

**Theoretische und experimentelle
Beschreibung von Diffusionsprozessen
in einem zweikomponentigen
Lipidsystem**

Diplomarbeit

vorgelegt von
Heiko Seeger
aus Eschwege

angefertigt an der
Fakultät für Physik
der
Georg-August Universität zu Göttingen
2002

DANKSAGUNG

Diese Arbeit entstand in den Jahren 2001 und 2002 am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen in der Arbeitsgruppe „Biophysik und Thermodynamik von Membranen“. Besonderem Dank bin ich Prof. Dr. Thomas Heimburg verpflichtet, da er mir die Arbeit an diesem interessanten Thema ermöglichte und mir durch fruchtbare Diskussionen und Ratschläge die Ausführung erleichterte. Weiterhin bin ich Prof. Dr. Manfred Radmacher für die Betreuung von Seiten der Universität dankbar. Den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe bin ich ebenfalls für die angenehme Atmosphäre und die Durchführung einiger experimenteller Teile dieser Arbeit zu Dank verpflichtet. Da wären Thomas Schlötzer, der die zu meinen Computersimulationen äußerst wichtigen experimentellen Wärmekapazitätsprofile bestimmte, mir einige seiner Vesikelbilder zur Verfügung stellte und mit dem ich ebenfalls über verschiedene Probleme reden und diskutieren konnte. Im Weiteren ist Agnieszka Haç zu erwähnen, die dafür verantwortlich war, den experimentellen FCS-Aufbau zu gewährleisten, ohne den die experimentellen FCS-Daten nicht zu erhalten gewesen wären. Ebenfalls möchte ich ihr für die zur Verfügungstellung von erst kürzlich gewonnenen FCS-Daten danken. Ebenfalls möchte ich Denis Pollakowski für seine gutmütige und geduldige Art danken, mit mir in einem Zimmer auszukommen. Peter Grabitz, der bereits im Mai 2001 unsere Arbeitsgruppe verließ, der aber am Anfang meiner Arbeit einige wichtige und hilfreiche Tipps gab, möchte ich ebenfalls danken. Unserem technischen Mitarbeiter Jan Plotzki muss ein dickes Lob ausgesprochen werden, da er mir jederzeit die Dinge besorgt hatte, die ich zum Voranbringen meiner Arbeit benötigte. Weiterhin soll Martin Fechner nicht vergessen werden, der bei nicht lösbar erscheinenden Computerproblemen hilfreich zur Seite stand. Carl Sandhagen aus der Gruppe von Prof. Dr. Claus Seidel ist für seine Unterstützung bei technischen Dingen zu danken. Ebenfalls möchte ich all denen danken, die mir bei der Endredaktion dieser Arbeit geholfen haben: Bastian, Björn, Denis, Ellen, Jens, Mario, Martin, Michael, Niklas und Stephanie.

Zum Schluss möchte ich noch all denen danken, die mich von privater Seite aus über mein gesamtes Studium unterstützt haben. Dies sind unter anderem mein Mitbewohner Mario, mein Bruder Jens, meine Freunde, aber auch vor allem meine Eltern, denen ich von ganzem Herzen für ihre tolle Unterstützung dankbar bin. Meiner Mutter, die leider das Ende meines Studiums nicht mehr erleben durfte, möchte ich diese Arbeit widmen.

Heiko Seeger
Göttingen im Mai 2002

In Gedenken an meine Mutter !!

Zusammenfassung

Diffusion in biologischen Membranen ist bis heute kaum verstanden. So haben Diffusionsstudien an einfachen Lipidmembranen und an komplexeren Modellsystemen, in die Fremdmoleküle wie z.B. Proteine und Cholesterin in die Lipidmembran eingebracht werden, mehrere unterschiedliche Diffusionsprozesse erkennen lassen. Diese sind ebenfalls in biologischen Membranen beobachtbar. Dabei spielen Effekte wie die Bindung mobiler Moleküle an immobile Bindestellen oder das Auftreten von Hindernissen eine Rolle. Proteine können Diffusionshindernisse bilden, aber schon in einfachen zweikomponentigen Lipidsystemen treten Heterogenitäten auf, die einen Einfluss auf die Diffusion haben können. Diese Heterogenitäten kommen durch Ausbildung von Domänen gelförmiger und fluider Lipide zustande.

In dieser Arbeit wurde ein von Sugár et al. ausgearbeitetes numerisches Isingmodell zur Beschreibung des Phasenverhaltens eines DMPC:DSPC Lipidsystems vorgestellt [79, 80]. Eine Weiterentwicklung dieses Modells wurde zum Studium der in diesem Modellsystem beobachtbaren temperaturabhängigen Diffusionsprozesse genutzt. Als Methoden zur Untersuchung der Diffusionsprozesse wurden die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) und das „Single-Particle Tracking“ (SPT) gewählt.

In der FCS wird aus der Autokorrelation von Fluoreszenzrauschen der Diffusionskoeffizient bestimmt. Die FCS-Simulationen zeigen qualitativ ein ähnliches Verhalten wie es von Korlach et al. [39] durch Experimente an „Giant Unilamellar Vesicles“ beobachtet wurde. Korlach et al. untersuchten Vesikel unterschiedlicher Phasenzusammensetzung. In einem rein fluiden Vesikel lässt sich schnelle Diffusion erkennen. Vesikel mit vorwiegend gelförmigen Lipiden zeigt langsame Diffusion. Koexistieren fluide und gelförmige Phasen, so lassen sich sowohl langsame als auch schnelle Diffusion beobachten. FCS-Messungen an planaren Modellsystemen wurden ebenfalls erfolgreich durchgeführt und zeigen Autokorrelationskurven wie sie von Korlach publiziert wurden. Die ermittelten Diffusionskoeffizienten liegen in Größenordnungen wie die von Korlach angegebenen Werte.

Die SPT-Simulationen bei denen die Position eines Teilchens über die Zeit verfolgt wird, zeigen für verschiedene Bereiche des Phasendiagramms auf kurzen Zeitskalen ein Diffusionsverhalten, bei dem die „Mittlere Quadratische Abweichung“ nicht linear mit der Zeit anwächst. Das Diffusionsverhalten geht zu langen Zeiten in ein normales Diffusionsverhalten über. Je nach Temperatur ändert sich die Zeit des Übergangs von anomaler zu normaler Diffusion.

Diese Arbeit stellt einen wichtigen Schritt zum besseren Verständnis von Diffusionsprozessen in Lipidmembranen dar, die nach aktuellem Diskussionstand eine wichtige Rolle bei der Regelung biochemischer Reaktionskaskaden durch physikalische Prozesse spielen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Membranen in der Biologie	1
1.2	Membranen und Lipide	2
1.3	Das „fluid-mosaic“ Modell und seine Weiterentwicklung	4
1.4	Diffusion in biologischen Systemen I	6
2	Theorie	8
2.1	Diffusion in biologischen Systemen II	8
2.1.1	Normale und anomale Diffusion	8
2.1.2	Hydrodynamische und „Freies Volumen“ Theorien	10
2.1.3	Monte Carlo Studien zur Beschreibung von Diffusions- prozessen	14
2.1.4	Ergänzungen	16
2.2	Theorie der Phasendiagramme	16
2.2.1	Die Gibbssche Phasenregel	17
2.2.2	Ideale und reguläre Lösungen	18
2.2.3	Phasendiagramme von Lipidsystemen	22
2.3	Isingmodell eines zweikomponentigen Lipidsystems	23
2.3.1	Einführung	23
2.3.2	Modellierung des DMPC:DSPC Modellsystems	24
2.3.3	Bestimmung der Modellparameter	27
2.3.4	Die Elementarschritte: Zustandsänderungen und Dif- fusion	29
2.3.5	Die Monte Carlo Simulation	30
2.3.6	Theoretische Bestimmung von Wärmekapazitäten	31
3	Materialien und Methoden	32
3.1	Differentialkalorimetrie	32
3.1.1	Einführung in die Differentialkalorimetrie	32
3.1.2	Probenpräparation und Durchführung	33

3.1.3	Monte Carlo Rechnungen zur Ermittlung der Wärmekapazitätskurven	34
3.2	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	36
3.2.1	Einführung in die FCS	37
3.2.2	Experimenteller Aufbau für die FCS	40
3.2.3	Probenpräparation für die FCS-Messungen	41
3.2.4	Simulation der FCS Experimente	43
3.3	Single-Particle Tracking	44
4	Wärmekapazitäten und Domänenbildung	47
4.1	Wärmekapazitäten und Fluktuationen	47
4.2	Vergleich von theoretischen und experimentellen Wärmekapazitätsprofilen	52
4.3	Domänenbildung in Experiment und Modell	55
4.4	Phasenseparation	58
4.5	Diskussion: Modell, Phasendiagramm und Domänenbildung . .	62
4.5.1	Rechtfertigung des Modells	62
4.5.2	Phasendiagramm und Phasenseparation	62
4.5.3	Vor- und Nachteile des Modells	64
5	Diffusion: Resultate und Diskussion	66
5.1	FCS: Ensemble und Einzelmolekülsimulationen	66
5.1.1	Ensemblestudien	67
5.1.2	FCS-Simulationen von Einzelmolekülen	71
5.2	FCS-Messungen an planaren Membranen	73
5.3	Vergleich theoretischer und experimenteller Korrelationskurven	77
5.4	Theoretische Ergebnisse der Single-Particle Tracking Simula- tionen	78
5.5	Diskussion: Theorie und Experimente	87
5.5.1	Diffusion und Heterogenitäten	87
5.5.2	Diskussion des Diffusionsmodells	90
5.5.3	Die experimentellen Resultate	92
5.5.4	Diskussion verschiedener Diffusionsmodelle	93
6	Diskussion	95
6.1	Vom Modellsystem zur biologischen Membran	95
6.2	Ausblick	97
A	Wärmepazitätskurven	I
B	Abkürzungen	XI

INHALTSVERZEICHNIS

C

Literaturverzeichnis

XIX

Kapitel 1

Einführung

1.1 Membranen in der Biologie

In der belebten Natur sind überall biologische Membranen zu finden. Sie befähigten die Natur zur Entwicklung komplexen Lebens, da erst biologische Membranen die Ausbildung eines Innen und Außen ermöglichten, um Leben von einer teilweise feindlichen Umgebung zu schützen. Biologische Membranen umgeben Zellen, in denen wiederum verschiedene Organellen, wie Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum oder der Golgi-Apparat durch biologische Membranen abgegrenzt werden. Diese besitzen differenzierte Aufgaben wie die Energieproduktion, die Synthese von Proteinen¹ oder das Aufbereiten von Proteinen für Spezialaufgaben.

Biologische Membranen besitzen aber nicht nur strukturelle, sondern auch funktionale Bedeutung. So ermöglichen sie die Kommunikation zwischen dem Innen und Außen. Dies kann durch das Passieren von Ionen oder Molekülen geschehen, aber auch durch Konformationsänderungen von Membrankomponenten. Weiterhin sind Enzyme² an die Membran gebunden, die Reaktionen von Reaktanten, die ebenfalls an der Membran gebunden sind, katalysieren. Das Konzept der Membran hat die Natur auch dazu befähigt, Diffusion von drei auf zwei Dimensionen zu reduzieren, was von Adam und Delbrück als ein Vorteil für biologische Systeme angesehen wird [1]. Nach Adam und Delbrück erhöht diese Dimensionsreduzierung die Wahrscheinlichkeit des Zustandekommens einer Reaktion zweier oder mehrerer Reaktanten.

Biologische Membranen erfüllen somit innerhalb der Biologie vielfältige Aufgaben. Um deren Bedeutung zu verstehen, sind sowohl physiologische als auch strukturelle Untersuchungen notwendig. Die wichtigsten Bestandteile

¹ Proteine sind Makromoleküle, die sich aus verschiedenen Aminosäuren zusammensetzen.

² Enzyme sind Proteine mit katalytischen Eigenschaften.

biologischer Membranen sind Proteine und kleine aus einem hydrophilen und hydrophoben Teil bestehende Moleküle, die Lipide.

1.2 Membranen und Lipide

Lipide, die die grundlegenden Bausteine biologischer Membranen sind, bilden in Wasser spontan Aggregate aus. Dies ist durch die Struktur der Lipide mit einem polaren und einem unpolaren Teil bedingt. Der polare Teil ist dem Wasser zugewandt (hydrophil) und der unpolare Teil versucht Kontakt mit Wasser zu vermeiden (hydrophob). Es können sich beispielsweise Mizellen, invers hexagonale Phasen oder Lipiddoppelschichten (Abb. 1.1) ausbilden. Letztere besitzen die größte Bedeutung innerhalb der Biologie.

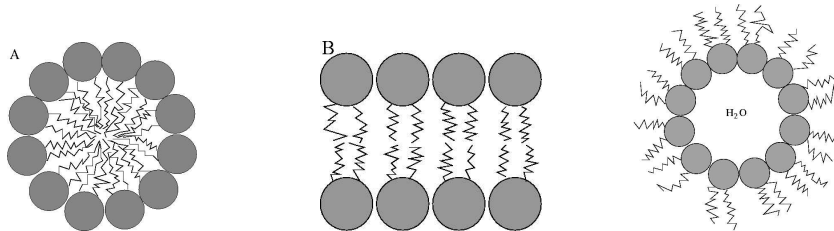


Abbildung 1.1: Verschiedene Lipidstrukturen: a) Mizellen
b) Lipiddoppelschicht c) invers hexagonale Phase

In der Biologie bestehen Membranen aus Hunderten von verschiedenen Lipidarten [25]. Sie haben alle gemeinsam, dass sich an die polare Kopfgruppe ein unpolarer Teil, der durch Fettsäureketten gebildet wird, anschließt. Es existieren Lipide mit bis zu vier Fettsäureketten. Die Fettsäureketten besitzen eine bestimmte Zahl an Kohlenstoffatomen, deren Anzahl sich von Lipid zu Lipid, aber auch von Kette zu Kette eines Lipids unterscheiden kann.

Lipide werden in Familien unterteilt, beispielsweise Sphingolipide oder Phospholipide. Die Gruppe der Phospholipide nimmt in der Biologie eine besonders wichtige Rolle ein. Sie sind Hauptbestandteil biologischer Membranen und besitzen ein Glycerin-Rückgrat. An dieses Glycerin-Rückgrat bindet an eine der drei existierenden Alkoholgruppen eine phosphatenthaltende polare Kopfgruppe. An die anderen beiden Alkoholgruppen binden unpolare Fettsäureketten. Als Beispiel ist die Struktur von DMPC³ in Abbildung 1.2 gezeigt. Die Ketten sind in ihrer *all-trans* Konfiguration gezeigt. Dies bedeutet, dass sich die Ketten in ihrem energetisch niedrigsten Zustand befinden.

³ Die hier eingeführten Abkürzungen werden in Anhang B erklärt.

den. Alle Bindungen sind in ihrer *trans*-Konfiguration und es wird von einer gelförmigen Kette gesprochen. Temperaturerhöhungen regen Rotationsfreiheitsgrade an, so dass Drehungen um die Bindungen ermöglicht werden. Ab einer bestimmten Temperatur befinden sich die Lipidketten in ihrem fluiden Zustand.

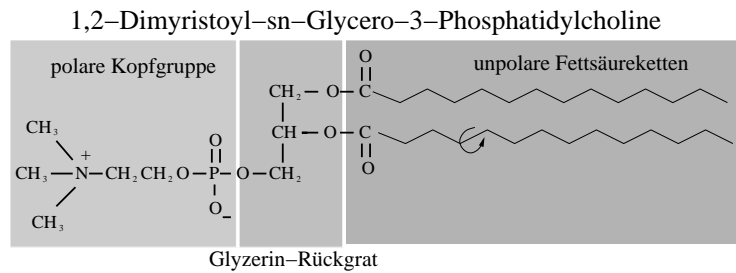


Abbildung 1.2: Schematische Zeichnung eines DMPC-Lipids. Die Fettsäureketten des DMPC-Lipids besitzen 14 Kohlenstoffatome. Die Ketten sind in ihrer all-*trans* Konfiguration dargestellt, wobei der Pfeil einen möglichen Rotationsfreiheitsgrad andeuten soll.

Lipidmembranen, die aus einer einzigen Lipidspezies bestehen, zeigen bei einer lipidspezifischen Temperatur einen Übergang von einem gelförmigen in einen fluiden Zustand. Dies ist ein kooperativer Prozess, d.h. das Schmelzen einer Lipidkette beeinflusst das Schmelzen einer anderen Kette. Die Umwandlungsbreite ist bei diesem kooperativen Schmelzprozess klein. Bei dem Übergang von einer gelförmigen zu einer fluiden Membran erhöht sich die Enthalpie der Lipidmembran um ΔH und die Entropie vergrößert sich um ΔS . Der Um-

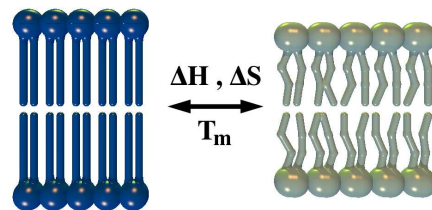


Abbildung 1.3: Umwandlung einer gelförmigen in eine fluide Membran. Dies geht mit einer Änderung der Enthalpie und der Entropie einher.

wandlungsmittelpunkt einer solchen Umwandlung ist definitionsgemäß dann

erreicht, wenn 50 Prozent der Umwandlung vollzogen ist. Die Umwandlungstemperaturen der verschiedenen Lipidspezies liegen alle im Bereich physiologischer Temperaturen (253 K bis 333 K). Die Schmelztemperatur hängt unter anderem von der Länge der Kette, aber auch vom Auftreten von Doppelbindungen ab. Bei einer DMPC-Membran (2 Fettsäureketten mit je 14 Kohlenstoffatomen pro Lipidkette) liegt der Umwandlungsmittelpunkt bei $T_m^{DMPC} \approx 297$ K und bei einer Membran bestehend aus DSPC-Lipiden (2 Fettsäureketten mit je 18 Kohlenstoffatomen pro Kette) bei $T_m^{DSPC} \approx 328$ K. Bei DOPC, das wie DSPC 18 Kohlenwasserstoffe in einer Kette besitzt, jedoch an neunter Stelle eine Doppelbindung enthält, geht die Umwandlungstemperatur auf ungefähr $T_m^{DOPC} \approx 253$ K zurück.

