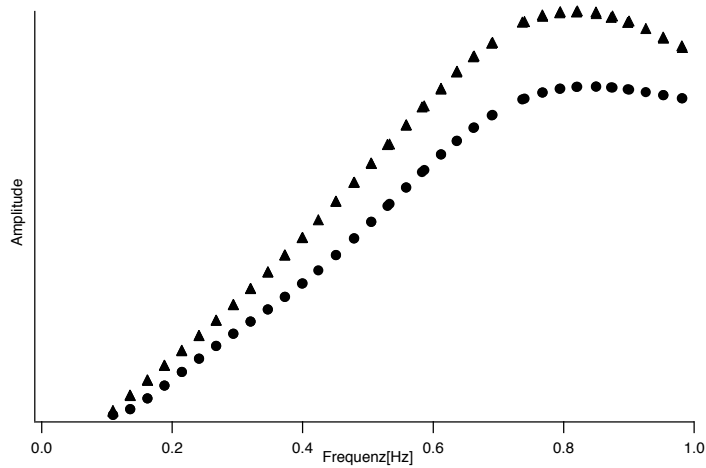


Abbildung 4.31: Verlauf der Amplituden der Antwort auf eine oszillierende Kraft auf DMPG (Dreiecke) und Wasser (runde Symbole) bei 20 °C. Die Amplitude einer DMPG-Dispersion ist geringfügig größer als die von Wasser.

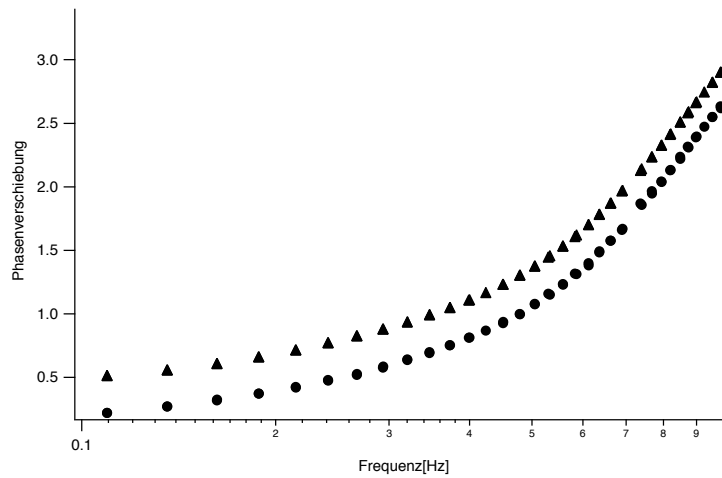


Abbildung 4.32: *Phasenunterschied zur Anregung in DMPG und Wasser bei 20 °C. Da die Ergebnisse der beiden Messungen nahezu identisch sind, ist die DMPG-Phase mit einem Offset von +0,3 versehen.*

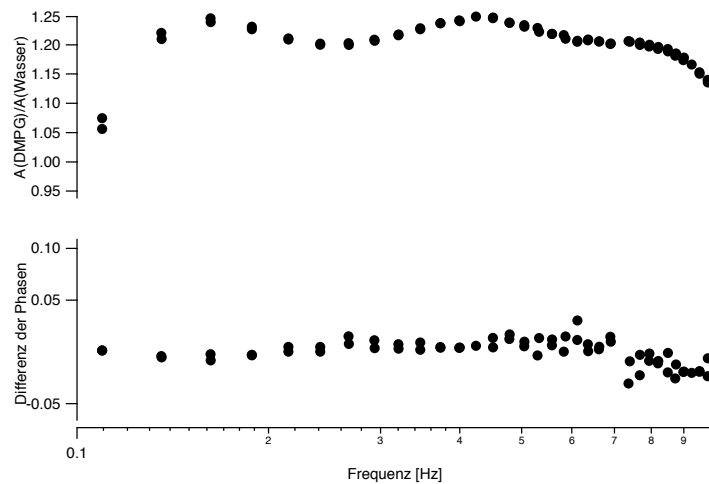


Abbildung 4.33: *Unterschied in Amplitude und Phasendifferenz zwischen Anregung und Antwort von DMPG und Wasser unterhalb der Schmelzumwandlung. Das Verhältnis der Amplituden bleibt etwas über 1, die Phasendifferenzen sind im Rahmen der Messgenauigkeit identisch 0.*



#### 4.4. VISKOELASTISCHE EIGENSCHAFTEN VON DMPG-MEMBRANEN 73

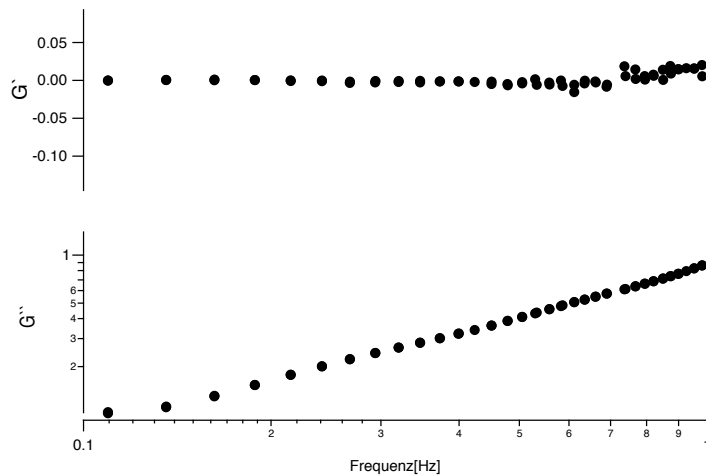


Abbildung 4.34: Der Verlauf des Spannungsanteils in Phase mit der Anregung  $G'$  und der um  $\frac{\pi}{2}$  phasenverschobene Anteil  $G''$  in DMPG bei 20 °C. Unterhalb der Schmelzumwandlung bleibt  $G'$  im Rahmen der Messgenauigkeit konstant 0; die Substanz hat in diesem Bereich keine auflösbaren elastischen Anteile. Der Verlauf von  $G''$  nimmt mit einer konstanten Steigung einen erwarteten Verlauf.  $G'$  ist wegen der kleinen Absolutwerte nahe bei 0 linear dargestellt.

Wasser, d.h. im Verhältnis einen Wert von 1. Die Abweichung ist hier wohl nur eine Messungenauigkeit, der Wert liegt nahe bei 1.

Für Amplitude und Phasenunterschied von Wasser und DMPG in der Umwandlung des Lipides bei 22 °C ergibt sich der in Abbildung 4.35 bzw. 4.36 dargestellte Verlauf. Das Verhältnis der Amplituden nimmt bei niedrigen Frequenzen einen hohen Wert an und fällt dann auf einen konstanten Wert ab. Die Phasenunterschiede schwanken über der Frequenz, sind aber überall deutlich von 0 verschieden (Abb. 4.37).