Da biologische Membranen nicht nur aus einer einzigen, sondern aus vielen verschiedenen Lipidarten, die unterschiedliche Schmelztemperaturen zeigen, bestehen, stellt sich die Frage, in wie weit die Zusammensetzung die laterale Organisation einer Membran beeinflusst.

1.3 Das „fluid-mosaic“ Modell und seine Weiterentwicklung

Das in den meisten Lehrbüchern verbreitete Bild einer biologischen Membran ist das 1972 von Singer und Nicolson [76] vorgestellte „fluid-mosaic“ Modell⁴. In diesem Modell wird die Membran als eine Doppelschicht fluider Lipide mit einer langreichweitigen Mosaikstruktur angenommen. Die gesamte Membran befindet sich im thermodynamischen Gleichgewicht. Einzelne Proteine können die Membran durchdringen (integrale Proteine) oder an ihre Oberfläche binden (periphere Proteine). Die Mobilität dieser Proteine wird lediglich durch die Viskosität der fluiden Lipide beeinträchtigt. Dieses Modell ist mit einer orientierten, zweidimensionalen Lösung von Proteinen vergleichbar, wobei die fluiden Lipide das Lösungsmittel darstellen. Das „fluid-mosaic“ Modell ist in Abbildung 1.4 veranschaulicht.

Nach dem „Mattress“-Modell⁵ von Mouritsen und Bloom [52] ist dieses „fluid-mosaic“ Modell jedoch zu erweitern. Hierbei werden Inhomogenitäten der Membranen zugelassen. Diese Heterogenitäten werden durch Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lipiden bewirkt (Abb. 1.5). Weiterentwick-

⁴ Der Begriff des Mosaiks beruht auf der Vorstellung, dass, im Querschnitt betrachtet, die Zusammensetzung einer Membran durch das wechselweise Aneinandersetzen von Lipidschichten und Proteinen bewirkt wird.

⁵ Das Bild einer Matratze kommt daher, dass angenommen wird, dass Proteine die Umgebung der Membran verformen. Die Verformungen erinnern dabei an eine Matratze (siehe Abb. 1.5).

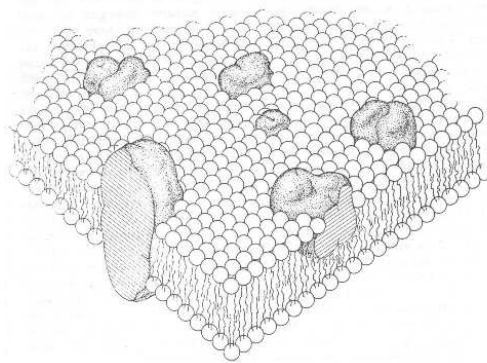


Abbildung 1.4: *Bildliche Vorstellung einer Lipidmembran mittels des „fluid-mosaic“ Modells nach Singer und Nicolson [76].*

lungen dieses Modells berücksichtigen nicht nur fluide, sondern auch gelförmige Lipide [26]. Lipide, die sich im gleichen Zustand befinden, können

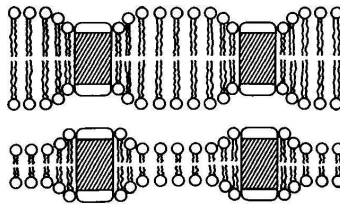


Abbildung 1.5: *Querschnitt zweier Lipiddoppelschichten, in die z.B. Proteine integriert sind [52]. Diese bewirken die Ausbildung von Fehlstellen.*

in bestimmten Gebieten gehäuft auftreten und Domänen fluider und gelförmiger Lipide bilden sich aus, was in Abbildung 1.6 wiedergegeben wird. Die auftretenden Heterogenitäten und auch die Wechselwirkungen zwischen Lipiden und Proteinen wurden theoretisch und experimentell an Modellsystemen studiert (siehe z.B. [26, 32]). Computersimulationen liefern schon seit längerem Evidenzen, dass sich Domänen, also Inhomogenitäten, ausbilden [26]. Erst kürzlich konnten sie durch Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden [6, 7, 22, 39]. Diffusionsstudien an Modellmembranen lassen ebenfalls die Existenz von Heterogenitäten plausibel erscheinen [4].

Seit einigen Jahren besteht ein großes Forschungsinteresse an kleinen Membranfragmenten, die hohe Konzentrationen an Sphingolipiden, Cholesterin und Proteinen enthalten [74]. Diese Mikrodomänen werden als „Rafts“ bezeichnet. Deren Einfluss auf Diffusionsprozesse wird ebenfalls untersucht [15].

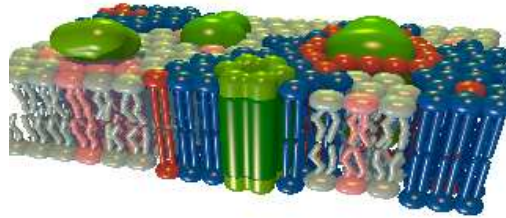


Abbildung 1.6: *Modernes Bild einer biologischen Membran. Die unterschiedlichen Lipidsorten können sowohl im gelförmigen (blau und rot eingezeichnet) als auch im fluiden Zustand vorkommen. Domänen bilden sich aus und beeinflussen unter anderem die Anbindung der unterschiedlichen Proteine.*

1.4 Diffusion in biologischen Systemen I

Diffusionseigenschaften von Lipiden oder Proteinen werden, wie im vorherigen Abschnitt bereits kurz angedeutet, durch Heterogenitäten innerhalb der Membran beeinflusst. Zur Untersuchung der in Modellmembranen und biologischen Membranen beobachtbaren Diffusionsprozesse wurden in der Vergangenheit insbesondere Experimente mittels „Fluorescence After Photobleaching“ (FRAP) [2, 3, 84] und „Single-Particle Tracking“ (SPT) [59, 69, 73, 75] genutzt. Neuerdings etabliert sich aber auch die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) [39, 77]. Beim FRAP wird ein System derart untersucht, dass Fluoreszenzlabel⁶ in einem durch einen Laserfokus definierten Gebiet zunächst gebleicht werden, d.h. sie verlieren ihre Fähigkeit zu fluoreszieren. Anschließend diffundieren Label, die sich während des Bleichens ausserhalb des gebleichten Gebiets aufgehalten haben, in dieses Gebiet hinein und bewirken einen Wiederanstieg des Fluoreszenzsignals. Dabei ergibt sich eine charakteristische Kurve des sich wieder aufbauenden Fluoreszenzsignals, deren Verlauf von den Diffusionseigenschaften der Label abhängt. SPT bedeutet, dass ein Teilchen über eine definierte Zeit mittels Videomikroskopie verfolgt wird und seine Position in vorgegebenen Zeitintervallen abgelesen wird. Das Verfolgen der momentanen Position kann durch ein an das Teilchen angebrachten Marker gewährleistet werden [69]. Bei der FCS werden

⁶ Diese können durch Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden und emittieren nach einer gewissen Zeit Photonen einer größeren Wellenlänge.

die durch Konzentrationsschwankungen diffundierender Fluoreszenzmarker bewirkten Fluoreszenzintensitätsschwankungen analysiert.

Sowohl analytische Theorien („Freies Volumen“ oder hydrodynamische Theorien) als auch numerische Modelle (Monte Carlo Simulationen) werden zum tieferen Verständnis der experimentellen Daten herangezogen. Die wichtigsten theoretischen Konzepte werden im folgenden Kapitel näher erläutert. Es lässt sich aber jetzt schon festhalten, dass verschiedenste Arten der Diffusion beobachtet werden. So können gelförmige Domänen oder durch Bindung an das Zytoskelett nicht diffundierende Proteine Diffusion behindern oder Diffusion kann sogar nur auf bestimmte Gebiete beschränkt sein. Ein Problem bestehender Modelle liegt unter anderem an der Nichtberücksichtigung von Temperaturabhängigkeiten oder daran, dass Inhomogenitäten nur „künstlich“ ins System übernommen werden. Diffusion in Gebieten, in denen sich vorwiegend gelförmige Lipide befinden (Geldomänen), wird hierbei oftmals außer Acht gelassen. Das gleichzeitige Auftreten unterschiedlicher Diffusionszeiten verschiedener diffundierender Teilchen findet ebenfalls keine Erwähnung.

In dieser Arbeit wird ein statistisch thermodynamisches ComputermodeLL eines zweikomponentigen Lipidsystems eingeführt. Dieses Modell ist in der Lage, thermodynamische Eigenschaften wie Wärmekapazitätsprofile des gewählten realen DMPC:DSPC Lipidsystems zu beschreiben. Die Ausbildung von gelförmigen und fluiden Domänen ist in Abhängigkeit von der Temperatur zu beobachten. Somit ist es möglich, mittels der Simulation experimenteller Methoden die Diffusion der Lipide und deren Beeinflussung durch die existierenden Domänen zu verstehen und dies mit Experimenten zu vergleichen. Im Gegensatz zu den „Freies Volumen“ Theorien und den numerischen Studien von Saxton fehlt weder die Temperaturabhängigkeit, noch müssen Hindernisse durch irgendwelche Annahmen ins System übernommen werden. Das Modell enthält beide dieser Eigenschaften automatisch.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der Diffusionseigenschaften von Lipiden in einem einfachen Lipidsystem führen soll.

Obwohl schon einige Arbeiten über die Diffusion von Lipiden und Proteinen und deren Beeinflussung durch Heterogenitäten und Wechselwirkungen verschiedenster Art publiziert wurden, sind die Diffusionseigenschaften noch nicht voll verstanden, wie es 1999 Saxton [70] bemerkte:

„Over two decades of the publication of the fluid mosaic model and the development of the fluorescence photobleaching recovery technique, we still do not fully understand the hindrances to diffusion.“

Kapitel 2

Theorie

2.1 Diffusion in biologischen Systemen II

Zur Beschreibung der Diffusionseigenschaften von Proteinen und Lipiden sind in den vergangenen Jahrzehnten sowohl analytische als auch numerische Modelle entwickelt worden. Die Diffusion von Proteinen in homogenen Systemen konnte dabei mit hydrodynamischen Theorien erklärt werden. Diese Ansätze scheitern aber im Falle der Diffusion von Lipiden. „Freies Volumen“ Theorien haben sich dabei als sinnvoller erwiesen. Zum Studieren komplexerer Diffusionsverhalten haben sich numerische Methoden als erfolgreich erwiesen. Im Folgenden sollen die wichtigsten Modelle vorgestellt werden.

2.1.1 Normale und anomale Diffusion

Zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts konnte Albert Einstein einige fundamentale Theorien, die zu einem besseren Verständnis der Brownschen Bewegung führten, aufstellen [18, 19]. Einstein modellierte hierbei die Brownsche Bewegung mittels einer molekularkinetischen Theorie der Wärme. In seiner Arbeit aus dem Jahre 1905 [18] erhielt er für die Wahrscheinlichkeit $P(r, t)$ zur Zeit t ein in einer Dimension diffundierendes Teilchen in einem Abstand r vom Ausgangspunkt zu finden, folgenden Ausdruck:

$$P(r, t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-\frac{r^2}{4Dt}}, \quad (2.1)$$

wobei D die phänomenologische Diffusionskonstante darstellt.

Eine Verallgemeinerung auf eine Diffusion in d Dimensionen ergibt [9]:

$$P(|\vec{r}|, t) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{\frac{d}{2}}} e^{-\frac{|\vec{r}|^2}{4Dt}}. \quad (2.2)$$

Beide Wahrscheinlichkeitsverteilungen leiten sich als asymptotische Lösung aus dem „Zentralen Grenzwertsatz“ (ZGS) ab. Die Hauptaussage dieses Theorems ist, dass sich die Wahrscheinlichkeitsverteilung beim „Random Walk“ zu langen Zeiten gaußförmig verhält. Dies ist jedoch nur für *normale* Diffusion erfüllt. Es existieren jedoch Diffusionsprozesse, in denen der ZGS verletzt wird. Unter anderem ist dies bei *anomaler* Diffusion der Fall. Hierbei verhält sich die Wahrscheinlichkeitsverteilung nicht mehr gaußförmig, sondern es sind breitere Verteilungen oder langreichweitige Korrelationen zu beobachten.

Bei der Unterscheidung der beiden Diffusionsarten ist die Betrachtung des „Mittleren Quadratischen Abstands“ (MSD¹) sinnvoll. Dieses ist definiert als das Quadrat des Abstands zwischen Ausgangsposition und Position zur Zeit t . Bei normaler Diffusion verhält sich ein aus vielen Teilchenspuren gemittelt-tes MSD proportional zur Zeit t . Diese Proportionalität geht bei anomaler Diffusion verloren [30]. Für das MSD gilt in den Fällen normaler und anomaler Diffusion²:

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt \quad (\text{normal}) \quad (2.3)$$

$$\langle r^2 \rangle = \Gamma t^\alpha \quad (\text{anomal}), \quad (2.4)$$

hierbei stellen D den Diffusionskoeffizienten und Γ den Transportkoeffizienten dar. Für den Exponenten α gilt allgemein, dass er ungleich Eins ist ($0 < \alpha < 1 \vee \alpha > 1$). In den Fällen, die in dieser Arbeit betrachtet werden, ist er auf Werte kleiner als Eins beschränkt ($0 < \alpha < 1$). Wird wie im Fall der normalen Diffusion ein Diffusionskoeffizient eingeführt, so ist dieser bei der anomalen Diffusion zeitabhängig und es gilt:

$$D_{ano} = \frac{1}{4} \Gamma t^{\alpha-1}. \quad (2.5)$$

Das Auftreten anomaler Diffusion wird durch unterschiedlichste physikalische Gründe verursacht. Sie ist unter anderem in ungeordneten oder auch in fraktalen Systemen zu beobachten [9, 29, 30]. Saxton hat mittels Monte Carlo Simulationen unterschiedliche Gründe für das Auftreten von anomaler und anderen Arten von Diffusion in biologischen Systemen gefunden ([61] bis [68], [71]). Auf diese Arbeiten wird in einem gesonderten Abschnitt 2.1.3

¹ Die Abkürzung entstammt dem englischen Wort, dass „Mean-Square Displacement“ lautet.

² In der Literatur werden verschiedene Arten anomaler Diffusion unterschieden, so z.B. die Beeinflussung des Wertes des Diffusionskoeffizienten oder das Abweichen des Diffusionsverhaltens im Vergleich zur Brownschen Bewegung. In dieser Arbeit wird mit dem Begriff der anomalen Diffusion gemeint, dass der „Mittlere Quadratische Abstand“ proportional zu t^α ist (siehe Gl. (2.4) und [29]).

eingegangen. Zuvor sollen jedoch zwei analytische Ansätze zur Beschreibung von Diffusion in biologischen Systemen erläutert werden.

2.1.2 Hydrodynamische und „Freies Volumen“ Theorien

In ihrer Arbeit aus dem Jahre 1975 haben Saffman und Delbrück [60] ein hydrodynamisches Modell zur Beschreibung der Brownschen Bewegung in biologischen Membranen vorgestellt. Dieses zeichnet sich dadurch aus, dass die diffundierenden Teilchen als Zylinder, die sich in einer viskosen Umgebung lateral fortbewegen können und denen ebenfalls eine Rotation erlaubt wird, angenommen werden (siehe Abb. 2.1). In ihrer Herleitung gehen sie von den Einsteinschen Beziehungen für die Translation und die Rotation aus:

$$D_T = k_B T b_t \quad (\text{Translation}) \quad (2.6)$$

$$D_R = k_B T b_R \quad (\text{Rotation}), \quad (2.7)$$

wobei D_T und D_R die beiden Diffusionskonstanten, k_B die Boltzmannkonstante, T die absolute Temperatur und b_T und b_R die Mobilitäten der Translation bzw. der Rotation darstellen.

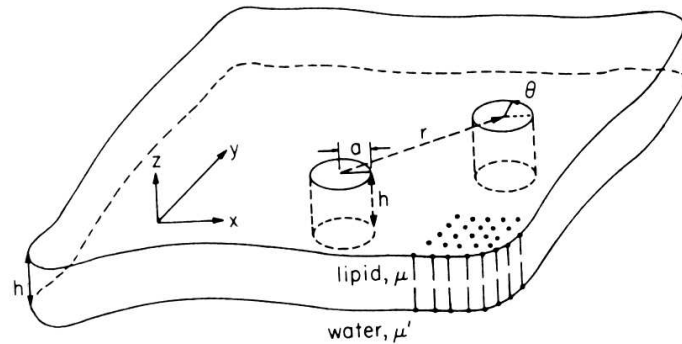


Abbildung 2.1: Bildliche Darstellung des Modells von Saffmann und Delbrück (Abb. 1 aus [60]): Das diffundierende Teilchen wird als ein Zylinder mit Radius a angenommen. Dieser diffundiert in der Membran der Dicke h .

Die Dicke der von Wasser umgebenen Membran wird mit h angenommen und der Zylinder habe einen Radius a . Mit den Viskositäten μ' des Wassers und μ der Membran und der Annahme $\mu' \ll \mu$ lassen sich die Diffusionskonstanten durch die Gleichungen (2.8) und (2.9) wiedergeben:

$$D_T = \frac{k_B T}{4\pi\mu h} \left(\log \frac{\mu h}{\mu' a} - \gamma' \right) \quad (2.8)$$

$$D_R = \frac{k_B T}{4\pi\mu a^2 h}, \quad (2.9)$$

wobei $\gamma' = 0.5772$ die Eulersche Zahl ist.

Saffman und Delbrück erwähnen in ihrer Originalpublikation, dass ihr Modell zur Beschreibung von in biologischen Membranen diffundierenden Proteinen, die größer als Lipide sind, gedacht ist. Dies hat den Hintergrund, dass eine hydrodynamische Theorie nur dann Gültigkeit besitzt, wenn die diffundierenden Teilchen wesentlich größer sind, als die Teilchen, die die viskose Flüssigkeit bilden [40]. Trotzdem wurde untersucht, ob mittels des vorgestellten hydrodynamischen Modells auch die Lipiddiffusion hinreichend beschrieben werden kann. Im Gegensatz zu in fluiden Modellmembranen diffundierenden Proteinen lässt sich festhalten, dass die Diffusionskoeffizienten von Lipiden nicht korrekt wiedergegeben werden [12, 83].

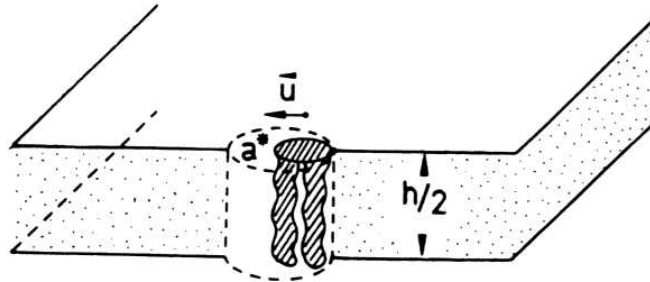


Abbildung 2.2: Prinzip der „Freies Volumen“ Theorie: Eine Diffusion ist dann möglich, wenn dem Lipid oder allgemeiner dem diffundierenden Teilchen genügend Platz (Volumen, Fläche) zur Verfügung steht. Die Graphik ist aus [12] entnommen.

Zur Beschreibung der Brownschen Bewegung von Lipiden wird oftmals die phänomenologische „Freies Volumen“ Theorie genutzt. Diese Theorie besitzt Gültigkeit, wenn die diffundierenden Teilchen von den Ausmaßen kleiner oder gleich den, die Flüssigkeit bildenden Molekülen sind. Es wird dann davon ausgegangen, dass zur Ermöglichung eines Diffusionsschritts dem diffundierenden Lipid ein bestimmtes freies Volumen zur Verfügung steht, ansonsten ist ein Diffusionsschritt nicht möglich.

Die „Freies Volumen“ Interpretationen unterteilen den Diffusionsschritt in zwei unabhängige Prozesse. Der erste Schritt ist das zur Verfügung stellen eines ausreichenden Volumens und der zweite Prozess die eigentliche Translation.

Für die Beschreibung von Lipiddiffusion wurde diese Theorie zum ersten Mal von Galla et al. angewendet [24]. Diese übertrugen Ideen von Cohen und Turnbull [13], die sich mit den dreidimensionalen Transporteigenschaften in Flüssigkeiten und Gläsern beschäftigten, auf das zweidimensionale Problem der Translation von Lipiden. Die grundlegende Idee besteht darin, dass eine Diffusion nur dann möglich ist, wenn das freie Volumen bzw. die freie Fläche im zweidimensionalen Fall größer oder gleich eines kritischen Faktors ist (Abb. 2.2). Es wird dann ein Durchschnittsdiffusionskoeffizient als das Integral über die Diffusionskoeffizienten, die zu einem bestimmten lokalen Volumen v und deren Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(v)$ gehören, bestimmt:

$$\langle D \rangle = \int_{v^*}^{\infty} D(v) P(v) dv, \quad (2.10)$$

wobei v^* das kritische Volumen darstellt.

Die Wahrscheinlichkeitsverteilung hängt von dem mittleren freien Volumen $v_f = \langle v \rangle - v_0 = L(\langle a \rangle - a_0)$ ab. Hierbei sind $\langle v \rangle$ das durchschnittliche Volumen des entsprechenden Moleküls, $\langle a \rangle$ die durchschnittliche Fläche des Moleküls, v_0 und a_0 die van-der-Waals Größen³ und L die Länge der Lipide, wenn sie als Zylinder modelliert werden. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung der lokalen Volumina ist durch

$$P(v) = \frac{\gamma}{v_f} \cdot \exp \left(\gamma \cdot \frac{v}{v_f} \right) \quad (2.11)$$

gegeben; hierbei ist γ ein numerischer Faktor, der eventuelle Überlappungen von freiem Volumen beschreibt und für den $\frac{1}{2} < \gamma < 1$ gilt. Im Weiteren wird der Diffusionskoeffizient $D(v)$ als konstant angenommen ($D(v) = D(v^*)$). Ausführen der Integration in Gleichung (2.10) führt auf einen Diffusionskoeffizienten von:

$$\langle D \rangle = D(v^*) \cdot \exp \left(\gamma \cdot \frac{v^*}{v_f} \right). \quad (2.12)$$

Für das zweidimensionale System wie es von Galla et al. untersucht wurde,

³ Die van-der-Waals Größen werden durch die effektive Größe eines Moleküls, das nur durch die schwachen van-der-Waals Kräfte in Kontakt zu einem anderen Molekül gehalten wird, definiert.

ergibt sich mit $D(a^*) = g \cdot l_c \cdot u$ ein Diffusionskoeffizient⁴ von:

$$\langle D \rangle = gl_c u \exp \left(\gamma \cdot \frac{a^*}{a_f} \right). \quad (2.13)$$

Dabei sind a^* die kritische Fläche, $g \approx \frac{1}{4}$ ein geometrischer Faktor, l_c der durchschnittliche Weg, der bei einer Translation zurückgelegt wird und u die gaskinetische Geschwindigkeit.

Die mittlere freie Fläche ist eine temperaturabhängige Variable für die $a_f = a_0 \alpha_a (T - T_0)$ gilt. Dabei sind a_0 die van-der-Waals molekulare Fläche, α_a der thermische Ausdehnungskoeffizient und T_0 die Temperatur ab der freies Volumen existiert. Der Diffusionskoeffizient hängt somit von der kritischen und der durchschnittlichen freien Fläche ab.

Einen ähnlichen Ausdruck wie in Gleichung (2.13) haben auch MacCarthy und Kozak, die direkt vom zweidimensionalen Fall ausgegangen sind, hergeleitet [44]. Dabei wendeten sie Prinzipien eines „Random Walks“ an und folgten den Argumenten von Cohen und Turnbull. Nach der Herleitung von MacCarthy und Kozak ergeben sich die oben eingeführten Größen g und γ zu: $g = \frac{1}{4}$ und $\gamma = 1$.

In dem oben dargestellten Modell werden Energiebarrieren, die zwischen zwei Gleichgewichtszuständen vor und nach dem Diffusionsschritt vorhanden sein können, nicht berücksichtigt. In einer Arbeit von Macedo und Litovitz [45] ist dies mit berücksichtigt. Es ergibt sich dabei ein von der Aktivierungsenergie abhängiger Diffusionskoeffizient:

$$\langle D \rangle = A_0 D(a^*) \cdot \exp \left(\gamma \cdot \frac{a^*}{a_f} - \frac{E^*}{k_B T} \right), \quad (2.14)$$

wobei A_0 ein temperaturabhängiger Faktor und E^* die Aktivierungsenergie pro Molekül sind.

Verschiedene Experimente zur Untersuchung von Lipiddiffusion werden mittels der „Freies Volumen“ Theorie gedeutet. Hierunter fallen die Arbeiten von Vaz et al. [84] und Almeida et al. [2], die mit FRAP-Messungen⁵ Diffusionsprozesse in Modellmembranen untersuchen und die erhaltenen Ergebnisse mittels „Freies Volumen“ Theorien interpretieren. In der Arbeit von Almeida et al. wird der Einfluss von Cholesterin auf die Diffusionseigenschaften untersucht. Die dabei erzielten Ergebnisse werden mittels einer Erweiterung

⁴ In der zitierten Arbeit von Galla et al. [24] hat sich in Gleichung 18 ein Druckfehler eingeschlichen, so dass die hier in Gleichung (2.13) dargestellte Lösung von der dort abgedruckten abweicht. Siehe hierzu unter anderem auch den Artikel von Clegg und Vaz [12], in dem diese auf die Herleitung von Galla et al. eingehen.

⁵ Eine kurze Erklärung findet sich in Abschnitt 1.4.

der Überlegungen von Macedo et al. ([45], Gl. (2.14)) interpretiert und der Einfluss des Cholesterins auf das freie Volumen diskutiert. In einer erst kürzlich veröffentlichten theoretischen Studie [57] werden die erzielten Ergebnisse qualitativ bestätigt, die Interpretationen bzgl. der „Freies Volumen“ Theorie vertieft und der Effekt, dass das Cholesterin das freie Volumen verringert, bestätigt.

Die bisher vorgestellten Modelle können lediglich zur Beschreibung der Diffusion in homogenen Systemen herangezogen werden. In einer anderen Arbeit von Almeida et al. [3] wird auch das Auftreten von gelförmigen Domänen berücksichtigt. Diese gelförmigen Domänen werden als Hindernisse mit einem festen Radius angenommen. Verschiedene Domänengrößen können dabei durch Zusammenbringen und Überlappen mehrerer Kreise erreicht werden. Lipide, die sich in einer Gel-Domäne befinden, werden als nichtdiffundierende Teilchen angenommen. An dieser Stelle soll aber auf eine ausführliche Diskussion der Herleitung verzichtet und auf die dazugehörige Veröffentlichung verwiesen werden [3].

2.1.3 Monte Carlo Studien zur Beschreibung von Diffusionsprozessen

Monte Carlo Studien stellen eine numerische Möglichkeit dar, Prinzipien der Diffusionsprozesse, die in biologischen Membranen auftreten, zu verstehen und zu untersuchen. In der Literatur lassen sich hierbei einige Arbeiten von Saxton finden ([61] bis [68], [71]), in denen verschiedene experimentell zu beobachtende Diffusionseigenschaften mittels Gittermodellen beschrieben werden. Die Studien von Saxton, die ebenfalls Ergebnisse der Perkolationstheorie⁶ nutzen, dienen aber auch zum besseren Verständnis von experimentellen Verfahren, Ergebnissen und deren Interpretation. Im weiteren soll die Bedeutung verschiedenster, von Saxton untersuchter Effekte auf die Beeinflussung und Behinderung diffundierender Teilchen vorgestellt werden.

Es ist anzumerken, dass „Harte Kugel“-Modelle Anwendung finden, d.h. vorkommende Hindernisse und diffundierende Teilchen (Tracer) können dabei

⁶ Unter einem perkolierenden Cluster wird ein Cluster einer bestimmten Spezies verstanden, der ein endliches Gitter von oben nach unten oder von links nach rechts durchspannt, d.h. es lässt sich ein Weg von links nach rechts oder von oben nach unten finden, ohne den Cluster zu verlassen. In der Perkolationstheorie treten kritische Exponenten und Konzentrationen auf, mit denen sich das System eindeutig beschreiben lässt. Die kritischen Konzentrationen stellen die Perkolationsschwelle dar, ab der perkolierende Cluster auftreten. Die kritischen Exponenten β , γ und ν beschreiben das Verhalten von im System vorkommenden Größen wie z.B. der Kohärenzlänge ξ . Diese gibt die durchschnittliche Größe endlicher Cluster an und verhält sich in der Nähe der kritischen Konzentration wie: $\xi \propto |p - p_c|^{-\nu}$.

nicht überlappen. Temperaturabhängigkeiten sind ebenfalls nicht enthalten. Saxton studiert unter Anderem Hindernisse verschiedenster Art, die mobil oder immobil sein können und die beispielsweise Proteine oder Cluster gelförmiger Lipide repräsentieren sollen. Sie beeinflussen das Diffusionsverhalten eines punktförmigen Tracers unterschiedlich stark [61]. Sind sie mobil, wird der Diffusionskoeffizient im Vergleich zur freien Diffusion ohne Hindernisse verringert, aber eine Diffusion über das gesamte Gitter ist möglich, was wie weiter unten erläutert wird, nicht unbedingt der Fall sein muss. Der Diffusionskoeffizient des Tracers hängt sowohl vom Diffusionskoeffizienten der Hindernisse, als auch von deren Konzentration ab. Höhere Konzentrationen an Hindernissen bewirken eine stärkere Beeinträchtigung des Diffusionskoeffizienten als geringere. Diffundieren sie schnell, so beeinträchtigen sie die Diffusion der Tracer weniger stark als es bei langsamer oder nicht vorhandener Diffusion der Hindernisse der Fall ist. Überschreitet die Konzentration der immobilen Hindernisse die Perkolationsschwelle, so führt dies zur Beschränkung der Diffusion des Tracers auf bestimmte Gebiete. Hierbei ist die Diffusion für alle Zeiten anomal, folgt also keinem linearen Zeitgesetz. Unterhalb der Perkolationsschwelle diffundieren die Tracer über die gesamte Matrix, aber auch in diesen Fällen ist die Diffusion gehemmt. Auf kurzen Zeitskalen ist anomale Diffusion zu beobachten, die für lange Zeiten in normale Diffusion übergeht [66].

Die Diffusionseigenschaft eines Tracers in Gegenwart von Hindernissen hängt jedoch nicht nur von deren Konzentration und Mobilität ab, sondern auch von deren Form [63]. So werden von Saxton Punkthindernisse, kompakte Hindernisse und Cluster-Cluster Aggregate unterschieden. Punkthindernisse sind hierbei statistisch besetzte Gitterplätze und kompakte Hindernisse sind Quadrate, die mehrere Gitterpunkte bedecken. Cluster-Cluster Aggregate entstehen durch das Aneinanderbinden mobiler Punkthindernisse und später durch Aneinanderbinden der entstehenden Cluster. Bedecken diese Cluster-Cluster Aggregate den gleichen Flächenanteil wie Punkthindernisse, so ist festzustellen, dass Cluster-Cluster Aggregate die Diffusion stärker behindern als Punkthindernisse. Diese sind aber effektivere Diffusionsbarrieren als die kompakten Hindernisse.

Bisher wurde der Tracer selbst lediglich als Punktteilchen angenommen. Es kann aber auch festgestellt werden, dass sich das Diffusionsverhalten eines Teilchens in Abhängigkeit seiner Größe verändert [64]. Punktteilchen werden durch nichtfraktale Hindernisse⁷ weniger beeinträchtigt als Hexagone, deren Diffusion umso stärker beeinflusst wird, je größer sie sind. Sind die Hinder-

⁷ Ein fraktales Objekt besitzt eine gebrochene Dimension. Nichtfraktale Objekte besitzen ganzzahlige Dimensionen, wie z.B. Geraden oder Flächen.

nisse jedoch fraktal, so spielt die Form des Tracers keine Rolle.

Diffundierende Teilchen können aber nicht nur durch Hindernisse, sondern auch durch Bindung oder einer Kombination von Bindung und Hindernissen in ihren Diffusionseigenschaften beeinflusst werden [67]. In der Biologie spielt insbesondere das Letztgenannte eine Rolle. Punkthindernisse sollen hierbei immobile Proteine darstellen, die in der Nachbarschaft vorkommende Tracer binden können. In diesem theoretischen System wird anomale Diffusion durch die Hindernisse bewirkt. Die Möglichkeit der Bindung verringert lediglich den Langzeitdiffusionskoeffizienten, hat aber keine Auswirkung auf die Anomalität der Diffusion, d.h. der Exponent α in Gleichung (2.4) wird lediglich durch die Hindernisse beeinflusst.

Insgesamt ist festzuhalten, dass Saxton mittels seiner theoretischen Untersuchungen zu verstehen versucht, wie verschiedene Effekte die Diffusion von Teilchen beeinflussen. Dabei bezieht er sich auf FRAP- und SPT-Experimente⁸ und zieht Beispiele aus Messungen an Modellsystemen und Zellen heran. Er stellt jedoch fest, dass es immer noch experimentell gefundene Effekte gibt, die mit den beschriebenen Modellen nicht verstanden werden [70].

2.1.4 Ergänzungen

Neben den bereits vorgestellten Diffusionsmodellen der normalen und anomalen Diffusion existieren noch zwei weitere wichtige Modelle, die Erwähnung finden sollten. Dies sind die „gezielte Bewegung mit Diffusion“ (Gl. 2.15) und die „Korralldiffusion“ (Gl. 2.16):

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt + (vt)^2 \quad (2.15)$$

$$\langle r^2 \rangle = \langle r_c^2 \rangle \left(1 - A_1 e^{-\frac{4A_2 Dt}{\langle r_c^2 \rangle}} \right). \quad (2.16)$$

Der erste Fall tritt z.B. auf, wenn ein Protein in einer mit der Geschwindigkeit v bewegenden Membran diffundiert oder das mobile Teilchen an einen sich mit v bewegenden Motor im Zytoskelett gebunden ist. Der zweite Fall beschreibt Diffusion in Gebieten die beispielsweise durch strukturbildende Proteine abgegrenzt sind [65]. $\langle r_c^2 \rangle$ ist dabei die „Korral“-Größe und sowohl A_1 als auch A_2 werden durch die „Korral“-Geometrie bestimmt.

2.2 Theorie der Phasendiagramme

Diffusion in biologischen Systemen wird durch verschiedene Mechanismen beeinflusst. So kann wie schon vorher beschrieben ein diffundierendes Protein

⁸ Diese experimentelle Technik wurde in Abschnitt 1.4 kurz erläutert.

oder Lipid durch Hindernisse in seinem normalen Diffusionsverhalten gestört werden. Solche Hindernisse können unter anderem durch Phasenbildung erzeugt werden. Aus diesem Grund soll erläutert werden, was unter dem Begriff *Phasen* verstanden wird und auf theoretische Ansätze zur Beschreibung von Phasendiagrammen eingegangen werden.