Aus diesen Daten ausgewertete Spannungsverläufe in Phase und gegen die Phase sind in Abbildung 4.38 dargestellt. Der Verlauf von  $G'$  ist mit dem der Auswertung zu Grunde liegenden Maxwellmodell nur begrenzt verstehbar. Der ansteigende Ast zeigt eine Steigung von  $2,76 \pm 0,10$ . Eine Steigung von 2 wäre zu erwarten. Nach dem Anstieg wird ein Plateau erreicht, wie es theoretisch erwartet wird. Das Minimum bei 0,2 Hz ist im Rahmen des Maxwellmodells nicht verstehbar. Die Kurve sollte einen monotonen Verlauf

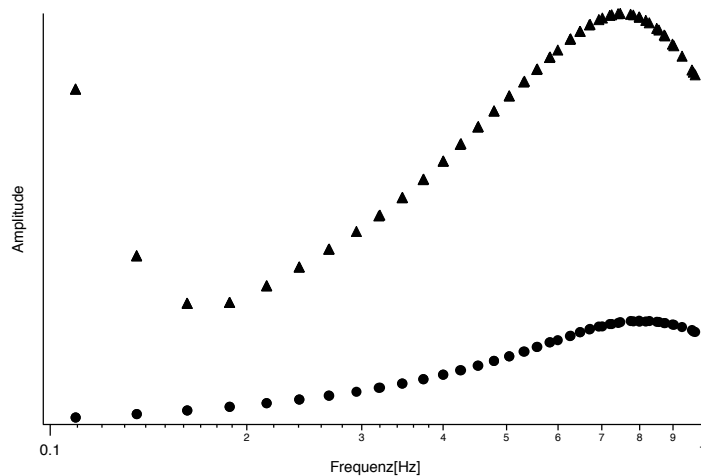


Abbildung 4.35: Amplitudenverlauf von Wasser (runde Symbole) und DMPG (dreieckige Symbole) innerhalb der Umwandlung bei  $22^{\circ}\text{C}$ . Insbesondere bei niedrigen Frequenzen ist ein deutlicher Unterschied zu den Werten unterhalb der Schmelzumwandlung (Abb. 4.31) zu erkennen.

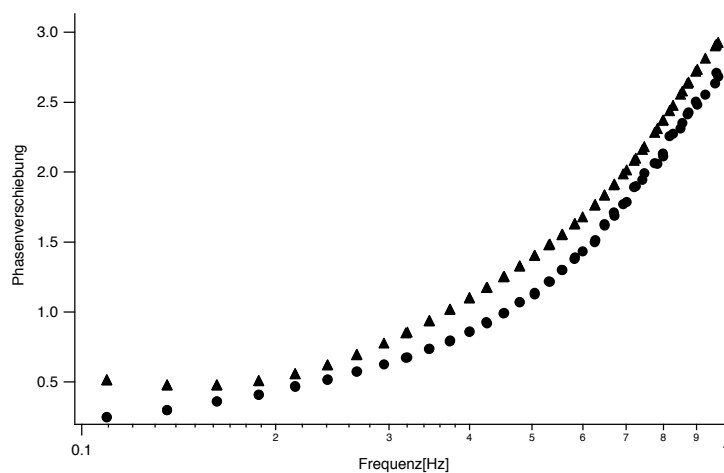


Abbildung 4.36: Phasenverlauf von Wasser (runde Symbole) und DMPG (dreieckige Symbole) bei  $22^{\circ}\text{C}$ . Im Gegensatz zum Verlauf unterhalb der Umwandlung (Abb. 4.32) ist hier eine deutliche Differenz im Phasenunterschied zu erkennen.

#### 4.4. VISKOELASTISCHE EIGENSCHAFTEN VON DMPG-MEMBRANEN 75

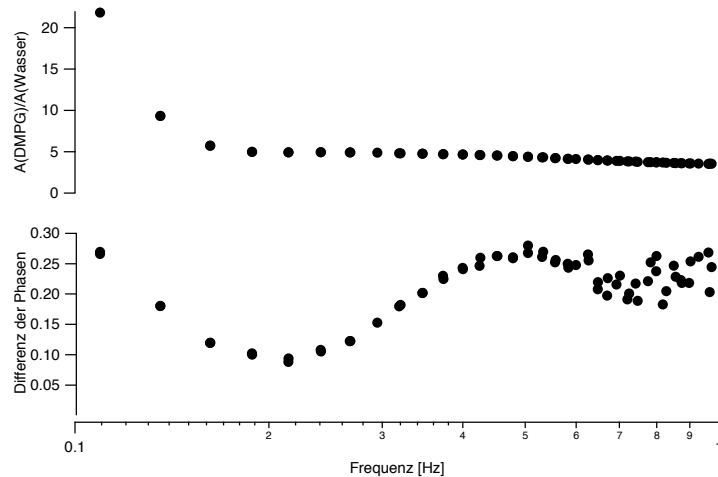


Abbildung 4.37: *Verhältnis der Amplituden und Differenz der Phasen in der Umwandlung bei 22 °C.*

nehmen.  $G''$  ist wesentlich einfacher interpretierbar. Die Steigung des ansteigenden Astes ist mit einem Wert von  $0,93 \pm 0,18$  etwas kleiner als erwartet. Vorstellbar ist, dass die Kurve aus den Anteilen mehrerer zur Resonanz fähigen Federn zusammengesetzt ist. Diese Annahme würde erklären, dass an der Stelle des Plateaus in  $G''$  nicht wie erwartet ein Maximum auftritt, wie in Abbildung 4.29 schematisch angedeutet.

In Abbildung 4.39 ist der Verlauf der Amplitudenverhältnisse und der Phasendifferenzen bei 23 °C in der Umwandlung dargestellt. In Abbildung 4.40 sind die Verläufe von  $G'$  und  $G''$  bei 23 °C aufgetragen.  $G'$  zeigt in dem gemessenen Frequenzbereich von Anfang an ein Plateau. Bei einer Frequenz von ca. 0,6 Hz steigt der Wert mit einer Steigung von  $1,53 \pm 0,11$  weiter an. Der erwartete Wert von 2 wird hier im Gegensatz zu der Messung bei 22 °C unterschritten. Am Verlauf von  $G''$  ist zu erkennen, dass das mechanische Ersatzschaltbild der Substanz auch hier aus dem Zusammenspiel mehrerer Federn gedacht werden muss. An der Stelle, an der  $G'$  ansteigt, ist ein kleiner Knick im Verlauf von  $G''$  zu erkennen. Das sollte dem durch eine nachfolgende Kurve verdeckten Maximum entsprechen. Die Kurve steigt mit einer Steigung von  $0,70 \pm 0,17$  auch hier etwas geringer an, als erwartet werden sollte.