2.2.1 Die Gibbssche Phasenregel

Substanzen einer bestimmten Atom- oder Molekülsorte können in verschiedenen Modifikationen oder auch *Phasen* vorkommen. Die Unterschiede liegen in den physikalischen Eigenschaften, so differieren z.B. Dichten oder Kompressibilitäten. In der Thermodynamik wird zwischen festen, flüssigen und gasförmigen Phasen unterschieden. Koexistenz verschiedener Phasen ist möglich und ein Phasengleichgewicht liegt vor, wenn zwei oder mehrere Phasen im Gesamtsystem existieren und sich im thermodynamischen Gleichgewicht befinden. In einem einkomponentigen Zweiphasensystem gilt dann für die beiden chemischen Potenziale:

$$\mu(p, T) = \mu'(p, T). \quad (2.17)$$

Dabei sind p der Druck und T die Temperatur. Gleichung (2.17) kann auf Systeme mit mehreren Phasen und Substanzen ausgedehnt werden:

$$\begin{aligned} \mu_1 = \mu'_1 = \dots = \mu_1^{(m-1)} \\ \mu_2 = \mu'_2 = \dots = \mu_2^{(m-1)} \\ \vdots \\ \mu_n = \mu'_n = \dots = \mu_n^{(m-1)}. \end{aligned} \quad (2.18)$$

Hierbei geben n die Anzahl an Komponenten und m die Zahl an verschiedenen Phasen an. Die Gibbssche Phasenregel beschreibt die Zahl der Freiheitsgrade f :

$$f = n - m + 2, \quad (2.19)$$

Bei konstantem Druck reduzieren sich die freien Variablen um eins auf:

$$f_{p_{const}} = n - m + 1. \quad (2.20)$$

Übergänge von einer Phase in eine andere Phase können stattfinden; diese werden in verschiedene Klassen unterteilt. Bei der Einteilung der Phasenübergänge nach Ehrenfest werden partielle Ableitungen der chemischen Potenziale

nach der Temperatur betrachtet. Von einem Übergang n -ter Ordnung wird gesprochen, wenn

$$\left(\frac{\partial^m}{\partial^m T} \right)_p (\mu^{(i)} - \mu^{(j)}) \begin{cases} = 0 & (m < n) \\ \neq 0 & (m = n) \end{cases} \quad (2.21)$$

gilt. Hierbei sind $\mu^{(i)}$ und $\mu^{(j)}$ die chemischen Potentiale der Phasen i und j . Handelt es sich um eine Umwandlung 1.ter Ordnung, so separieren sich die Phasen, d.h. im thermodynamischen Limes existieren keine Phasengrenzen.

2.2.2 Ideale und reguläre Lösungen

Eine ideale Lösung liegt vor, wenn sich unterschiedliche Substanzen innerhalb einer Phase statistisch verteilen. Dies bedeutet, dass die verschiedenen Substanzen, die innerhalb einer Phase vorkommen, miteinander nicht unterschiedlich wechselwirken⁹. Ideale Lösungen zeigen Phasenseparation.

Im Folgenden sollen Phasendiagramme zweikomponentiger idealer Lösungen mit den möglichen Phasen fluid l (flüssig) oder gelförmig g (fest) erläutert werden.

Ein typisches Phasendiagramm einer idealen Mischung wird in Abb. 2.3 gezeigt.

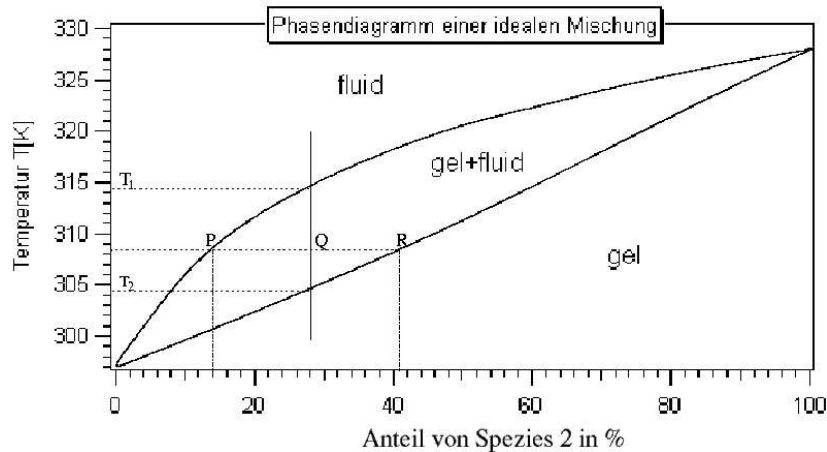


Abbildung 2.3: Mögliches Phasendiagramm einer idealen Mischung.

⁹ Jedes Molekül einer Sorte A wechselwirkt mit jedem Molekül der anderen Komponente B genauso wie mit einem Molekül der eigenen Sorte, was auch für Komponente B gilt ($E_{AA} = E_{AB} = E_{BB}$).

In Abbildung 2.3 wird auf der Abzisse der prozentuale Anteil x_B der Komponente B (Spezies 2) aufgetragen und die Ordinate gibt die Temperatur an.

Bei einer gegebenen Temperatur T muss für die chemischen Potentiale $\mu_i^{(l)}$ und $\mu_i^{(g)}$ im Gleichgewicht Gleichung (2.17) erfüllt sein:

$$\mu_i^{(l)} = \mu_i^{(g)}, \quad (2.22)$$

wobei $i \in \{A, B\}$ ist.

Mit den molaren Anteilen $x_i^{(g)}$ und $x_i^{(l)}$ und den Standardpotenzialen $\mu_i^{(g)0}$ und $\mu_i^{(l)0}$ von einem Mol der reinen Komponenten bei einer Temperatur T , lassen sich die chemischen Potentiale wie folgt schreiben:

$$\mu_i^{(g)} = \mu_i^{(g)0} + RT \ln x_i^{(g)} \quad (2.23)$$

$$\mu_i^{(l)} = \mu_i^{(l)0} + RT \ln x_i^{(l)}. \quad (2.24)$$

Die molaren Verhältnisse einer Spezies können in den unterschiedlichen Zuständen miteinander in Beziehung gesetzt werden:

$$\ln \frac{x_i^{(l)}}{x_i^{(g)}} = \frac{\mu_i^{(g)0} - \mu_i^{(l)0}}{RT}. \quad (2.25)$$

Partielle Differentiation nach der Temperatur liefert einen Zusammenhang zwischen dem Verhältnis $x_i^{(l)}/x_i^{(g)}$ und den Enthalpien der gasförmigen und fluiden Zustände der jeweiligen Spezies:

$$\frac{\partial \ln \frac{x_i^{(l)}}{x_i^{(g)}}}{\partial T} = \frac{H_i^{(l)0} - H_i^{(g)0}}{RT^2}. \quad (2.26)$$

Mit der Annahme, dass die Schmelzenthalpie unabhängig von der Temperatur T ist, ergibt die Integration von Gleichung (2.26) in den Integrationsgrenzen vom Schmelzpunkt T_i der Komponente i bis zur Temperatur T :

$$\ln \frac{x_i^{(l)}}{x_i^{(g)}} = \frac{-\Delta H_i}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_i} \right), \quad (2.27)$$

mit $\Delta H_i = H_i^{(l)0} - H_i^{(g)0}$.

Der Ausdruck von Gleichung (2.27) kann als

$$\frac{x_i^{(l)}}{x_i^{(g)}} = e^{-\mathbf{H}_i} \quad (2.28)$$

geschrieben werden, wobei $\mathbf{H}_i = \frac{\Delta H_i}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_i} \right)$ ist.

Die Summen der zu den gleichen Zuständen gehörenden molaren Verhältnisse müssen gleich eins sein (siehe Gleichungen (2.29) und (2.30)).

$$x_A^{(g)} + x_B^{(g)} = 1 \quad (2.29)$$

$$x_A^{(l)} + x_B^{(l)} = 1 \quad (2.30)$$

Mit den Gleichungen (2.27) und (2.29, 2.30) ergeben sich die folgenden vier Beziehungen:

$$\begin{aligned} x_A^{(g)} &= \frac{e^{-\mathbf{H}_B} - 1}{e^{-\mathbf{H}_B} - e^{-\mathbf{H}_A}} \\ x_B^{(g)} &= \frac{1 - e^{-\mathbf{H}_A}}{e^{-\mathbf{H}_B} - e^{-\mathbf{H}_A}} \\ x_A^{(l)} &= \frac{e^{-\mathbf{H}_A} (e^{-\mathbf{H}_B} - 1)}{e^{-\mathbf{H}_B} - e^{-\mathbf{H}_A}} \\ x_B^{(l)} &= \frac{e^{-\mathbf{H}_B} (1 - e^{-\mathbf{H}_A})}{e^{-\mathbf{H}_B} - e^{-\mathbf{H}_A}} \end{aligned} \quad (2.31)$$

Mit Hilfe der Beziehungen von Gleichung (2.31) lässt sich das Phasendiagramm einer idealen Mischung bestimmen, was weiter hinten erläutert wird. Zuvor soll jedoch auf die Informationen, die in einem Phasendiagramm enthalten sind, eingegangen werden.

Bei Temperaturen, die bei einem gegebenen Anteil von Komponente B niedriger als die Temperatur der unteren Grenztemperatur sind, befinden sich die Moleküle des Systems im gelförmigen Zustand. Temperaturen, die über der oberen Grenztemperatur liegen, bewirken, dass die Moleküle in ihrer fluiden Form vorliegen. Im Zwischenbereich koexistieren die fluiden und gelförmigen Phasen. Dieser Koexistenzbereich kann durch das *Hebelgesetz* beschrieben werden. Dieses gibt an, wie das Verhältnis von fluiden zu gelförmigen Molekülen ist:

$$\frac{n_l}{n_l + n_g} = \frac{|R - Q|}{|R - P|}. \quad (2.32)$$

n_l und n_g sind die Gesamtzahlen an Molekülen im fluiden oder gelförmigen Zustand. Die Punkte P , Q und R lassen sich aus dem Phasendiagramm entnehmen (siehe Abb. 2.3). P und R sind temperaturabhängig, während Q sowohl von der Temperatur als auch vom Verhältnis der beiden Komponenten abhängt.

Das Phasendiagramm selbst berechnet sich durch die Betrachtung der Grenztemperaturen. An diesen Grenztemperaturen gilt, dass bei der unteren

Grenztemperatur T_2 $x_A^{(g)}/x_B^{(g)}$ gleich dem molaren Mischungsverhältnis der beiden Komponenten ist und bei der oberen Grenztemperatur T_1 ist dieses Verhältnis gleich $x_A^{(l)}/x_B^{(l)}$. Dies führt mit den Gleichungen (2.31) und einem Anteil von Komponente B von $X_{Spezies2}$ auf Gleichungssysteme, dessen Lösungen die Grenztemperaturen des Phasendiagramms sind:

$$(1 - X_{Spezies2}) \cdot (1 - e^{\mathbf{H}_A}) = X_{Spezies2} \cdot (1 - e^{\mathbf{H}_B}) \quad (2.33)$$

und

$$(1 - X_{Spezies2}) \cdot (1 - e^{-\mathbf{H}_A}) = X_{Spezies2} \cdot (1 - e^{-\mathbf{H}_B}). \quad (2.34)$$

Das Hebelgesetz gilt nicht nur für Phasendiagramme idealer Lösungen, sondern auch für Phasendiagramme regulärer Lösungen.

Bei diesen wird im Gegensatz zum idealen Fall angenommen, dass die unterschiedlichen Komponenten einer Phase miteinander verschieden wechselwirken, d.h. $E_{AA} \neq E_{AB} \neq E_{BB}$. In der analytischen Beschreibung einer zweikomponentigen regulären Lösung führt dies zu einem zusätzlichen Summanden in der Beschreibung der chemischen Potenziale der Gleichungen (2.23) und (2.24):

$$\mu_i^{(g)} = \mu_i^{(g)0} + RT \ln x_i^{(g)} + \rho_0^{(g)} \left(1 - x_i^{(g)}\right)^2 \quad (2.35)$$

$$\mu_i^{(l)} = \mu_i^{(l)0} + RT \ln x_i^{(l)} + \rho_0^{(l)} \left(1 - x_i^{(l)}\right)^2, \quad (2.36)$$

Dabei sind die Terme $\rho_0^{(g)}$ und $\rho_0^{(l)}$ als Abweichung der Wechselwirkungsenergien ($E_{AA}^{(j)}$, $E_{BB}^{(j)}$, $E_{AB}^{(j)}$) der drei in einer Phase möglichen Wechselwirkungen zu interpretieren:

$$\rho_0^{(j)} = z \cdot \left(2 \cdot E_{AB}^{(j)} - E_{AA}^{(j)} - E_{BB}^{(j)}\right), \quad (2.37)$$

wobei $j \in \{g, l\}$ gilt. Die Koordinationszahl z gibt die Zahl aller nächsten Nachbarn eines jeden Moleküls an.

Mittels algebraischer Umformungen [43] ergibt sich dann ein numerisch zu lösendes Gleichungssystem:

$$\ln \frac{x_A^{(l)}}{x_A^{(g)}} + \frac{\rho_0^{(l)} \left(1 - x_A^{(l)}\right)^2 - \rho_0^{(g)} \left(1 - x_A^{(g)}\right)^2}{RT} = \frac{-\Delta H_A}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_A}\right) \quad (2.38)$$

und

$$\ln \frac{1 - x_A^{(l)}}{1 - x_A^{(g)}} + \frac{\rho_0^{(l)} \left(x_A^{(l)}\right)^2 - \rho_0^{(g)} \left(x_A^{(g)}\right)^2}{RT} = \frac{-\Delta H_B}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_B}\right).$$

Bei Annahme, dass sich Lipidsysteme wie ideale oder reguläre Lösungen verhalten, lassen sich die Überlegungen auf zweikomponentige Lipidsysteme übertragen. Hierbei sind dann die Schmelzenthalpien und die Schmelztemperaturen der reinen Lipidmischungen einzusetzen. Im Falle der regulären Mischung sind dann noch die Wechselwirkungsparameter $\rho_0^{(l)}$ und $\rho_0^{(g)}$ zu bestimmen.

2.2.3 Phasendiagramme von Lipidsystemen

Gewöhnlich lassen sich Phasendiagramme von Lipidsystemen mittels der Überlegungen zu den regulären Lösungen besser beschreiben, als mit einem idealen Verhalten. Jedoch wird in der Theorie der regulären Lösung nicht berücksichtigt, dass die Wechselwirkungsenergien zwischen gelförmigen und fluiden Molekülen endlich sein können.

Ein Problem ist auch, dass oftmals keine Phasenseparation stattfindet, da Umwandlungen in realen Lipidsystemen oftmals nicht 1. Ordnung sind. Die Ermittlung eines Phasendiagramms ist somit aus theoretischer Sicht nicht immer möglich. Es ist aber üblich für Lipidsysteme trotzdem Phasendiagramme zu bestimmen. Die Vorgehensweise soll im Weiteren kurz erläutert werden, da im Verlaufe dieser Arbeit das Phasendiagramm des DMPC:DSPC Lipidsystems vorgestellt wird (Kapitel 4).

Zunächst werden für verschiedene Mischungsverhältnisse Wärmekapazitätsprofile gemessen. Die Wärmekapazitätskurven zeigen bei einem zweikomponentigen System bis zu zwei Maxima, wie dies am Beispiel einer äquimolaren DMPC:DSPC Mischung (Abb. 2.4) zu erkennen ist. An die Flanken der Kurven werden dann Tangenten eingezeichnet, die die Abzisse bei den Temperaturen T_1 und T_2 schneiden. Diese beiden Temperaturen bilden die Temperaturgrenzen des Phasendiagramms. Dies ist eine Hilfskonstruktion, die sich aus dem Wärmekapazitätsprofil einer regulären Lösung ableitet. Wärmekapazitätsprofile regulärer Lösungen zeigen scharf definierte Temperaturen, bei denen die Umwandlung beginnt bzw. abgeschlossen ist. Oftmals ist in zu Lipidsystemen gehörenden Wärmekapazitätsprofilen eine exakte Bestimmung der Tangenten nicht möglich.