Offensichtlich ist das verwendete Maxwellmodell für die Beschreibung der Phänomene in dieser Substanz nicht ausreichend. Insbesondere bei niedrigen

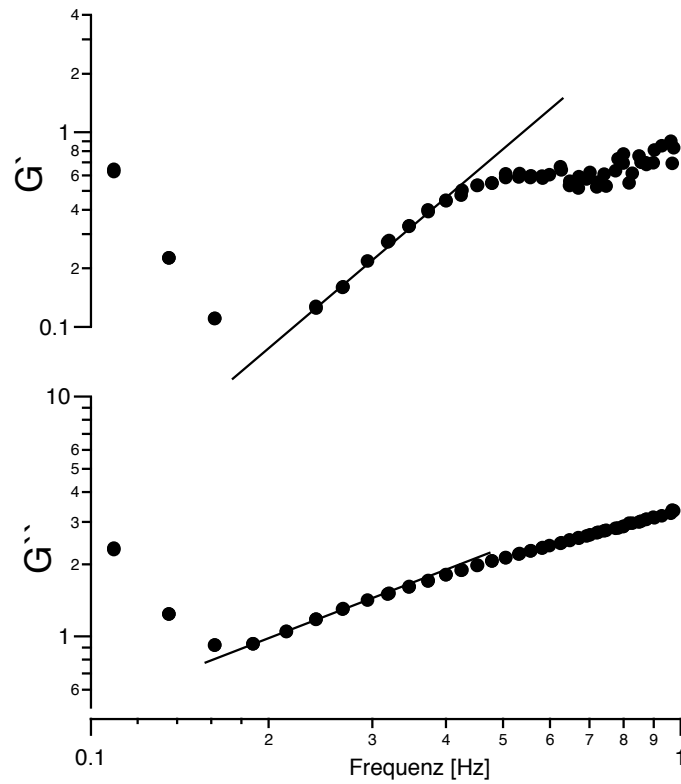


Abbildung 4.38: Der Verlauf von  $G'$  und  $G''$  in DMPG bei 22 °C in der Umwandlung. Der ansteigende Ast in  $G'$  hat eine Steigung von  $2,76 \pm 0,10$ , der ansteigende Ast in  $G''$  hat eine Steigung von  $0,93 \pm 0,18$ .

#### 4.4. VISKOELASTISCHE EIGENSCHAFTEN VON DMPG-MEMBRANEN 77

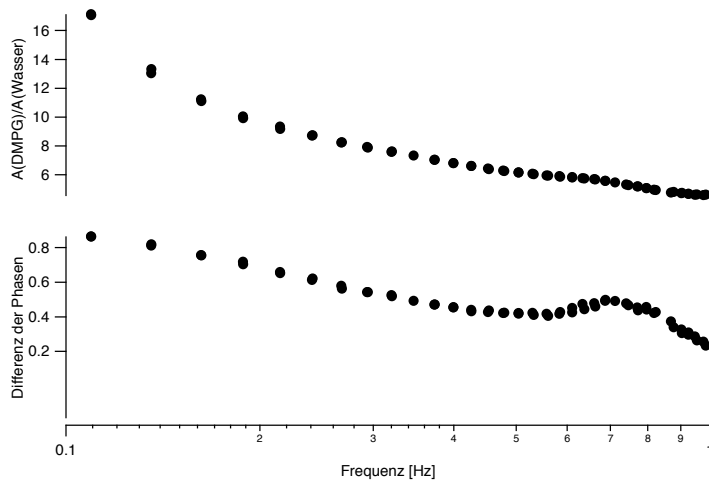


Abbildung 4.39: *Verhältnis der Amplituden und Unterschied in den Phasendifferenzen bei 23 °C in der Umwandlung.*

Frequenzen ist eine Abweichung vom erwarteten Verlauf zu erkennen. Nichtsdestoweniger ist in der Umwandlung des DMPG ein Anteil der Spannung in Phase mit der anregenden Auslenkung zu finden, welcher unterhalb der Schmelzumwandlung nicht auftritt. Insbesondere bei niedrigen Frequenzen ist der Verlauf nicht so, wie er theoretisch erwartet wird. Bei etwas höheren Frequenzen nehmen die Kurven einen erwarteten Verlauf. In jedem Fall aber kann davon ausgegangen werden, dass elastische Anteile in der DMPG-Suspension in der Schmelzumwandlung vorhanden sind und ausserhalb nicht. Dies kann als weiterer Hinweis darauf gewertet werden, dass eine langreichweitige Struktur in der Flüssigkeit vorhanden ist.

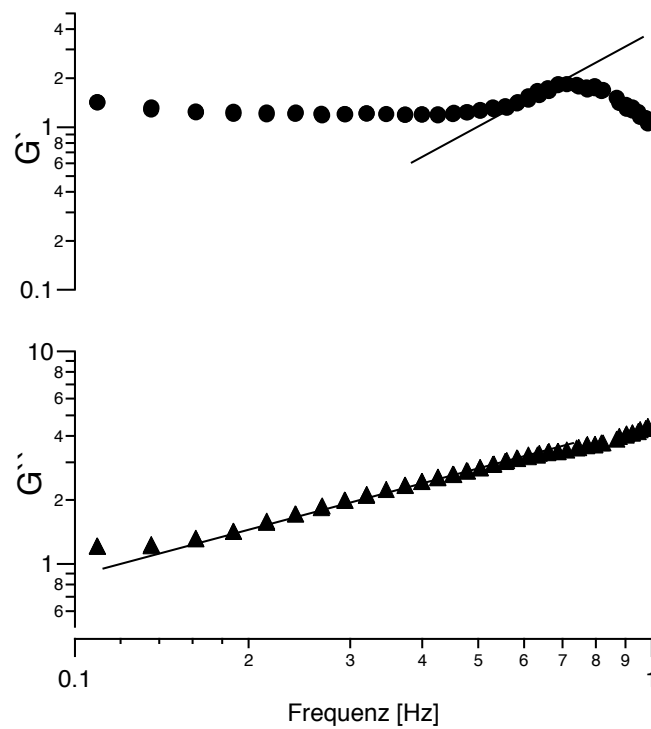


Abbildung 4.40: Verlauf von  $G'$  und  $G''$  über der Frequenz bei 23 °C in der Schmelzumwandlung.

# Kapitel 5

## Diskussion

### 5.1 Relaxationszeiten in Lipidmembranen

In der Vergangenheit wurde auf vielerlei Art und Weise versucht, Relaxationszeiten in das thermodynamische Gleichgewicht in Lipidmembranen zu bestimmen. So von Tsong und Kaneshina 1977 bzw. Holwarth et al. 1984 bzw. 1986 mit Hilfe einer Temperatursprungmethode [38][39][40]; wie in der vorliegenden Arbeit mit einer Drucksprungmethode arbeiteten Gruenewald 1980 und Elamrani und Blume 1983 [41][42]. Biltonen et al. 1991 nutzten ein „Volumenperturbationskalorimeter“ [43].

Allen Messungen gemein war, dass mehrere verschiedene Relaxationszeiten gefunden wurden. So finden Holwarth und Rys [39] mit Hilfe einer laser-gestützten T-Sprungmethode fünf verschiedene Zeitskalen von  $10^{-10}$  s bis 1 s bei DPPC, welches auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Die langsamen Relaxationen im Sekundenbereich werden dabei nicht mit der Relaxation in einzelnen Molekülen identifiziert, sondern mit einem Umordnungsprozess ganzer Domänen von Lipiden [40]. Schnellere Prozesse werden mit Effekten in einzelnen Molekülen erklärt [44]. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werte liegen ausschließlich im Bereich von mehreren Sekunden, was nicht mit der Reaktion einzelner Moleküle verbunden werden kann, sondern mit Relaxationszeiten ganzer Cluster von Lipiden.

Holwarth und Mitarbeiter messen zeitabhängig Lichtstreuung in DPPC-Membranen in der Nähe der Umwandlung [39][40]. Das Ungleichgewicht wird durch einen Temperatursprung mittels eines Lasers in einer kleinen Lipidprobe ( $\approx 150\mu\text{l}$ ) induziert. Gefunden wird eine maximale Relaxationszeit von

ca. 5 ms, die Abweichung vom Basiswert in der Nähe der Umwandlung beginnt bereits 5 K vor dem eigentlichen Schmelzpunkt. Fraglich ist, ob dieser Wert die gleichen Effekte wiedergibt wie in unserem Fall. Die Genauigkeit der Temperaturansteuerung mit der Methode Holzwarth et al. scheint ungenügend. Kanehisa und Tsong finden mit einer ganz ähnlichen Methode Werte von etwas über 30 ms im Bereich der Umwandlung. Gruenewald und auch Blume nutzten wie in dieser Arbeit geschehen die Druckabhängigkeit der Schmelzumwandlung für Relaxationsmessungen [41][42]. Die Detektion erfolgt wie oben mit optischen Methoden über eine Änderung in der Lichtstreuung. Gefunden werden Werte von maximal 3,5 s. Auch hier finden sich die maximalen Zeiten in der Umwandlung. Gruenewald weist darauf hin, dass die Relaxationwerte umso höher sind, je kooperativer die Umwandlung ist. Die Temperatur konnte hier nicht sehr genau ( $\pm 0,1$  K) eingestellt werden. Für die Messung wurde eine durchsichtige Druckzelle (bis 150 bar) benutzt, um optische Veränderungen zu erkennen. Diese ist nur eingeschränkt temperierbar. Zusätzlich konnte der Druck auf nur ca. 10 bar genau bestimmt werden, was im Wärmekapazitätsprofil nach unseren Messungen einer Ungenauigkeit von weiteren ca. 0,25 K entspricht (s. Abschnitt 2.3). Entsprechend breit sind die gemessenen Relaxationsverläufe dieser Untersuchung.

Neuere Daten stammen von Biltonen et al. 1991 [43]. Gemessen wurde mit einem „Volumenperturbationskalorimeter“. Eine mit Wasser gefüllte Zelle wird temperiert und einem oszillierenden Druck ausgesetzt. Das System wird ständig aus dem Gleichgewicht genommen und muss in dieses zurückfinden. Währenddessen wird die Leistung aufgezeichnet, welche benötigt wird, um die Temperatur in der Zelle konstant zu halten. Ist die Wärmeaufnahme bzw. -abgabe im Lipid verzögert, spiegelt sich das in einer verzögerten Antwort auf die Anregung wider. Aus dem entstehenden Phasenunterschied wird die Relaxationszeit bestimmt. Auch in dieser Messung steigt die Relaxationszeit in der Nähe der Umwandlung stark an. Erstmals konnte die Breite der Relaxationskurve entscheidend schmaler bestimmt werden, sie beträgt hier nur noch ca. 0,3 K. Allerdings sind die angegebenen Relaxationszeiten mit maximal 4 s noch immer wesentlich kleiner als in unseren Messungen. Das mag durch den während der Messung variablen Druck zustande kommen. Zwar kann eine Temperatur sehr genau angesteuert und auch gehalten werden, der Ort auf der Umwandlungskurve ist durch die Druckvariation dennoch unscharf bestimmt. Die Amplitude der Druckerregung beträgt in dieser Messung ca. 5 bar. Das entspricht einer Unschärfe in der Temperatur von 0,125 K. Bei einer Breite der Umwandlung von nur ca. 0,2 K ist das ein sehr hoher Wert. Hieraus



ist die maximale Relaxationszeit als ein maximaler Mittelwert „verschmiert“ über die Umwandlung zu verstehen.

Die sehr viel höheren Relaxationszeiten in den vorliegenden Messungen können aus der genaueren Ansteuerung eines Punktes in der Umwandlung verstanden werden ( $\pm 1..2 \text{ mK}$ ). Alle vorhergehenden Messungen konnten entweder die Temperatur nicht stabil halten, und/oder beachteten nicht, dass Unklarheit über den Druck zu Unschärfen in der Temperatur führen.

In dieser Arbeit konnte eine theoretisch vorhergesagte Proportionalität zwischen Wärmekapazität und Relaxationszeit empirisch nachgewiesen werden. Selbst nahe am Wärmekapazitätsmaximum konnten wir im Rahmen der Messgenauigkeit einen einfach-exponentiellen Abfall in der Leistung feststellen. Somit erscheint auch die Annahme gerechtfertigt, eine Wahrscheinlichkeitsverteilung von Zuständen um das Gleichgewicht sei gaussverteilt (Abschnitt 3.4). Ein mathematischer Zusammenhang zwischen Wärmekapazität und Relaxationszeit, wie ihn Gleichung (3.36) darstellt, wurde in der Vergangenheit nicht explizit angegeben, der genaue Zusammenhang war bislang nicht bekannt, so dass für die phänomenologische Größe  $L$ , der Proportionalitätskonstanten zwischen Wärmekapazität und Relaxationszeiten, bisher keine Angaben existieren. Messungen der Relaxationszeit in der Zeitskala des oberen Sekundenbereiches aus der Vergangenheit sind zu ungenau, um sinnvolle Proportionalitätskonstanten bestimmen zu können. Ein erster Durchschnittswert aller Proportionalitätskonstanten führt zu

$$L = 1,843 \cdot 10^{12} (\pm 0,881) \frac{\text{K} \cdot \text{J}^2}{\text{mol}^2 \text{s}}.$$