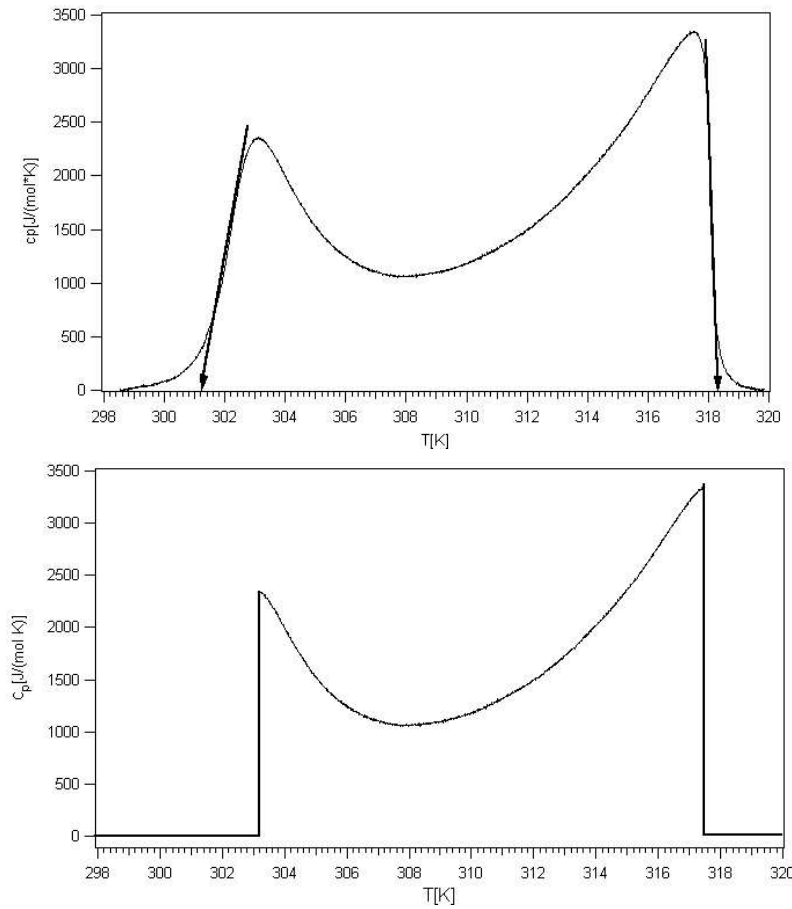


Abbildung 2.4: Oben: Ein mittels DSC (siehe Abschnitt 3.1) gemessenes Wärmekapazitätsprofil einer DMPC:DSPC 50:50 Mischung. Die Tangenten schneiden die Abzisse bei den Temperaturen 301.2 K und 318.4 K. Unten: Ein Wärmekapazitätsprofil, wie es sich für eine reguläre Lösung ergeben würde. Die Umwandlung beginnt bei einer scharf definierten Temperatur und ist auch bei einer scharf definierten Temperatur beendet.

2.3 Isingmodell eines zweikomponentigen Lipidsystems

2.3.1 Einführung

In der Literatur sind neben analytischen Molekularfeldtheorien¹⁰ numerische Methoden der statistischen Thermodynamik zu finden, mit deren Hilfe das

¹⁰ In Molekularfeldtheorien wird ein Teilchen des Systems betrachtet und dessen Nachbarn wird die Rolle zugewiesen, ein durchschnittliches molekulares Feld zu bewirken (z.B. [47, 55]).

Verhalten von Modellmembranen mit oder ohne Einbringung von Proteinen, Peptiden oder Ähnlichem beschrieben werden. Insbesondere haben sich hierbei Monte Carlo Simulationen als erfolgreich erwiesen. Diese haben gegenüber Molekularfeldtheorien den Vorteil, dass sie nicht nur Phasendiagramme beschreiben können, sondern z.B. auch Enthalpie- und Volumenfluktuationen. Ebenfalls enthalten sie Informationen über die laterale Anordnung der Lipide, d.h. über etwaige Domänenbildungen (z.B. [26, 50, 54, 79, 80]). Unter diesen Monte Carlo Simulationen sind verschiedenste Ansätze publiziert. Dies geht von Isingmodellen¹¹, in denen lediglich zwei Zustände der Lipide bzw. deren Ketten angenommen werden [31, 36], bis zu dem Pink Modell, bei dem nicht nur die all-trans und die fluide Konfiguration, sondern acht weitere intermediäre Zustände angenommen werden können [11, 56, 14]. Es existieren sowohl Gittertheorien [26, 36] als auch Nicht-Gittermodelle [53, 57].

Der große Vorteil von Isingmodellen liegt in deren Einfachheit. Obwohl relativ wenig Informationen für deren Modellierung benötigt werden, erlauben sie eine gute Beschreibung der Physik einfacher Lipidsysteme.

In dieser Arbeit wird ein Isingmodell zur Beschreibung eines DMPC:DSPC Lipidsystems vorgestellt. Dieses Modell wurde von Sugár et al. [79, 80] gearbeitet und deren Ergebnisse [50, 79, 80, 51] werden bestätigt und diskutiert (siehe Kapitel 4). Im Weiteren soll eine Modifizierung des Modells zur Beschreibung von Diffusionsprozessen genutzt werden. Insbesondere sollen hierbei Unterschiede in den Diffusionsprozessen in Abhängigkeit verschiedener Bereiche des Phasendiagramms des DMPC:DSPC Lipidsystemes charakterisiert werden (siehe Kapitel 5).

2.3.2 Modellierung des DMPC:DSPC Modellsystems

In dem hier zugrunde liegenden Modell wird wie oben bereits erwähnt, ein Isingmodell angewendet. Die Fettsäureketten der Lipide werden als geordnet (gel) oder ungeordnet (fluid) angenommen und werden auf einem Dreiecksgitter angeordnet. Die hexagonale Anordnung wird aufgrund von Ergebnissen aus Röntgenbeugungsexperimenten gewählt [35]. Bei niedrigen Temperaturen liegt eine „solid ordered“ Anordnung vor, bei der die gelförmigen Ketten auf einem Dreiecksgitter positioniert sind. Bei hohen Temperaturen geht die Gitterordnung verloren und die Lipidketten sind ungeordnet. Es wird dann

¹¹ Ursprünglich kommt das Isingmodell aus der Festkörperphysik, wo es zur Beschreibung von Ferromagneten von Ising herangezogen wurde [34]. Die magnetischen Dipole werden dabei bzgl. der Quantisierungsachse als „up“ oder „down“ angenommen. Parallel und antiparallel angeordnete Dipole tragen unterschiedlich zur Gesamtenergie bei. Eine parallele Ausrichtung bewirkt einen Wechselwirkungsenergiebeitrag von $-W$ und antiparallele Dipole wechselwirken mit einer Energie von $+W$.

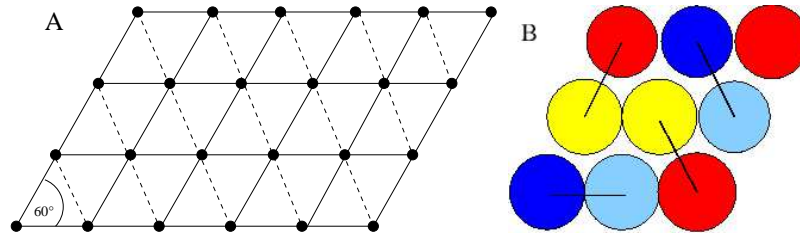


Abbildung 2.5: A: Darstellung eines hexagonalen Gitters. Die Punkte stellen die Gitterplätze der Lipidketten dar. B: Die unterschiedlichen Farben repräsentieren die verschiedenen Lipidspezies und deren Zustände. Die schwarzen Linien kennzeichnen die chemischen Bindungen der beiden zu einem Lipid gehörenden Ketten.

von „liquid disordered“ gesprochen.

Es werden periodische Randbedingungen gewählt. Lipidketten, die rechts aus der Matrix hinauswandern, kommen wieder von links in sie hinein und umgekehrt. Ähnlich verhält es sich für Lipidketten, die die Matrix oben oder unten verlassen. Jede Kette besitzt sechs nächste Nachbarn, d.h. die Koordinationsnummer beträgt $z = 6$. Die Wechselwirkungen einer jeden Kette mit diesen Nachbarn werden berücksichtigt. Mit diesen Annahmen können erste Aussagen über die Energien des Systems getroffen werden.

Sei N die Anzahl aller Ketten, N_i die Anzahl der Ketten von Lipidspezies $i = 1$ (DMPC) bzw. $i = 2$ (DSPC). Weiterhin werden die Größen N_i^m benötigt, die angeben, wieviele Ketten der Spezies i im Zustand m , mit $m = g$ (gelförmig) oder $m = l$ (fluid), sind. Die Variablen N^m seien die Anzahl an fluiden ($m = l$) oder gelförmigen ($m = g$) Ketten. Ebenfalls gelten die folgenden Beziehungen:

$$\begin{aligned}
 N &= N_1 + N_2 \\
 N &= N^g + N^l \\
 N_1 &= N_1^g + N_1^l \\
 N_2 &= N_2^g + N_2^l
 \end{aligned} \tag{2.39}$$

Die Zahl an nächsten Nachbarn von Lipidketten der Spezies i und j in den Zuständen m und n sei als N_{ij}^{mn} gegeben. Dann gelten die Beziehungen der

Gleichungen (2.40) und (2.41):

$$\begin{aligned} \frac{z}{2}N &= N_{11}^{gg} + N_{11}^{gl} + N_{11}^{ll} + N_{12}^{gg} + N_{12}^{gl} + N_{12}^{lg} + N_{12}^{ll} \\ &\quad + N_{22}^{gg} + N_{22}^{gl} + N_{22}^{ll} \end{aligned} \quad (2.40)$$

$$zN_i^m = 2 \cdot N_{ii}^{mm} + N_{ii}^{mn} + N_{ij}^{mm} + N_{ij}^{mn}, \quad (2.41)$$

wobei $i, j \in \{1, 2\}$, ($i \neq j$) und $m, n \in \{g, l\}$, ($n \neq m$) gelten.

(E_i^m) sind als die Energien definiert, die eine Lipidkette der Spezies i im Zustand m besitzt. Die Wechselwirkungsenergien zwischen den Lipidketten der Spezies i und j in den Zuständen m und n werden mit (E_{ij}^{mn}) gekennzeichnet. Für eine Matrixkonfiguration \mathbf{S} , die angibt, an welchem Ort sich ein Lipid in welchem Zustand befindet, ergibt sich eine Energie von:

$$E(\mathbf{S}) = \sum_{i=1}^2 \sum_{m=g}^l E_i^m N_i^m + \sum_{m=g}^l \sum_{n=g}^l \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 E_{ij}^{mn} N_{ij}^{mn}. \quad (2.42)$$

Die Energien E_i^m sind unabhängig von Ort und Orientierung der Rotationsisomere in den Lipidketten, so dass Entartungen der Energielevel anzugeben sind, die mit f_i^m gekennzeichnet werden. Für die Wechselwirkungsenergien E_{ij}^{mn} gilt Analoges und sie sind ebenfalls konstant. Wegen der verschiedenen Möglichkeiten der Orientierung und des Ortes der Rotationsisomere, sind die Entartungen f_{ij}^{mn} zu berücksichtigen.

Bei einer festen Matrixkonfiguration \mathbf{S} ergibt sich die Gesamtentartung zu:

$$f(\mathbf{S}) = \prod_{i=1}^2 \prod_{m=g}^l (f_i^m)^{N_i^m} \cdot \prod_{m=g}^l \prod_{n=g}^l \prod_{i=1}^2 \prod_{j=1}^2 (f_{ij}^{mn})^{N_{ij}^{mn}}. \quad (2.43)$$

Die Wahrscheinlichkeit, eine bestimmte Konfiguration \mathbf{S} aufzufinden, ist aus der statistischen Physik bekannt [10] und beträgt

$$p(\mathbf{S}) = \frac{f(\mathbf{S}) \cdot e^{-\frac{E(\mathbf{S})}{k_B T}}}{Q(N_1, N_2, T, V)}. \quad (2.44)$$

Hierbei bezeichnen k_B die Boltzmannkonstante, T die Temperatur und $Q(N_1, N_2, T, V)$ die Zustandsfunktion des kanonischen Ensembles. Durch Substitution von $\chi(\mathbf{S}) = E(\mathbf{S}) - k_B T \ln f(\mathbf{S})$ ergibt sich für die Wahrscheinlichkeit eine gegebene Konfiguration vorzufinden ein vereinfachter Ausdruck von:

$$p(\mathbf{S}) = \frac{e^{-\frac{\chi(\mathbf{S})}{k_B T}}}{Q(N_1, N_2, T, V)}. \quad (2.45)$$

Die Funktion $\chi(\mathbf{S})$ hängt sowohl von konfigurationsabhängigen (z.B. N_{11}^{gl}) als auch von nichtkonfigurationsabhängigen Größen (z.B. N_1) ab. Durch Verwendung der Formeln (2.40) bis (2.43) kann die Funktion als Summe der konfigurationsabhängigen und nichtkonfigurationsabhängigen Größen dargestellt werden. Eine algebraische Rechnung [79] führt auf:

$$\chi(\mathbf{S}) = \chi_{const.}(\mathbf{S}) + \chi_{conf.}(\mathbf{S}), \quad (2.46)$$

mit

$$\begin{aligned} \chi_{const.}(\mathbf{S}) &= N_1 \{ (E_1^g - kT \ln f_1^g) + \frac{z}{2} (E_{11}^{gg} - kT \ln f_{11}^{gg}) \} \\ &+ N_2 \{ (E_2^g - kT \ln f_2^g) + \frac{z}{2} (E_{22}^{gg} - kT \ln f_{22}^{gg}) \} \end{aligned}$$

und

$$\begin{aligned} \chi_{conf.}(\mathbf{S}) &= N_1^l (\Delta H_1 - T \Delta S_1) + N_2^l (\Delta H_2 - T \Delta S_2) \\ &+ N_{11}^{gl} \omega_{11}^{gl} + N_{12}^{gg} \omega_{12}^{gg} + N_{12}^{gl} \omega_{12}^{gl} \\ &+ N_{12}^{ll} \omega_{12}^{ll} + N_{12}^{lg} \omega_{12}^{lg} + N_{22}^{gl} \omega_{22}^{gl}, \end{aligned} \quad (2.47)$$

wobei die folgenden Definitionen vorgenommen sind:

$$\Delta H_i = \{ E_i^l + \frac{z}{2} E_{ii}^{ll} \} - \{ E_i^g + \frac{z}{2} E_{ii}^{gg} \}, \quad (2.48)$$

$$\Delta S_i = k_B \ln f_i^l - k_B \ln f_i^g - \frac{z}{2} k_B \ln \left(\frac{f_{ii}^{gg}}{f_{ii}^{ll}} \right), \quad (2.49)$$

$$\omega_{ij}^{mn} = \left[E_{ij}^{mn} - \frac{E_{ii}^{mm} + E_{jj}^{nn}}{2} \right] - k_B T \ln \frac{f_{ij}^{mn}}{\sqrt{f_{ii}^{mm} f_{jj}^{nn}}}. \quad (2.50)$$

Für die weitere Modellierung des Systems sind lediglich die konfigurationsabhängigen Energie- und Entropiegrößen von Bedeutung. Dies bedeutet, dass das gesamte Lipidsystem durch zehn zu bestimmende Parameter beschrieben wird. Dies sind jeweils zwei Enthalpie- und zwei Entropieänderungen vom gelförmigen zum fluiden Zustand und sechs Wechselwirkungsparameter. All diese können aus kalorimetrischen Experimenten gewonnen werden. Wie dies geschieht, soll Gegenstand des nächsten Abschnitts sein.

2.3.3 Bestimmung der Modellparameter

Aus den Wärmekapazitätsprofilen der entsprechenden einkomponentigen Lipidmembranen (hier DMPC und DSPC), welche durch DSC-Experimente (siehe Abschnitt 3.1) ermittelt werden, lassen sich die Enthalpieänderungen

der Hauptumwandlung¹² der entsprechenden Kurven als das Integral über die erhaltene Wärmekapazitätskurve ermitteln (siehe Abb. 2.6).

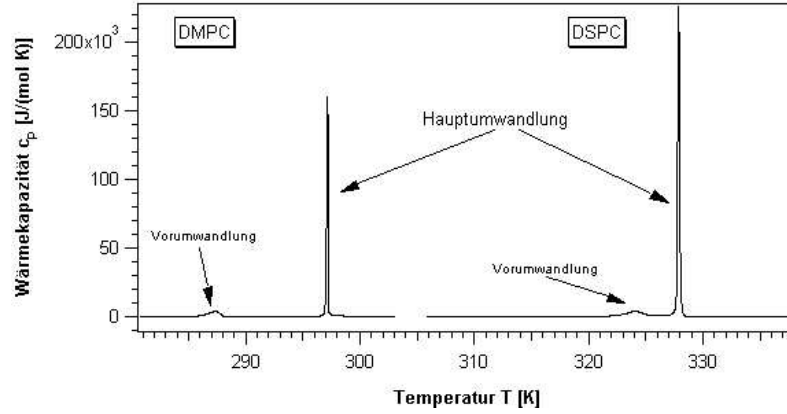


Abbildung 2.6: Wärmekapazitätsprofil einer reinen DMPC- und einer reinen DSPC-Membran. Es sind sowohl die Vor- als auch die Hauptumwandlungen abgebildet. Die Hauptumwandlung geht bei den DMPC-Lipiden mit einer Enthalpieänderung von $\Delta H_{DMPC} = 26342 \frac{\text{J}}{\text{mol} \cdot \text{K}}$ einher. Der Mittelpunkt der Umwandlung liegt bei einer Temperatur von $T_{DMPC} = 297 \text{ K}$. Die Enthalpieänderung der DSPC-Lipide beträgt $\Delta H_{DSPC} = 50740 \frac{\text{J}}{\text{mol} \cdot \text{K}}$ pro Lipid und bei einer Temperatur von $T_{DSPC} = 327.9 \text{ K}$ sind die Hälfte der Lipide geschmolzen.

Ebenfalls lassen sich die Umwandlungstemperaturen aus dem Graphen herauslesen. Bei dieser Temperatur, bei der die Wärmekapazität ihren maximalen Wert annimmt, befindet sich die Gibbs'sche freie Enthalpie in ihrem Minimum, so dass

$$\Delta G_i(T_{m_i}) = \Delta H_i - T_{m_i} \Delta S_i = 0 \quad (2.51)$$

gilt. Daraus folgt sofort, dass die Entropieänderung von der Umwandlungstemperatur T_{m_i} und der Enthalpieänderung abhängt:

$$\Delta S_i = \frac{\Delta H_i}{T_{m_i}}. \quad (2.52)$$

¹² Die in Abb. 2.6 gezeigten Wärmekapazitätsprofile zeigen zwei Peaks. Der erste Peak wird als die Vor- und der zweite größte Peak als Hauptumwandlung bezeichnet. Hierauf wird in Abschnitt 4.5.3 eingegangen.

Die verbleibenden Wechselwirkungsparameter können nicht direkt aus den Wärmekapazitätsprofilen ermittelt werden, sondern müssen durch „intelligentes“ Raten bestimmt werden. Hierfür müssen die theoretischen (siehe Abschnitt 2.3.6) an die experimentellen Profile angepasst werden.

Die Werte der Parameter sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Parameter	$\frac{\text{cal}}{\text{mol.Kette}}$	Parameter	$\frac{\text{cal}}{\text{mol.Kette}}$
ΔH_1	3146.5	ΔS_1	10.59
ΔH_2	6063.6	ΔS_2	18.49
ω_{11}^{gl}	323.45		
ω_{22}^{gl}	352.32		
ω_{12}^{gg}	155		
ω_{12}^{ll}	70		
ω_{12}^{gl}	370		
ω_{12}^{lg}	410		

Tabelle 2.1: Die Parameter, die in das Modell hineinfließen, sind so gewählt, dass damit das DMPC:DSPC Lipidsystem beschrieben werden kann.

2.3.4 Die Elementarschritte: Zustandsänderungen und Diffusion

Bei einer Monte Carlo Simulation müssen Elementarschritte, die zur Definition des Monte Carlo Zyklus benötigt werden (siehe dazu die Abschnitte 2.3.5, 3.1.3 und 3.2.4), definiert werden. Hier sind dies Zustandsänderungen, Lipidaustausche und Rotationen.

In dem Isingmodell können die Ketten in einem geordneten oder ungeordneten Zustand vorkommen. Es besteht die Möglichkeit, dass eine gelförmige Kette in den fluiden Zustand übergeht oder eine Umwandlung von einer fluiden in eine gelförmige Kette ist möglich. Dies definiert die Zustandsänderungen.

Ziel dieser Arbeit ist die theoretische Beschreibung von Diffusionsprozessen in dem DMPC:DSPC Modellsystem. Um Dynamik in das System zu integrieren, gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten, die miteinander kombiniert werden sollen. Zum Einen ist das der Austausch zweier Lipide, d.h. der vier dazugehörigen Ketten und zum Anderen eine Rotation zweier Lipide (Abb. 2.7). Eine Rotation kann nur dann stattfinden, wenn die beiden Lipide derart orientiert sind, dass sie einen Rhombus formen.

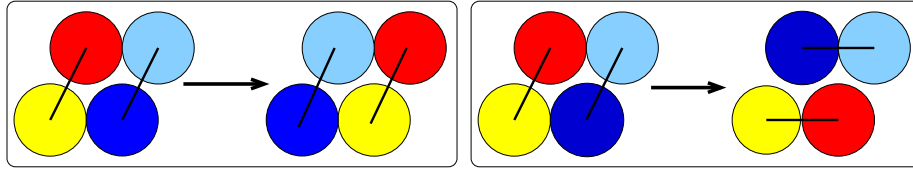


Abbildung 2.7: *Links: Der prinzipielle Austausch zweier Lipide bzw. der vier dazugehörigen Ketten. Rechts: Schematische Darstellung einer Rotation um $\pm 60^\circ$ zweier Lipide.*

2.3.5 Die Monte Carlo Simulation

Das eingeführte Modell soll mittels einer Monte Carlo Simulation weiter beschrieben werden. Hierbei wird wie bei Metropolis et al. [49] von einem kanonischen Ensemble ausgegangen. Bei dieser Art von Simulation wird das System von einem Anfangszustand in den Gleichgewichtszustand gebracht. Hierbei werden die Methoden von Glauber [23], Doniach [16] und Kawasaki [38] verwendet¹³.

Der Algorithmus verläuft nach folgendem Schema:

- Zunächst wird von der bestehenden Matrixkonfiguration \mathbf{S}_1 ausgehend eine Versuchskonfiguration \mathbf{S}_2 mit den konfigurationsabhängigen Systemenergien $\chi_{conf.}(\mathbf{S}_1)$ und $\chi_{conf.}(\mathbf{S}_2)$ gewählt.
- Daraus kann die Energiedifferenz $\Delta G = \chi_{conf.}(\mathbf{S}_2) - \chi_{conf.}(\mathbf{S}_1)$ gebildet werden.
- Ein Boltzmannfaktor wird anschließend berechnet:

$$K = e^{-\frac{\Delta G}{k_B T}}. \quad (2.53)$$

- Mit dem errechneten Boltzmannfaktor K kann eine Wahrscheinlichkeit $P = \frac{K}{1+K}$ bestimmt werden.
- Mit einem Verfahren nach L'Ecuyer [42, 58] wird eine Zufallszahl¹⁴ RAN ermittelt.

¹³ Alle drei Veröffentlichungen beschäftigten sich mit dem Isingmodell. Bei der Methode von Glauber hängt die Übergangswahrscheinlichkeit eines Lipids von einem Zustand in einen anderen von den benachbarten Teilchen ab. Doniach beschrieb Schmelzumwandlungen von Lipiden und damit einhergehenden Effekten mit einem Zweizustandsmodell. In der Arbeit von Kawasaki wird der Austausch zweier benachbarter Teilchen erlaubt.

¹⁴ Streng genommen handelt es sich hierbei um Pseudozufallszahlen. Bei dem hier verwendeten Algorithmus wiederholt sich mit einer einzigen Initialisierung nach dem Erreichen von ungefähr $2.3 \cdot 10^{18}$ Zahlen die bereits herausgegebene Zahlenfolge, die aber von der Initialisierung abhängt.

- Gilt $RAN \leq P$ wird die Versuchskonfiguration als die neue angenommen. Ist $RAN > P$ wird die alte Konfiguration beibehalten.

Um diesen Algorithmus auf das beschriebene Problem anzuwenden ist es notwendig einen Monte Carlo Zyklus zu definieren. Dieser beschreibt, wie die unterschiedlichen Elementarschritte, die zu einer Konfigurationsänderung führen, durchlaufen werden sollen. Die Definition der Zyklen erfolgt in den Abschnitten 3.1.3 und 3.2.4.

2.3.6 Theoretische Bestimmung von Wärmekapazitäten

Mit dem vorgestellten Modell lassen sich Wärmekapazitätsprofile verschiedener Lipidkompositionen berechnen und mit experimentellen Daten vergleichen. Die Berechnung der Wärmekapazitätskurven ist hierbei mit zwei Methoden möglich. Bei der einen Methode wird der Mittelwert der Enthalpie¹⁵ ($\langle H \rangle$) nach der Temperatur partiell differenziert [10]:

$$c_p = \left(\frac{\partial \langle H \rangle}{\partial T} \right)_p . \quad (2.54)$$

Die zweite Methode nutzt das sogenannte Fluktuations–Dissipations Theorem [33]. Dieses Theorem besagt, dass die Fluktuationen der Enthalpie im Gleichgewicht bei einer Temperatur ein Maß für die Wärmekapazität sind:

$$c_p = \frac{\langle H^2 \rangle - \langle H \rangle^2}{RT^2} , \quad (2.55)$$

wobei $\langle H^2 \rangle$ die mittlere quadratische Enthalpie, $\langle H \rangle$ die mittlere Enthalpie, R die ideale Gaskonstante und T die Temperatur sind.

Beide Methoden sollten zu einem ähnlichen Wärmekapazitätsprofil führen.

¹⁵ Dieser Mittelwert berechnet sich aus den Fluktuationen der Enthalpie.

Kapitel 3

Materialien und Methoden

3.1 Differentialkalorimetrie

Die Bestimmung experimenteller Wärmekapazitätsprofile dient in dieser Arbeit der Ermittlung der zehn Modellparameter (Abschnitt 2.3.3) und dem Vergleich der theoretischen mit den experimentellen Wärmekapazitätskurven. Die Messungen sind von T. Schlötzer durchgeführt worden [72]. Trotzdem soll erläutert werden wie die Differentialkalorimetrie prinzipiell funktioniert und wie die Messproben vorbereitet werden müssen. Weiterhin wird auf den genauen Ablauf der Monte Carlo Simulationen eingegangen.

3.1.1 Einführung in die Differentialkalorimetrie

Mittels kalorimetrischer Methoden lassen sich endotherme sowie exotherme Effekte unterschiedlichster Materialien bestimmen. Unter anderem lassen sich auch biologische Materialien untersuchen. So geht z.B. die Proteindenaturierung mit einer Veränderung der Wärmekapazität einher. Es lassen sich aber auch biologische Membranen und Modellmembranen mit dieser Methode untersuchen. Wärmekapazitätsprofile, die mittels Differentialkalorimetrie bestimmt werden, enthalten z.B. Informationen über Umwandlungsenthalpien und -entropien. In dieser Arbeit werden Ergebnisse solcher kalorimetrischen Messungen präsentiert, welche mit einem Differentialkalorimeter (VP-DSC¹) der Firma Microcal (Northhampton/MA, USA) durchgeführt wurden. Die Messungen wurden von T. Schlötzer durchgeführt. Die Ergebnisse wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt [72].

Differentialkalorimeter bestehen aus zwei befüllbaren Zellen, die mittels eines adiabatischen Schildes von der Umgebung abgeschirmt werden. Eine schema-

¹ DSC: Differential Scanning Calorimeter

tische Zeichnung eines solchen Kalorimeters ist in Abb. 3.1 gezeigt.

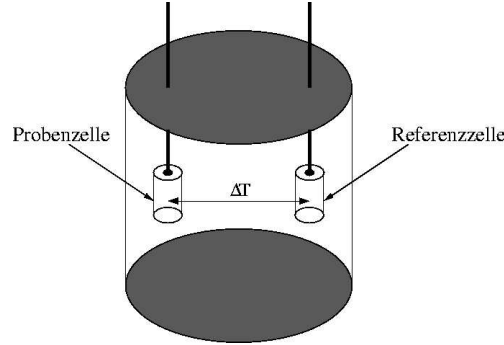


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung eines Differentialkalorimeters. Eine Zelle wird mit der Proben- und die andere Zelle mit der Referenzsubstanz gefüllt.

Die beiden Zellen, die eine mit der Probensubstanz (Probenzelle) und die andere mit einer Referenzsubstanz (Referenzzelle) gefüllt, werden auf der gleichen Temperatur gehalten. Wird die Temperatur mit einer konstanten Heizrate ($\Delta T/\Delta t$; mit Δt ist die Zeitdifferenz) geändert, so hängen die dafür aufzubringenden Leistungen P_{Probe} und $P_{Referenz}$ davon ab, ob in den Zellen Prozesse ablaufen, die Wärmezufuhr oder Wärmeabfuhr bedürfen. Es ergibt sich eine Leistungsdifferenz von $\Delta P = P_{Probe} - P_{Referenz}$ aus der sich die Wärmekapazität berechnen lässt.

Für die Wärmedifferenz ΔQ gilt für kleine Δt :

$$\Delta Q = \int_t^{t+\Delta t} \Delta P dt \approx \Delta P \Delta t. \quad (3.1)$$

Aus der Thermodynamik ist der Zusammenhang zwischen einer Wärmedifferenz und einer Wärmekapazitätsdifferenz Δc_p bei konstantem Druck p bekannt. Division der Wärmedifferenz ΔQ durch die Temperaturdifferenz ist gleich der gesuchten Größe:

$$\left(\frac{dH}{dT} \right)_p = \Delta c_p = \left(\frac{\partial Q}{\partial T} \right)_p \approx \frac{\Delta Q}{\Delta T} \approx \frac{\Delta P}{\frac{\Delta T}{\Delta t}}, \quad (3.2)$$

hierbei ist H die Enthalpie.

3.1.2 Probenpräparation und Durchführung

Die verwendeten Lipide wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster/AL, USA) gekauft. Dies sind *1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine*

(DMPC) und *1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine* (DSPC). Zunächst werden die DMPC- und DSPC-Lipide getrennt in einem organischen Lösungsmittel (Dichloromethan: Methanol 2 : 1) gelöst, so dass die Konzentrationen der Lipide 10 mM betragen. Mit diesen 10 mM Lösungen lassen sich die Lipidmischungen in den entsprechenden Verhältnissen herstellen. Durch den hohen Dampfdruck des organischen Lösungsmittels verdampft dieses, was durch einen auf die Lösung gerichteten Stickstoffstrom beschleunigt wird. Um sicher zu gehen, dass sämtliche Dichloromethan- und Methanol-Moleküle aus der Lipidmischung entfernt werden, werden die Proben für mehrere Stunden in einem Exsikkator, an den eine Vakuumpumpe angeschlossen ist, aufbewahrt.

Im Anschluss daran werden die getrockneten Lipidmischungen in einem 1 mM *Ethylen-diamin-tetraessigsäure-diamoniumsalz* (EDTA), 5 mM *2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-etan-sulfonsäure* (HEPES) Puffer (pH= 7.4) gelöst, so dass sich eine Lipidkonzentration von 10 mM einstellt. Das EDTA bindet die Lösung verunreinigendes Kalzium, das durch Wechselwirkungen mit den Lipiden die Messung verfälschen würde. EDTA wurde von der Firma Fluka (Buchs, Schweiz) und HEPES von Sigma-Aldrich (St. Louis/MO, USA) gekauft.

3.1.3 Monte Carlo Rechnungen zur Ermittlung der Wärmekapazitätskurven

Das vorgestellte Modell soll unter anderem zur Berechnung von Wärmekapazitätsprofilen und zur Bestimmung des DMPC:DSPC Phasendiagramms genutzt werden. Aus der Vorstellung des Modells ist bekannt, dass die Berechnungen auf einem hexagonalen Gitter der Größe $M \times M$ ($M \in \{2n : n \in \mathbb{N}\}$) durchgeführt werden. Zu Beginn einer jeden Berechnung muss die Matrix initialisiert werden. Zunächst werden die Gitterpunkte vollständig mit der Spezies bedeckt, deren Anteil höher ist. Im Fall einer äquimolaren DMPC:DSPC Mischung wird DMPC gewählt. Da DMPC- und DSPC-Lipide jeweils zwei Lipidketten besitzen, sind in beiden Fällen zwei Ketten als miteinander verbunden zu definieren. Sind die Gitterplätze durch (x, y) mit $x, y \in \{n \in \mathbb{N}\}$ gekennzeichnet, werden die Gitterplätze (x, y) und $(x+1, y)$ ($x \in \{2n+1 | n \in \mathbb{N}_0\}$) als die chemischen Nachbarn gewählt. Im Anschluss daran müssen die Lipidketten der verbleibenden Spezies auf der Matrix verteilt werden. Ein Gitterplatz wird zufällig gewählt und mit der neuen Spezies bedeckt, wenn dieser mit einer Kette der als erstes verteilten Spezies besetzt ist. Der chemische Nachbar wird dann ebenso geändert. Dies wird so oft durchgeführt, bis das vorgegebene Verhältnis von DMPC- zu DSPC-Ketten erreicht ist. Ob die

Ketten sich im gelförmigen oder fluiden Zustand befinden, wird über eine Zufallsabfrage bestimmt. Ein Boltzmannfaktor mit einer Energieänderung von $\Delta G_i = \Delta H_i - T\Delta S_i$ wird gebildet:

$$K = \exp - \frac{\Delta G_i}{RT}, \quad (3.3)$$

wobei ΔH_i der Enthalpieunterschied, ΔS_i der Entropieunterschied von einem gelförmigen zu fluiden Zustand der Spezies i und T die Temperatur sind. Die Kette wird in ihrem fluiden Zustand angenommen, falls $P = \frac{K}{1+K} > RAN$ ist. RAN ist hierbei eine Zufallszahl. Ansonsten wird die Kette in ihren gelförmigen Zustand gesetzt.

Nach der Initialisierung muss das System in das thermodynamische Gleichgewicht gebracht werden. Das in Abschnitt (2.3.5) eingeführte Verfahren findet hierbei Anwendung. Dabei ist festzulegen, in welcher Reihenfolge die Zustandsänderungen von gelförmigen zu fluiden Lipiden oder umgekehrt, der Austausch von Lipiden und die Rotation durchlaufen werden sollen, was den Monte Carlo Zyklus definiert. Zunächst wird $M \times M$ -mal ein Gitterplatz zufällig ausgewählt und abgefragt, ob der Zustand der darauf sitzenden Kette verändert werden soll; im Schnitt wird jede Kette einmal pro Zyklus auf eine Zustandsänderung überprüft. Im Anschluss daran werden $M \times M$ -mal zwei Lipide zufällig ausgesucht und gefragt, ob die betroffenen vier Ketten ihre Plätze tauschen sollen (Lipidaustausch). Während des Equilibrierens müssen die beiden Lipide nicht miteinander benachbart sein, sondern Austausch weit entfernter Lipide sind erlaubt. Dies führt zu keinen Fehlern, da es bei einer Monte Carlo Simulation darum geht, den Gleichgewichtszustand zu finden. Dabei ist es egal, wie dieser Gleichgewichtszustand erreicht wird. Zum Schluss eines Zykluses werden $M \times M$ -mal zwei benachbarte Lipide gewählt und geprüft, ob diese ihre Orientierungen um $\pm 60^\circ$ ändern sollen. Nachdem das System ins Gleichgewicht gefunden hat, werden die Simulationen im Gleichgewicht fortgeführt. Hier liegt ein Unterschied zum Monte Carlo Zyklus des Equilibrierens vor, da während der Gleichgewichtsrechnungen nur noch benachbarte Lipide ausgetauscht werden dürfen.