Einige der Messungen sind allerdings für die Bestimmung dieses Wertes nur bedingt geeignet. So fand die Messung zu Großen Unilamellaren Vesikeln (LUV) der DPPC-Membran an der unteren Auflösungsgrenze des Gerätes statt. Die hieraus berechnete Proportionalitätskonstante weicht vom Durchschnittswert am stärksten ab. Erst im Nachhinein konnte festgestellt werden, dass Wärmekapazitätskurven Multilamellarer Vesikel über der Zeit nicht stabil bleiben, sondern zu tieferen Temperaturen hin verschoben und breiter werden. Da die Wärmekapazitätsprofile extrem schmal sind, bewirkt bereits eine kleine Änderung in der Breite bei der gleichen aufgenommenen Enthalpie eine signifikante Verkleinerung des absoluten Maximums. Erfolgt nun die Messung der Relaxationszeit eine gewisse Zeit versetzt zur Messung der Wärmekapazität, so verfälscht das den Wert einer Proportionalitätskonstante. Für weiterführende Messungen ist es sicherlich sinnvoll, die Substanz nach der Zubereitung einige Tage zu equilibrieren. Ein zweiter Durchschnittswert, bei dessen Berechnung der Wert der Unilamellaren Membran vernachlässigt

wird, liefert dann auch einen verbesserten Durchschnittswert für die Proportionalitätskonstante von  $L=1,420 \cdot 10^{12}(\pm 0,305) \frac{K \cdot J^2}{mol^2 s}$ . Im Rahmen der Messgenauigkeit scheint es gerechtfertigt, für verschiedene Lipidsorten ein universelles  $L$  anzunehmen, da die Abweichungen zwischen den einzelnen Messungen auftreten, nicht zwischen einzelnen Lipidsorten. Mit diesen Werten wird es möglich, allein aus kalorimetrischen Messungen auf kinetische Vorgänge in der Membran Rückschlüsse zu ziehen. Damit scheint auch die in Abschnitt 4.2.1 vorweggenommene Abschätzung zur Relaxationszeit in biologischen Proben gerechtfertigt, sofern die Wärmekapazitätsprofile dieser Proben unter Druck dasselbe Verhalten zeigen wie Modellmembranen, d.h. Druckkurven sind linear auf den druckfreien Fall reskalierbar mit einer Skalierungskonstanten, wie sie aus Modellmembranen bekannt ist. Für das Maximum der Umwandlung des Lungensurfactant konnte ein Wert der Relaxationszeit von  $\tau \approx 100$  ms abgeschätzt werden.

Die Größe von Relaxationszeiten in Membranen beeinflusst sicherlich das mechanische Verhalten von in der Membran eingelagerten Molekülen. So ist beispielsweise bekannt, dass die lichtgetriebene Ionenpumpe Bacteriorhodopsin bestimmte Konformationsänderungen im Millisekundenbereich durchläuft [51]. Ferner spielen sich enzymatische Reaktionen in der Membran häufig ebenfalls in diesem Zeitbereich ab [50]. Sind solche Prozesse mit Volumenänderungen verbunden, kann die Geschwindigkeit dieser Änderung nicht von der umgebenden Membran getrennt gesehen werden. M.-L. Ahrens findet für die  $Na^+ - K^+ - ATPase$ , einem wichtigen Protein welches Ionengradienten über der Membran aufbaut, dass sich deren Aktivität mit der Umwandlung der umgebenden Lipidmembran wesentlich verändert [70][71]. Es erscheint möglich, dass Organismen durch ein aktives Verschieben der Umwandlungstemperatur einen Kontrollmechanismus für Reaktionsgeschwindigkeiten in der Proteinkinematik vorfinden. Im folgenden Abschnitt wird die Schmelzumwandlung des Lungensurfactant diskutiert, welche sehr nahe an der Körpertemperatur liegt, ein weiteres Anzeichen dafür, dass solche Prozesse eine wichtige Rolle in der Biologie spielen könnten.

## 5.2 Kalorimetrie an Lungensurfactant

Kalorimetrie an Lungensurfactant wurde bereits an Surfactant verschiedener Säuger durchgeführt. Die ältesten Messungen gehen auf Teubner et al. 1983 zurück [46][47]. In diesen Arbeiten wurde Lungenfilm von Schaf, Hase und

Ratte untersucht. Es finden sich ganz ähnliche Wärmekapazitätsprofile, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit gemessen wurden, sie enden jedoch bei höheren Temperaturen als in unseren Messungen. So liegt das Ende der Umwandlung bei Schafen bei 34,3 °C, bei Ratten bei 39,3 °C und bei Hasen sogar bei 42,1 °C. Allerdings sind die damals verwendeten Kalorimeter um ein vielfaches weniger empfindlich als die heute gängigen Geräte. Die Messrate ist mit  $10 \frac{K}{min}$  um einen Faktor 60 bis 120 schneller als mit heutigen Geräten möglich. Daraus folgt, dass die Profile von Teubner et al. verglichen mit heutigen weniger scharf ausgeprägt sind. Das Ende einer Umwandlung lässt sich weniger eindeutig bestimmen. Die Profile aus unseren Messungen an Rinderlungsurfactant liegen im Vergleich dazu mit einem Ende der Umwandlung bei 33,44 °C bei tieferen Temperaturen; nicht weit unterhalb der des Schafes, deren Profil den unseren auch am ähnlichsten ist. Während wir bei ca. 58 °C die Denaturierung eines Proteines fanden, konnte diese von Teubner et al. nicht festgestellt werden, da die Messungen bei einer Temperatur von 52 °C beendet wurden, kurz unterhalb der Stelle, an der diese zu erwarten wäre.

Andere Messungen stammen von Mautone et al. 1987 [48], welche nur Lungsurfactant von Hasen untersuchten. Die kalorimetrischen Messungen ergeben ein Ende der Umwandlung bei ca. 38 °C, 4 K weniger als von Teubner angegeben. Die Messungen von Mautone sind trotz jüngeren Datums mit einem wesentlich stärkeren Rauschen behaftet als die von Teubner. Die Form des Profils ist trotz des Rauschens dem unseren ähnlich, eine Proteindenaturierung ist auch hier nicht zu erkennen, da die Messung bei 50 °C endet.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen an Lungsurfactant von Rindern zeigen in der Tendenz die gleichen Resultate wie ältere Messungen an Surfactant anderer Säuger, auch wenn die neueren Messungen mit einem wesentlich empfindlicheren Gerät eine höhere Aussagekraft erhalten. Proteindenaturierungen, wie wir sie sehen konnten, wurden in anderen Messungen nicht gefunden, da diese bei zu tiefen Temperaturen abgebrochen wurden. Zu Wärmekapazitäten von Lungsurfactant unter Druck existierten bislang noch keine Messungen. Erst die Ergebnisse dieser Druckmessungen machten es möglich, der direkten Messung nicht zugängliche Relaxationszeiten in der Umwandlung zu bestimmen.

Im vorangegangenen Abschnitt wurde die Frage aufgeworfen, ob die Geschwindigkeit konformationeller Änderungen in Membranproteinen durch die Lipidumwandlung der umgebenden Membran verändert werden kann. Lungsurfactant als Beispiel für eine biologische Membran scheint diese Idee zu untermauern, liegt die sehr breite Umwandlung doch genau unterhalb der

Körpertemperatur von Säugern. Ebenso ist es denkbar, dass ein Organismus durch das gezielte Verschieben einer Umwandlung neben der Relaxationszeit Größen wie Kompressibilität und Biegeelastizität „einzustellen“ vermag.

### 5.3 Netzwerke in Lipidmembranen

Ein Modell von Schneider und Heimburg erklärt das Auftreten einer Aufspaltung in drei Maxima im Wärmekapazitätsprofil von Lipidmembranen mit einem energetisch begünstigten Übergang von einer planaren zu einer gekrümmten Membran und zurück zu einer planaren. Die Schmelzumwandlung des Phospholipides DMPG, welche in drei Maxima aufgespalten ist, wird mit Hilfe dieses Modells erklärt (Ausführlich dazu Abschnitt 3.3). Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen unterhalb, oberhalb und in der Umwandlung konnte gezeigt werden, dass vesikuläre Strukturen bei niedrigen und bei hohen Temperaturen stark unterschiedliche Durchmesser aufweisen. Es konnte desweiteren nachgewiesen werden, dass direkt in der Umwandlung keine vesikulären Strukturen zu erkennen sind. Zusätzlich zeigte die Substanz zwischen erstem und drittem Maximum der Umwandlung eine stark erhöhte Viskosität. Schneider und Heimburg folgern daraus, dass die vesikuläre Struktur des geladenen Lipides DMPG im Bereich der Umwandlung in eine netzwerkartige übergeht [29]. Insbesondere die Tatsache, dass Vesikel unterhalb und oberhalb erhebliche Unterschiede in der Grösse aufweisen, wird als Hinweis darauf gewertet, dass in der Umwandlung irgend eine Art von Verschmelzung der einzelnen Vesikel stattfinden muss. Unterstützt wird diese Annahme durch Lichtstreuexperimente, welche ebenfalls einen signifikanten Größenunterschied der DMPG-Vesikel unter- und oberhalb der Umwandlung feststellen (s. Abschnitt 4.3.2).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen steht ein von Riske et al. durchgeführtes Experiment [65][66]. In diesen Untersuchungen werden 10 % der DMPG-Vesikel in der Probe mit Lipiden versetzt, welche fluoreszenzmarkiert sind. Die fluoreszenzmarkierten Lipide werden in einer solch hohen Konzentration zugegeben, dass sie „quenchen“ und somit kein Fluoreszenzlicht mehr nach aussen dringen lassen. Die gesamte Lipidsuspension wird auf eine Temperatur im Bereich der Schmelzumwandlung gebracht. Fusionieren die Vesikel zu einem Netzwerk, so sollten sich die fluoreszenzmarkierten Lipide gleichmäßig über die gesamte Lipidprobe verteilen. Die Konzentration der fluoreszierenden Lipide ist so gewählt, dass sie bei einer gleichmässigen Verteilung nicht

mehr quenchen, sondern normal fluoreszieren sollten. Eine Fluoreszenz konnte von Riskenach Durchgang durch die Schmelzumwandlung von Riske nicht festgestellt werden. Nicht gewährleistet ist allerdings, dass die fluoreszenzmarkierten Lipide Ort und Form der Schmelzumwandlung unverändert lassen. Um dies nachprüfen zu können, bedürfte es einer kalorimetrischen Analyse, welche hier nicht durchgeführt wurde, da zu wenig der fluoreszenzmarkierten Substanz zur Verfügung stand. Denkbar ist, dass die markierten Vesikel gar keine Aufspaltung des Umwandlungsprofils mehr zeigen; oder dass die Umwandlung bei einer anderen Temperatur stattfindet. Ein weiterer Versuch, bei dem Vesikel mit einem quenchenden Farbstoff gefüllt werden zeigte, dass in der Umwandlung sämtlicher Farbstoff ausgeschüttet wird. Das Kontroll-experiment mit DMPC-Vesikeln, welche im Profil keine Aufspaltung zeigen, zeigt allerdings das gleiche Verhalten. In der Umwandlung ist die Membran sehr viel permeabler als ausserhalb. Die Farbstoffmoleküle können hier entweichen. Bisher ist es nicht möglich, das Ergebniss von Riske abschliessend zu beurteilen. Nichts desto weniger deuten die anderen vorgestellten Ergebnisse auf die Existenz einer langreichweitigen Struktur hin. Insbesondere die Messung eines elastischen Anteiles der Viskosität in der Schmelzumwandlung unterstützt zusätzlich diese These. Es erscheint nicht vorstellbar, dass in einer Flüssigkeit elastische Anteile auftreten, in der nicht Wechselwirkungen über längere Distanzen existieren. Üblicherweise werden elastische Anteile in Flüssigkeiten mit der Polymerisation von Molekülen zu langreichweitigen Strukturen in der Flüssigkeit identifiziert [36].

Druck beeinflusst die Umwandlung von DMPG in gänzlich anderem Masse als die Umwandlung von anderen Lipidsystemen. Zahlreiche Autoren bestätigen eine lineare Reskalierbarkeit der Schmelzumwandlung unter Druck auf den druckfreien Fall in Lipisystemen, bei welchen die Umwandlung in einem Schritt erfolgt <sup>1</sup>. Festgestellt wird, dass die Reskalierungskonstante  $\gamma$  nach einer Gleichung  $T^* = T(1 + \gamma\Delta p)^{-1}$  im Rahmen eines gewissen Fehlers universell für verschiedene Lipidsysteme ist. Die Vorumwandlung verschiebt sich nach dem gleichen Gesetz, allerdings mit einer anderen Konstanten  $\gamma$  [26][57][63][62]. Die Verschiebung der Umwandlung des DMPG scheint auf ein anderes, komplizierteres Konzept zurückzugehen. Mit Hilfe des von Heimburg und Schneider [29] vorgeschlagenen Modells zum Verständnis der Dreipeakaufspaltung der DMPG-Umwandlung kann auch dieses Phänomen verstanden werden. Wesentlich in diesem Modell ist die Freie Enthalpie der Wech-

---

<sup>1</sup>siehe z.B.: [26][27][52][53][54][55][56][57][58][59][60][61][62][63]

selwirkung der Lipiddoppelschicht mit dem Lösungsmittel. Ist diese Freie Wechselwirkungsenthalpie abhängig vom Umgebungsdruck, so sollte sich das Profil anders als üblicherweise verschieben, beziehungsweise zusätzlich seine Form ändern (s. Abbildung 4.19).