Jede spezielle Matrixkonfiguration, d.h. die Art und Weise wie die Lipidketten auf dem hexagonalen Gitter angeordnet sind und in welchem Zustand sie sich befinden, besitzt eine bestimmte Enthalpie. Diese lässt sich nach Abschn. 2.3.2 in einen konfigurationsabhängigen und einen konfigurationsunabhängigen Anteil aufspalten. Der konfigurationsabhängige Enthalpiewert wird nach Durchlauf eines jeden Zykluses berechnet und ebenfalls wird die Anzahl an fluiden Lipidketten insgesamt und nach den beiden Spezies aufgeteilt gezählt. Die konfigurationsabhängige Enthalpie und deren Quadrat werden nach Beendigung eines jeden Zykluses bestimmt und aufaddiert, so

dass nach Durchlauf aller Zyklen die Mittelwerte ermittelt werden können und über das Fluktuations–Dissipationstheorem (siehe Gleichung 2.55) der Wärmekapazitätswert berechnet werden kann. Je höher die Anzahl der Zyklen über die gemittelt wird ist, desto genauer sind die berechneten Mittelwerte und damit auch der Wert der Wärmekapazität.

Aufgrund endlicher Prozessor–Geschwindigkeit ist es jedoch notwendig, die Anzahl an Zyklen zu begrenzen. Die Fluktuationen des Systems hängen von der Temperatur ab (siehe Kapitel 4), so dass in Abhängigkeit der Temperatur unterschiedliche Zyklenzahlen gewählt werden können. Um die Umwandlung herum sind die Fluktuationen am langsamsten, so dass um die Wärmekapazitätsmaxima die Zyklenzahlen am größten gewählt werden müssen. In einem Temperaturbereich von ± 4 K um die Wärmekapazitätsmaxima² werden 10^4 Zyklen zum Equilibrieren und $6 \cdot 10^4$ Zyklen während der Gleichgewichtssimulationen verwendet. In Temperaturbereichen die zwischen den Extremwerten liegen, werden 7500 und $5 \cdot 10^4$ Zyklen genutzt. Für die verbleibenden Temperaturen werden anfangs 7500 und anschließend $3.5 \cdot 10^4$ Zyklen durchlaufen. Ein weiterer kritischer Punkt der Simulationen ist die Matrixgröße. Eine minimale Größe ist erforderlich, ab der eine weitere Vergrößerung der Matrix nur noch geringe Veränderungen der Wärmekapazitätskurven bewirkt. Dies ist die sogenannte „finite size“ Skalierung. Sie macht darüber eine Aussage, wie groß das System gewählt werden muss, um damit experimentell beobachtbare Größen gut beschreiben zu können. Sugár et al. haben in ihrer Arbeit solche Mindestgrößen angegeben [79]. Es werden jedoch größere Matrizen als notwendig gewählt [79]. Für die DMPC:DSPC–Mischungsverhältnisse 70 : 30, 60 : 40, 50 : 50, 40 : 60 und 30 : 70 wird eine 60×60 –Matrix genutzt. Für die Verhältnisse 90 : 10, 80 : 20, 20 : 80 und 10 : 90 ist eine Größe von 100×100 festgelegt.

3.2 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

In der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) werden Korrelationen von gemessenen Fluoreszenzintensitätsfluktuationen zur Bestimmung von zeitabhängigen Prozessen genutzt [20, 46]. Unter anderem lassen sich Diffusionsprozesse beobachten und analysieren [5, 46]. In dieser Arbeit soll die FCS zum Studium der lateralen Diffusion in dem DMPC:DSPC Lipidsystem genutzt werden. Zu Beginn dieses Abschnitts gibt es eine Einführung in die FCS und das dahinter stehende mathematische Konzept wird vorgestellt. Danach

² Da es sich um ein zweikomponentiges Lipidsystem handelt, ergeben sich je nach Mischungsverhältnis bis zu zwei Wärmekapazitätsmaxima.

werden sowohl die experimentellen als auch die theoretischen Verfahren vorgestellt.

3.2.1 Einführung in die FCS

In der FCS werden fluoreszierende Marker, die sich in einem Laserfokus befinden, durch das Laserlicht einer Wellenlänge λ_l angeregt, so dass sie nach einer Zeit τ_f Photonen der Wellenlänge λ_f mit $\lambda_l < \lambda_f$ emittieren. Dies führt zu einem Signal $F(t)$, das über die Zeit verfolgt werden kann. Eine Autokorrelation dieses Fluoreszenzsignals führt auf:

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}, \quad (3.4)$$

wobei $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$ die Schwankung des Signals zur Zeit t um den Intensitätsmittelwert $\langle F(t) \rangle$ darstellt.

Aus Gleichung (3.4) ist zu erkennen, dass es physikalisch keinen Unterschied macht, ob das Signal selbst oder dessen Fluktuationen miteinander korreliert werden. Das Ergebnis unterscheidet sich lediglich um einen additiven Term von Eins.

Im Folgenden werden deshalb nur die Intensitätsfluktuationen betrachtet und die Korrelationsfunktion $G_{fluct}(\tau)$ mit

$$G_{fluct}(\tau) = G(\tau) - 1 = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (3.5)$$

wird berechnet. Die Normierung durch den quadrierten Mittelwert $\langle F(t) \rangle$ ist zunächst einmal als willkürlich anzusehen, erweist sich aber weiter unten als sinnvoll.

Das Intensitätssignal hängt davon ab, wieviele Label sich zu einem gegebenen Zeitpunkt in dem Laserfokus aufhalten. Dies bedeutet, dass die Markerkonzentration an einem bestimmten Ort zu einer bestimmten Zeit $C(\vec{r}, t)$ in ein Integral über den Raum eingehen muss. Insgesamt ergibt sich die Fluoreszenzintensität zu:

$$F(t) = \kappa \cdot Q \int_V CEF(\vec{r}) \cdot I(\vec{r}) \cdot C(\vec{r}, t) dV. \quad (3.6)$$

In Gleichung (3.6) gibt der Faktor κ an, wie effizient der gesamte experimentelle Aufbau ist. Q ist das Maß für die Quantenausbeute der Label, $CEF(\vec{r})$ beschreibt die Wahrscheinlichkeit ein Signal zu detektieren und $I(\vec{r})$ stellt die Laserintensität dar.

Mit $I_{em} = CEF(\vec{r}) \cdot I(\vec{r})$ vereinfacht sich (3.6) zu:

$$F(t) = \kappa \cdot Q \int_V I_{em}(\vec{r}) \cdot C(\vec{r}, t) dV \quad (3.7)$$

Der analytische Ausdruck für die Fluktuationen des Signales lässt sich in Abhängigkeit der Konzentrationsfluktuationen schreiben:

$$\delta F(t) = \kappa \cdot Q \int_V I_{em}(\vec{r}) \cdot \delta C(\vec{r}, t) dV. \quad (3.8)$$

Die Autokorrelation der Fluktuationen führt auf:

$$\begin{aligned} G_{fluct}(\tau) &= \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \\ &= \frac{\int_V \int_{V'} I_{em}(\vec{r}) I_{em}(\vec{r}') \langle \delta C(\vec{r}, t) \delta C(\vec{r}', t + \tau) \rangle dV dV'}{\left(\int_V I_{em}(\vec{r}) \langle C(\vec{r}, t) \rangle dV \right)^2} \end{aligned} \quad (3.9)$$

Werden die Konzentrationsfluktuationen durch Diffusion³ verursacht, lässt sich über das zweite Ficksche Gesetz

$$\frac{d}{dt} \delta C(\vec{r}, t) = D \cdot \nabla^2 \delta C(\vec{r}, t)$$

ein Ausdruck für die Konzentrationskorrelation ($\Phi(\vec{r}, \vec{r}', t)$) finden [20]:

$$\Phi(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \langle \delta C(\vec{r}, t) \delta C(\vec{r}', t + \tau) \rangle = \frac{\langle C \rangle}{(4 \cdot \pi D \cdot \tau)^{\frac{3}{2}}} \cdot e^{-\frac{(\vec{r} - \vec{r}')^2}{4 \cdot D \cdot \tau}}. \quad (3.10)$$

Dabei ist $\langle C \rangle$ der Mittelwert der Konzentration. Der Laserfokus wird durch ein gaußförmiges Profil wiedergegeben [5]:

$$I_{em} = \kappa \cdot Q \cdot I_0 \cdot e^{-2 \cdot \frac{x^2 + y^2}{r_0^2}} \cdot e^{-2 \cdot \frac{z^2}{z_0^2}}, \quad (3.11)$$

wobei r_0 und z_0 die lateralen bzw. axialen Abstände sind, bei denen die zugehörigen Exponentialwerte jeweils auf e^{-2} abgefallen sind. Diese Werte definieren ein fokales Volumen $V_{foc} = \pi^3 r_0^2 z_0$.

Werden nun (3.10) und (3.11) in (3.9) eingesetzt und numerisch ausgewertet, ergibt sich nach [5]:

$$G_{fluct}^{3D}(\tau) = \frac{1}{V_{foc} \cdot \langle C \rangle} \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_d}} \right) \cdot \left(\frac{1}{\sqrt{1 + \frac{r_0^2 \tau}{z_0^2 \tau_d}}} \right), \quad (3.12)$$

³ Es wird hier von einer isotropen Diffusion in drei Dimensionen ausgegangen.

mit

$$\tau_d = \frac{r_0^2}{4 \cdot D}. \quad (3.13)$$

$\langle N \rangle = V_{foc} \cdot \langle C \rangle$ ist die durchschnittliche Anzahl an im konfokalen Volumen V_{foc} zu findenden Labeln. Somit ergibt sich für den Fall der dreidimensionalen isotropen Diffusion:

$$G_{fluct}^{3D}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_d}} \right) \cdot \left(\frac{1}{\sqrt{1 + \frac{r_0^2 \tau}{z_0^2 \tau_d}}} \right). \quad (3.14)$$

Die Zeitgröße τ_d ist die Zeit, die ein Label benötigt, durch das konfokale Volumen zu diffundieren.

Im Fall lateraler Diffusion (2-dimensional) vereinfacht sich die Autokorrelationsfunktion wegen ($z_0 \gg r_0$) zu [20, 46]:

$$G_{fluct}^{2D}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_d}} \right). \quad (3.15)$$

Aus den Ausdrücken für die berechneten Autokorrelationen (3.14, 3.15) ist zu erkennen, dass durch die Analyse der Fluktuationen des Fluoreszenzsignales eine Aussage über den Diffusionskoeffizienten des diffundierenden Fluoreszenzlabels getroffen werden kann. Aus Gleichung (3.13) ist ersichtlich, dass sich der Diffusionskoeffizient durch

$$D = \frac{r_0^2}{4\tau} \quad (3.16)$$

berechnet. Die für den drei- und zweidimensionalen Fall vorgestellten Ausdrücke gelten für normale Diffusion. Sollte anomale Diffusion auftreten, bei der sich das MSD nicht linear mit der Zeit verändert (siehe Abschnitt 2.1), muss eine Modifizierung vorgenommen werden. Dann gilt nach [77]:

$$G_{fluct}^{ano,2D}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(\frac{1}{1 + \frac{\Gamma \tau^\alpha}{r_0^2}} \right), \quad (3.17)$$

wobei Γ der Transportkoeffizient ist.

Bis hier wurden Systeme mit nur einer charakteristischen Diffusionszeit betrachtet. Kommen zwei verschiedene Diffusionszeiten vor, so ist der Ausdruck für die Autokorrelationsfunktion zu modifizieren. Es ergibt sich ein Ausdruck, in dem die beiden Diffusionszeiten $\tau_{d,1}$ und $\tau_{d,2}$ und das Verhältnis Y , der beiden diffundierenden Spezies zueinander, einfließen [39]:

$$G_{2komp}^{2D}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \left(\frac{Y}{1 + \frac{\tau}{\tau_{d,1}}} + \frac{1 - Y}{1 + \frac{\tau}{\tau_{d,2}}} \right). \quad (3.18)$$

3.2.2 Experimenteller Aufbau für die FCS

Die FCS-Messungen werden durch einen konfokalen Aufbau realisiert wie ihn Abb.(3.2) darstellt. Ein entscheidender Vorteil der konfokalen Realisierung liegt darin, dass ein kleines Volumenelement V_{foc} definiert werden kann.

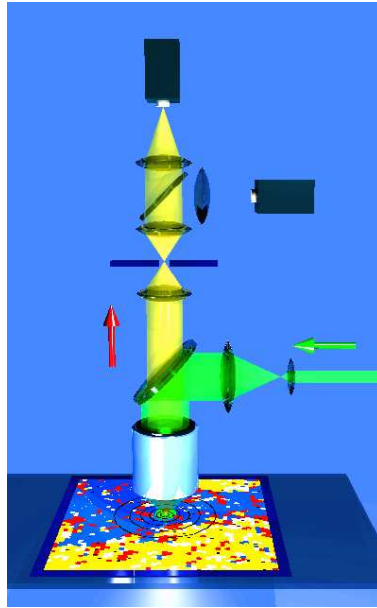


Abbildung 3.2: *Prinzipielle Anordnung des für die FCS verwendeten konfokalen Aufbaus.*

Ein Nd:Yag Laser der Firma Crysta Laser (Reno/NV, USA) mit einem Emissionsmaximum von 532 nm (grün) strahlt kohärentes, linear polarisiertes Laserlicht durch ein Linsensystem auf einen dichroitischen Spiegel. Dieser reflektiert den größten Anteil der vom Laser kommenden Photonen in ein Wasserimmersionsobjektiv (numerische Apertur $NA = 1.2$) der Firma Olympus Optical Com. (Hamburg, D). Fluoreszenzmarker, die sich im Fokus befinden, emittieren Photonen einer im Vergleich zum Laserlicht größeren Wellenlänge. Fluoreszenzlicht wird anschliessend wieder im Objektiv gesammelt und trifft wiederum auf den dichroitischen Spiegel. Diesmal findet mit einer höheren Wahrscheinlichkeit Transmission statt. Durch eine Lochblende⁴, die sich in dem folgenden Teil des Strahlengangs befindet, wird das konfokale Messvolumen definiert. Ein kleinerer Lochdurchmesser bewirkt dabei ein kleineres konfokales Messvolumen V_{foc} . Anschließend werden die Photonen, je nach

⁴ Bei dem hier verwendeten Aufbau sind Lochblenden mit Durchmessern von 100 μm , 50 μm oder 30 μm einstellbar.

Art ihrer Polarisierung, von einer der beiden Avalanche Photodioden⁵, welche von der Firma Perkin Elmer (Boston/MA, USA) stammen und die Photonen in einem Spektralbereich von 400 nm bis 1060 nm detektieren können, registriert. Die Signale der Photodioden werden dann mittels einer Korrelatorkarte von Correlator.Com (Bridgewater/NJ, USA) autokorreliert.

Die aufgenommenen Autokorrelationskurven lassen sich dann über die in Abschnitt 3.2.1 vorgestellten Gleichungen (3.12) und (3.15) beschreiben und die Diffusionszeiten können daraus ermittelt werden.

Da die laterale Diffusionszeit von der Größe des Radius r_0 abhängt und sich dieser durch nur kleinste Veränderungen der Systemjustierung ändert, ist dieser Radius vor jeder Messung zu bestimmen.

3.2.3 Probenpräparation für die FCS-Messungen

Der Diffusionskoeffizient von in destilliertem Wasser gelöstem Rhodamin ist durch experimentelle Ergebnisse gut bekannt ($D_{Rhodamin} = 3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$) und kann als Standard zur Bestimmung des Fokusradiuses r_0 dienen [39]. Rhodamin R-634 wurde von Molecular Probes (Eugene/OR, USA) gekauft. Dieser Farbstoff besitzt sein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda_{Rhodamin}^{abs} = 528 \text{ nm}$ und sein Emissionsmaximum liegt bei $\lambda_{Rhodamin}^{em} = 551 \text{ nm}$. Die Struktur von Rhodamin R-634 wird in Abb. (3.3) dargestellt. Das in Pulverform vorliegende Rhodamin wird mit einer Konzen-

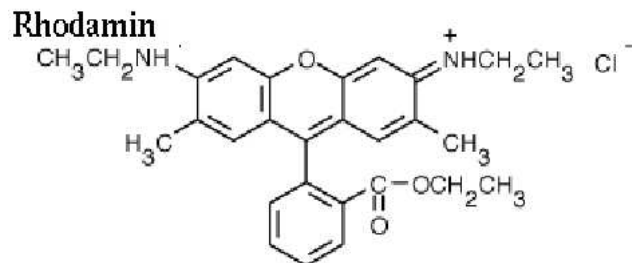


Abbildung 3.3: *Chemische Struktur des Farbstoffs Rhodamin.*

tration von 10^{-3} mol/l in bidestilliertem Wasser gelöst. Vor jeder Messung wird mit dieser Basislösung eine 10^{-9} mol/l Lösung angesetzt.

⁵ Für die in dieser Arbeit betrachteten Diffusionsprozesse ist die Trennung der beiden Polarisationsrichtungen nicht nötig. Die Aufnahme beider Polarisationsrichtungen wird aber bereits hier vorgenommen, da der Aufbau prinzipiell auch für Rotationsstudien genutzt werden soll (siehe Abschnitt 6.2).