Gesteuert werden kann die Ausbildung eines Membrannetzwerkes auf vielerlei Weise. Thermodynamische Parameter wie Temperatur, Druck und  $\text{Na}^+$ -Konzentration vermögen die Aufspaltung in drei Maxima in der Umwandlung von DMPG-Membranen zu induzieren; in Membranen, welche diese Art der Umwandlung nicht zeigen, ist es möglich, ein Netzwerk durch die Zugabe eines negativ geladenen Stoffes, welcher sich in der Membran löst, zu induzieren. Es erscheint denkbar, dass in der Biologie ähnliche Prozesse, z.B. bei der Fusion von Vesikeln an der präsynaptischen Membran eine Rolle spielen. Der Ablauf der Fusion synaptischer Vesikel wird momentan intensiv untersucht (s.z.B.[73]). Allerdings wird praktisch nur auf die Rolle von Proteinen in ihrer Funktion als „Nanomaschinen“, welche den ganzen Prozess steuern, eingegangen. Vielleicht kann das vorgestellte einfache physikalische Prinzip der Vesikelfusion einen Beitrag zum Verständniss dieses komplexen Vorganges leisten.

# Literaturverzeichnis

- [1] Laffan, J. und Firshein, W., (1987). DNA Replication by a DNA-Membrane Complex Extracted from *Bacillus subtilis*: Site of Initiation In Vitro and Initiation Potential of Subcomplexes. *Journal of Bacteriology*, **169** 2819-2827
- [2] Kornacki, J. und Firshein, W., (1986). Replication of Plasmid RK2 In Vitro by a DNA-Membrane Complex: Evidence for Initiation of Replication and its Coupling to Transcription and Translation. *Journal of Bacteriology*, **167** 319-326
- [3] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J., (1994). In *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing, 3. Auflage.
- [4] Bangham, A., (1986). Breathing made easy. *New Scientist*, **85** 408-410
- [5] Jacobson, K., Sheets, E. und Simson, R. (1995). Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science*, **268** 1441-1442
- [6] Robertson, J.(1959). The Ultrastructure of Cell Membranes and Their Derivatives. *Biochemical Society Symposium*, **16** 3-43
- [7] Blume, A. (1983). Apparent Molar Heat Capacities of Phospholipids in Aqueous Dispersions. *Biochemistry*, **22** 5437-5438
- [8] 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
- [9] Hianik, T., Passechnik, V. (1995). Bilayer Lipid Membranes: Structure and Mechanical Properties. *Dordrecht: Kluwer Academic*.

- [10] Marsh, D. (1990). Handbook of Lipid Bilayers. *CRC Press, Boca Raton, FL.*
- [11] Käs, J., Sackmann, E. (1991). Shape transition and shape stability of giant phospholipid vesicles in pure water induced by area-to-volume changes. *Biophysical Journal*, **60** 825-844
- [12] Kinnunen, J. (1991). On the principles of functional ordering in biological membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, **57** 375-399
- [13] Hartung, Helfrich, Kloege (1994). Transformation of phosphatidylcholine multilayer systems in a large excess of water. *Biophysical Chemistry*, **49** 77-81 49 (1994)77-81
- [14] Heimburg, T. (2000). A model for the lipid pretransition: Coupling of ripple formation with the chain-melting transition. *Biophysical Journal*, **78-3** 1154-1165
- [15] Goerke, J. (1998). Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1409** 79-89
- [16] Robertson, B., Halliday, H. (1998). Principles of surfactant replacement. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1408** 346-361
- [17] Veldhuizen, R., Nag, K., Orgeig, S., Possmayer, F. (1998). The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1408** 90-108
- [18] Philippoff, W. (1942). Viskosität der Kolloide: Handbuch der Kolloidwissenschaften in Einzeldarstellungen, Bd.IX, S.407 *Dresden: Verlag von Theodor Steinkopff.*
- [19] Søren Hvidt (1998). An Introduction to Rheology. 2. Auflage. Im Eigenverlag. Department of Chemistry, Roskilde University.
- [20] Umstätter, H. (Hrsg. )(1952). Einführung in die Viskosimetrie und Rheometrie, *Heidelberg: Springer.*
- [21] Ohne Autorenangabe (s.a.). Messung rheologischer Eigenschaften, *Zürich: Contraves.*



- [22] Freire, E., Biltonen, R. (1978). Statistical Mechanical Deconvolution of Thermal Transitions in Macromolecules. I. Theory and Application to homogenous Systems *Biopolymers*, **17** 463-479
- [23] Mabrey, S., Sturtevant, J., (1978). High-Sensitive Differential Scanning Calorimetry in the Study of Biomembranes and Related Model Systems. *Kapitel 3 aus: Korn, E., (Hrsg.), Methods in Membrane Biology, New York: Plenum Press*, **9** 237-274
- [24] MacDonald, R.C. et al., (1991). Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1061** 297-303
- [25] Singer, S.J. und Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175** 720-731
- [26] Ebel, H. (1999). Kalorische und strukturelle Umwandlungen von Lipid-Membranen: Kopplung von Wärmekapazität und Volumenexpansionskoeffizienten. Diplomarbeit, Georg-August-Universität Göttingen.
- [27] Ebel, H., Grabitz, P., Heimburg, T. (2001). Enthalpy and volume changes in lipid membranes. *Zur Veröffentlichung eingereicht*.
- [28] Seifert, U und Lipowsky, R. (1995). Morphology of Vesicles. *Handbook of Biological Physics* , **Volume 1** 403-463
- [29] Schneider, M. et al. (1999). Network formation of lipid membranes: Triggering structural transitions by chain melting. *PNAS*, **96** 14312-14317
- [30] Schneider, M. (1999). Reversible Ausbildung eines Membrannetzwerks im Schmelzregime von Phospholipiden. Diplomarbeit, Georg-August-Universität Göttingen
- [31] Ivanova, V. (2000). Theoretical and experimental study of protein-lipid interactions. Dissertationsschrift, Georg-August-Universität Göttingen
- [32] Ivanova, V., Heimburg, T., (2001). A histogram method to obtain heat capacities in lipid monolayers, curved bilayers and membranes containing peptides. *Zur Veröffentlichung eingereicht*.
- [33] Landau, L. und Lifschitz, E., (1978). Lehrbuch der Theoretischen Physik Bd.V Statistische Physik *Berlin: Akademie-Verlag*, 3. Ausgabe

- [34] Bronstein, I. (1995). Taschenbuch der Mathematik. *Verlag Harry Deutsch* 2. deutsche Auflage S.633
- [35] Schneggenburger, R., Neher, E. (2000). Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature*, **406** 889-893
- [36] Aklonis, J., MacKnight, W. Und Shen, M. (1972). Introduction to polymer viscoelasticity. *Wiley-Interscience* New York
- [37] Theodoropoulou, E. und Marsh, D. (1999). Interactions of angiotensin II non-peptide  $AT_I$  antagonist Losartan with phospholipid membranes studied by combined use of differential scanning calorimetry and electron spin resonance spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1461** 135-146
- [38] Kanehisa, M.I. und Tsong, T.Y. (1977). Relaxation Phenomena in Aqueous Dispersions of Synthetic Lecithins. *Biochemistry*, **16** 2674-2680
- [39] Holzwarth, J. und Rys, F. (1984). Beobachtung einer kritischen Trübung und Verlangsamung am Hauptphasenübergang von Phospholipid-Membranen, bestimmt mit der Laser-Temperatursprungmethode. *Progress in Colloid and Polymer Science*, **69** 109-112
- [40] Genz, A. und Holzwarth, J.F. (1986). Dynamic fluorescence measurements on the main phase transition of dipalmythoylphosphatidylcholine vesicles. *European Biophysics Journal*, **13** 323-330
- [41] Gruenewald, B., Blume, A. und Watanabe, F. (1980). Kinetic investigations on the phase transition of phospholipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, **597** 41-52
- [42] Elamrani, E. und Blume, A. (1983). Phase transition kinetics of phosphatidic acid bilayers. A pressure-jump relaxation study. *Biochemistry*, **22** 3305-3311
- [43] Osdol, W., Johnson, M., Qiang, Y. und Biltonen, L. (1991). Relaxation dynamics of the gel- to liquid-crystalline transition of phosphatidylcholine bilayers. *Biophysical Journal*, **59** 775-785

- [44] Osdol, W., Biltonen, R., Johnson, M. (1989). Measuring the kinetics of membrane phase transitions. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **20** 1-46
- [45] Gennis, R. (1989). Biomembranes Molecular Structure and Function. *Springer-Verlag Heidelberg*, S.68
- [46] Teubner, J., Gibson, R., McMurchie, E. (1983). The influence of water on the phase transition of sheep lung surfactant: a possible mechanism for surfactant phase transition in vivo. *Biochimica and Biophysica acta*, **750** 521-525
- [47] McMurchie, E., Teubner, J., Gibson, R. (1983). Thermal Phase Transition in Sheep, Rat and Rabbit Surfactant Lipids Detected by Differential Scanning Calorimetry. *Computational Biochemical Physiology*, **74A** 295-299
- [48] Mautone, A., Reilly, K., Mendelsohn, R. (1987). Fourier transform infrared and differential scanning calorimetric studies of a surface-active material from rabbit lung. *Biochimica and Biophysica acta*, **896** 1-10
- [49] Shiffer, K., Hawgood, S., Haagsman, H., Benson, B., Clements, J., Goerke, J. (1993). Lung surfactant Proteins, SP-B and SP-C, Alter the Thermodynamic Properties of Phospholipid Membranes: A Differential Calorimetry Study. *Biochemistry*, **32** 590-597
- [50] Jungermann, H., Möhler, H. (Hrsg.) (1980). Biochemie *Springer-Verlag Berlin* erste Auflage
- [51] Stryer, L. (1995). Biochemstry *W.H. Freeman and Company* vierte Auflage
- [52] Bernsdorff, C., Wolf, A., 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
- [53] Böttner, M., Ceh, D., Jacobbs, U. und Winter, R. (1994). High pressure volumetric measurements on phospholipid bilayers. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, **184** 205-218

- [54] 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
- [55] Landwehr, A., Winter, R. (1994). The T, p, x-phase diagram of biary phospholipid mixtures. *Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie*, **98(12)** 1585-1589
- [56] Liu, N., Kay, R. (1977). Redetermination of the pressure dependence of the lipid bilayer phase transition. *Biochemistry*, **16(15)** 3484-3486
- [57] 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
- [58] Mountcastle, D., Biltonen, R. und Halsey, M., (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
- [59] Utoh, S. und Takemura, T., (1985). Phase transition of lipid multilamellar aqueous suspensions under high pressure. I. Investigation of phase diagram of dipalmitoyl phosphatidylcholin bimembrane by high-pressure-DTA and -dilatometry. *Japanese Journal of Applied Physics*, **24(3)** 356-360
- [60] Winter, R. und Pilgrim, W.-C. (1989). A SANS study of high pressure phase transitions and phase equilibria in model membranes. *Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie*, **93** 708-717
- [61] Wong, P., Simitovitch, D., und Mantsch, H. (1988). Structure and properties of model membranes: new knowledge from high pressure vibrational spectroscopy. *Biochimica and Biophysica Acta*, **947** 139-171
- [62] Ichimori, H., Hata, T., Matsuki, H., und Kaneshina, S. (1998). Barotropic phase transitions and pressure-induced interdigitation on bilayer membranes of phospholipids with varying acyl chain lengths. *Biochimica and Biophysica Acta*, **1414** 165-174

- [63] Maruyama, S., Hata, T., Matsuki, H. und Kaneshina, S. (1997). Effects of pressure and local anesthetic tetracaine on dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. *Biochimica and Biochimica Acta*, **1325** 272-280
- [64] Czeslik, C., Winter, R., Rapp, G., Bartels, K. (1995). Temperature- and Pressure- Dependent Phase Behavior of Monoacylglycerides Monoolein and Monoelaidin. *Biophysical Journal*, **68** 1423-1429
- [65] Riske, K., Politi, M., Reed, W. und Lamy-Freund, T. (1997). Temperature and ionic strength dependent light scattering of DMPG-dispersions. *Chemistry and Physics of Lipids*, **89** 31-44
- [66] Goldman, C., Riske, K. und Lamy-Freund, T. (1999). Role of soft and hard aggregates of lipid dispersions. *Physical Review E*, **60(6)** 7349-7353
- [67] Riske, K., Nascimento, O., Peric, M., Bales, B. und Lamy-Freund, T. (1999). Probing DMPG vesicles surface with a cationic soluble spin label. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1418** 133-146
- [68] Kodama, M., Aoki, H. und Miyata, T. (1999). Effect of  $\text{Na}^+$  concentration on the subgel phases of negatively charged phosphatidylglycerol. *Biophysical Chemistry*, **79** 205-217
- [69] Hauser, H. (1991). Effect of inorganic cations on phase transitions. *Chemistry and Physics of Lipids*, **57** 309-325
- [70] Ahrens, M. (1981). Electrostatic control by lipids upon the membrane-bound ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ )-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **642** 252-266
- [71] Ahrens, M. (1983). Electrostatic control by lipids upon the membrane-bound ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ )-ATPase. II. The influence of surface potential upon the activating ion equilibria. *Biochimica et Biophysica Acta*, **732** 1-10
- [72] Träuble, H., Teubner, M., Wooley, P. und Eibl, H. (1976). Electrostatic interactions at charged lipid membranes. I. Effect of pH and univalent cations on membrane structure. *Biophysical Chemistry*, **4** 319-342
- [73] Jahn, R. und Südhof, T. (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, **68** 863-911