Als Fluoreszenzmarker wird für die Lipidmembranmessungen *N*-(6-tetra-methylrhodaminethiocarbamoyl)- 1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3 -phospho-ethanolamine,triethylammonium Salz (TRITC DHPE) von Molecular Probes (Eugene/Oregon, USA) verwendet. Die Struktur dieses Farbstoffes ist in Abb. (3.4) dargestellt. Er absorbiert maximal bei einer Wellenlänge von $\lambda_{TRITC}^{abs} = 540$ nm und sein Emissionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von $\lambda_{TRITC}^{em} = 566$ nm. 5 μ l des in einer 2 : 1 Dichlo-

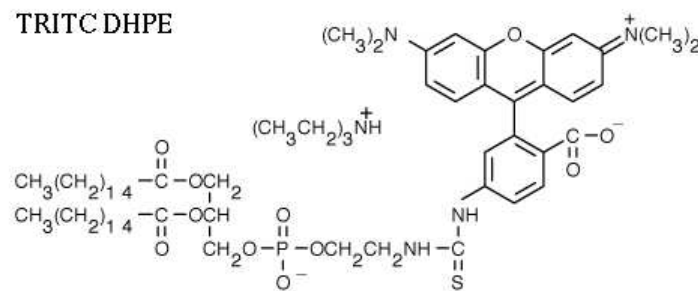


Abbildung 3.4: Chemische Struktur des Farbstoffes TRITC DHPE.

romethan: Methanol Lösung gelösten Farbstoffes ($c = 10^{-12}$ mol/l) wird mit 2 ml einer 10 mM Lipidlösung vermischt. Die Lipide sind in Dichloromethan:Methanol (2 : 1) gelöst und es werden 1,2-Dilauroyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (DLPC) und 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (DPPC) von Avanti Polar Lipids (Alabaster/AL, USA) verwendet. Im Anschluss daran werden 10 μ l dieser Lipidfarbstofflösung langsam auf ein Quarzglas (Firma Plano (Wetzlar/D)), das in einem Ultraschallbad mit Azeton und bidestilliertem Wasser gereinigt wurde, gegeben und mit Hilfe eines auf die Probe gerichteten Stickstoffstrahls wird das Abdampfen des organischen Lösungsmittels beschleunigt. Abschließend kommt die Probe für mehrere Stunden in einen unter Vakuum stehenden Exsikkator, wobei die Vakuumpumpe die gesamte Zeit über angeschlossen bleibt. Insgesamt bilden sich mehrere hundert Lipiddoppelschichten aus.

Vor den Messungen an den planaren Membranen müssen diese hydratisiert werden. Ein Tropfen bidestilliertes Wasser wird auf die Lipidschichten gegeben und die Proben werden auf ca. 333 K erhitzt, abgekühlt, wieder erhitzt und erneut abgekühlt. Während der Messungen ist darauf zu achten, dass die Probe nicht austrocknet.

3.2.4 Simulation der FCS Experimente

Aus Experimenten ist bekannt, dass gelförmige Lipide im Vergleich zu fluiden Lipiden um ungefähr einen Faktor 100 langsamer diffundieren [39]. Dies wird in das Modell derart aufgenommen, dass die Diffusion von vier geordneten Ketten 100-mal unwahrscheinlicher ist als die Diffusion von vier fluiden Ketten. Befinden sich drei der vier Ketten im gelförmigen Zustand, so ist die Wahrscheinlichkeit um $1/75$ gegenüber der Diffusion vier fluiden Lipidketten reduziert. Zwei gelförmige Ketten bewirken eine Reduktion der Wahrscheinlichkeit auf $1/50$ und eine gelförmige Kette um $1/25$. Zum Studium der Diffusion ist unter anderem die FCS gewählt.

Die Simulation der FCS-Experimente funktioniert prinzipiell ähnlich wie die der Wärmekapazitätsberechnungen (s. Abschn. 3.1.3). Eine Ausgangskonfiguration wird gebildet, das System über 10^4 Zyklen ins Gleichgewicht gebracht und nach weiteren 10^4 Zyklen im Gleichgewicht werden die Fluoreszenzsignale aufgenommen. Zu Beginn der Simulation im equilibrierten Zustand wird eine vorgegebene Anzahl an Ketten zufällig und als fluoreszierend markiert. Diesen Ketten werden keine weitere Eigenschaften zugesprochen, d.h. sie verhalten sich so, wie durch die charakteristischen Energien der jeweiligen Spezies vorgegeben.

Die Intensitäten werden nach jeder Durchführung der Diffusionsabfrage (Lipidaustausche und Rotationen) aufgenommen. Die Intensitäten berechnen sich aus dem bekannten Gaußprofil

$$I = I_0 \cdot \exp \left(-2 \frac{(x - x_{Foc})^2 + (y - y_{Foc})^2}{r_0^2} \right),$$

wobei I_0 gleich Eins gesetzt wird, (x, y) die Koordinaten des Fluoreszenzmarkers und (x_{Foc}, y_{Foc}) die Koordinaten des Fokusmittelpunkts sind. Abbildung (3.5) zeigt eine Lipidanordnung aus einer Rechnung (siehe Kapitel 4.3 und 5.1.1) in der Fluoreszenzmarker (weiße ausgefüllte Kreise) auf der Matrix verteilt sind. Die schwarzen Ringe stellen das gaußförmige Profil des Laserfokus dar. Für jedes Label ergibt sich eine Intensität

$$I_i = \exp \left(-2 \frac{(x_i - x_{Foc})^2 + (y_i - y_{Foc})^2}{r_0^2} \right).$$

(x_i, y_i) ist dabei die Koordinate des i -ten Fluoreszenzmarkers. Durch Summation der Einzelintensitäten lässt sich das gesamte Fluoreszenzsignal bestimmen ($I_{ges} = \sum_i I_i$). Bei der Simulation wird von instantaner Fluoreszenz ausgegangen, d.h. ein Fluoreszenzlabel kann direkt nach der Absorption eines Photons fluoreszieren.

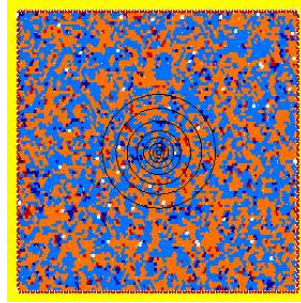


Abbildung 3.5: Schnappschuss einer Lipidanordnung wie er in den Abschnitten 3.5 und 4.3 ausführlich diskutiert wird. Der gaußförmige Laserfokus wird durch die schwarzen konzentrischen Kreise angedeutet. Die weißen ausgefüllten Kreise repräsentieren die Fluoreszenzmarker.

3.3 Single-Particle Tracking

In den im letzten Abschnitt beschriebenen Fluoreszenzkorrelationsspektroskopiesimulationen sind Informationen über die Position der Label automatisch enthalten. Die Positionen der diffundierenden Ketten können wie im SPT zeitlich verfolgt und die entsprechenden Daten können parallel zur FCS-Simulation gesammelt werden. Nachdem das System in das Gleichgewicht gebracht ist und die Gleichgewichtsberechnungen beginnen, werden pro Rechnung vier Lipidketten zufällig ausgewählt und mit Beginn der Sammlung der Fluoreszenzdaten werden nach jedem Diffusionsschritt die Position, der Zustand und insbesondere die relative Positionsänderung der vier Lipidketten zu ihrer Ausgangsposition, die sie zu Beginn der Gleichgewichtsberechnung hatten, bestimmt.

Mit diesen Daten soll unter anderem das MSD berechnet werden. Dabei reicht es nicht aus, nur die Position der Kette auf der Matrix zu unterschiedlichen Zeiten zu kennen, sondern die Anwendung der periodischen Randbedingungen muss Berücksichtigung finden. Aufgrund der periodischen Randbedingungen ist die Position einer Kette auf einen bestimmten Bereich, der durch die Gittergröße definiert ist, beschränkt. Eine diffundierende Kette kann sich aber eigentlich weiter von dem Ausgangspunkt entfernen, als dies durch die Position auf dem hexagonalen Gitter vorgegeben wird. Dies ist sich derart vorzustellen, dass eine Kette von einer Matrix in eine andere identische Matrix diffundiert. Das Verlassen der Ursprungsmatrix wird durch die Ermittlung der relativen Positionsänderung berücksichtigt.

Zur Berechnung des MSD stehen prinzipiell zwei Methoden zur Verfügung. Die eine Möglichkeit wird „Mittelung über unabhängige Paare“ und die zwei-

te Methode „Mittelung über alle Paare“ bezeichnet [68].

Es seien N Positionen zwischen denen jeweils ein Zeitintervall von Δt liegt, aufgenommen worden, dann wird das MSD bei der Methode über „Mittelung über unabhängige Paare“ durch

$$\langle r^2(n) \rangle_I = \frac{1}{\left[\frac{N-1}{n}\right]} \sum_{i=1}^{\left[\frac{N-1}{n}\right]} (\vec{r}(n \cdot i) - \vec{r}(n \cdot i - n))^2 \quad (3.19)$$

bestimmt. Hierbei ist n die Zeit in Einheiten des Zeitintervalles Δt und $\left[\frac{N-1}{n}\right]$ gibt die größte ganze Zahl N_I an, für die $N_I \leq \left[\frac{N-1}{n}\right]$ gilt. $\vec{r}(n \cdot i)$ und $\vec{r}(n \cdot i - n)$ sind die Positionen des diffundierenden Teilchens zu den Zeiten $n \cdot i$ und $(n \cdot i - n)$.

Der Name der „Mittelung über unabhängige Paare“ kommt daher, dass über N_I unabhängige Segmente gemittelt wird (siehe oberes Bild in Abb. 3.6). Die

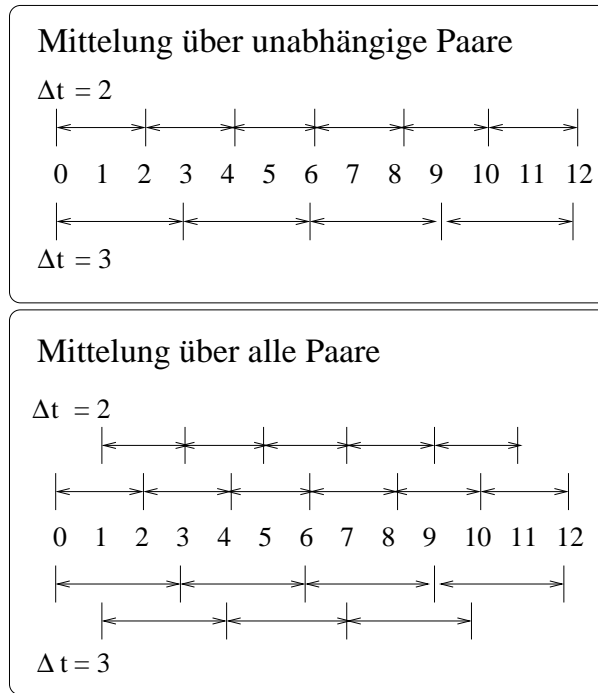


Abbildung 3.6: Oben: Das Prinzip der „Mittelung über unabhängige Paare“ wird für Zeiten $\Delta t = 2$ und $\Delta t = 3$ dargestellt. Unten: Die „Methode über alle Paare“ nutzt wesentlich mehr Paare, als bei der oben vorgestellten Methode. Hier sind die einzelnen Segmente stark miteinander korreliert.

eben vorgestellte Mittelungsmethode nutzt Segmente die kaum miteinander

korreliert sind. Bei der „Mittelung über alle Paare“ werden zusätzliche Paare genutzt, die bei der „Mittelung über unabhängige Paare“ nicht benutzt werden (s. untere Graphik in Abb. 3.6). Die einzelnen Segmente sind dann aber stark korreliert. Bei N Positionsmessungen stehen dann zu gegebenem n $N_A = N - n$ Werte, über die gemittelt wird, zur Verfügung:

$$\langle r^2(n) \rangle_A = \frac{1}{N_A} \sum_{i=0}^{N_A-1} [\vec{r}(i+n) - \vec{r}(i)]^2. \quad (3.20)$$

Eine Monte Carlo Studie von Saxton [68] zeigt, dass die „Methode der Mittelung über alle Paare“ gegenüber der „Mittelung über unabhängige Paare“ bessere Ergebnisse liefert. Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit die MSDs mittels Gleichung (3.20) berechnet.

Mittels des Verfolgens der vier zufällig gewählten Ketten soll aber nicht nur deren Positionsspur ermittelt werden, vielmehr wird nach Beendigung eines jeden Diffusionsschrittes auch berechnet, welches Fluoreszenzsignal die Kette an der jeweiligen Position abgeben würde, wäre sie als Fluoreszenzlabel markiert. Dies erlaubt das Aufnehmen einer Einzelmolekülfluoreszenzspur. Ein Signal wird auch dann aufgenommen, wenn es sich, was die Berechnung des MSDs angeht, nicht mehr in der Ursprungsmatrix aufhält. Dies führt zu keinem Fehler, da bei der FCS nur die Diffusionszeit durch den Fokus von Bedeutung ist (siehe Abschn. 3.2.1).

Kapitel 4

Wärmekapazitäten und Domänenbildung

In diesem Abschnitt soll dargestellt werden, dass das in Abschnitt 2.3 eingeführte Modell zur Beschreibung experimenteller Wärmekapazitätsprofile benutzt werden kann. Die in Abschnitt 2.3.3 eingeführten Parameter sind gerade so gewählt, dass sich damit DMPC:DSPC Lipidmischungen beschreiben lassen. Bevor jedoch auf den Vergleich der theoretischen und experimentellen Wärmekapazitätskurven eingegangen wird, werden theoretische Ergebnisse präsentiert, die den Zusammenhang der in dem System auftretenden Fluktuationen mit den Wärmekapazitätskurven verdeutlichen.

Im Anschluss daran wird auf die Ausbildung von Domänen, wie sie im Experiment und in den Simulationen beobachtbar sind, eingegangen. In diesem Kontext sollen Matrixschnappschüsse, die die Lipidanordnung einer bestimmten Konfiguration wiedergeben, den Schmelzprozess der Lipidmembranen verdeutlichen. Ein Zusammenhang mit dem Phasendiagramm wird ebenfalls aufgestellt.

Den Abschluss bildet eine Diskussion des Modells und seiner Aussagen. Dabei wird auch auf das DMPC:DSPC Phasendiagramm eingegangen.

4.1 Wärmekapazitäten und Fluktuationen

Die Methode der Monte Carlo Simulation kann ein System von einem Nichtgleichgewichts- in einen Gleichgewichtszustand bringen. Im Gleichgewicht fluktuieren Systemgrößen wie die Enthalpie oder die Anzahl an fluiden Ketten um einen Mittelwert. Wie in Abschnitt 2.3.2 gezeigt, lässt sich die Systemenergie in einen konfigurationsunabhängigen und einen konfigurationsabhängigen Anteil aufteilen. Dies gilt auch für die Gesamtenthalpie.

Abbildung (4.1) zeigt den konfigurationsabhängigen Enthalpieverlauf einer DMPC:DSPC¹ 50:50 Mischung bei einer Temperatur von 304 K. Ausgehend von der initialisierten 60×60 -Matrix geht das Lipidsystem während der ersten 1000 Monte Carlo Zyklen von seinem Nichtgleichgewichtszustand in seinen Gleichgewichtszustand über (obere Graphik in Abb. 4.1) und weitere 9000 durchgeführte Zyklen gewährleisten, dass sich das System tatsächlich im Gleichgewicht befindet.

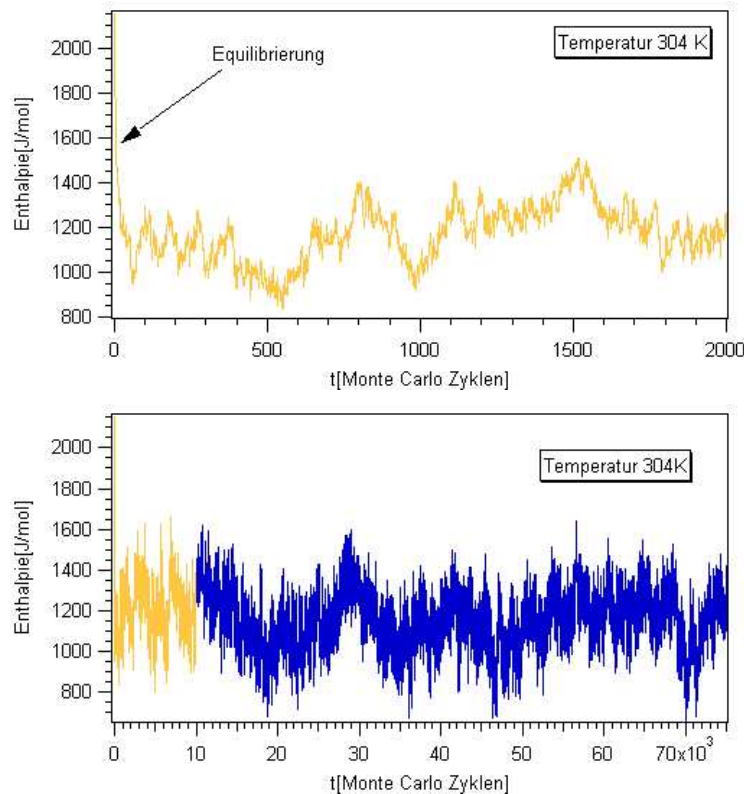


Abbildung 4.1: *Oben: Über die ersten 2000 Zyklen ist der Enthalpieverlauf einer DMPC:DSPC 50:50 Mischung bei einer Temperatur von 304 K während des Equilibrierens gezeigt. Unten: Die gesamten Enthalpiefluktuationen während der Gleichgewichtsfindung und im Gleichgewicht sind dargestellt. Die beige Kurve gibt den Verlauf während der Gleichgewichtsfindung, aus dem der obige Ausschnitt stammt, wieder und der blaue Kurvenverlauf stellt die Fluktuationen um den Gleichgewichtswert der Enthalpie dar.*

¹ Es sei nochmals darauf hingewiesen, dass die Modellparameter so gewählt wurden, dass sich damit DMPC:DSPC Lipidmischungen beschreiben lassen.

Im Anschluss an die Equilibrierung sind die Enthalpieschwankungen um den Mittelwert deutlich erkennbar (blauer Kurvenverlauf in Abb. 4.1). Die Fluktuationen sind temperaturabhängig, was in den beiden Graphiken der Abbildung 4.2 dargestellt wird. Bei der geringsten ($T=292$ K) und höchsten Temperatur ($T=325$ K) sind sowohl die Fluktuationen der Enthalpie als auch die Schwankungen der Anzahl der fluiden Ketten gering. Diese Veränderungen

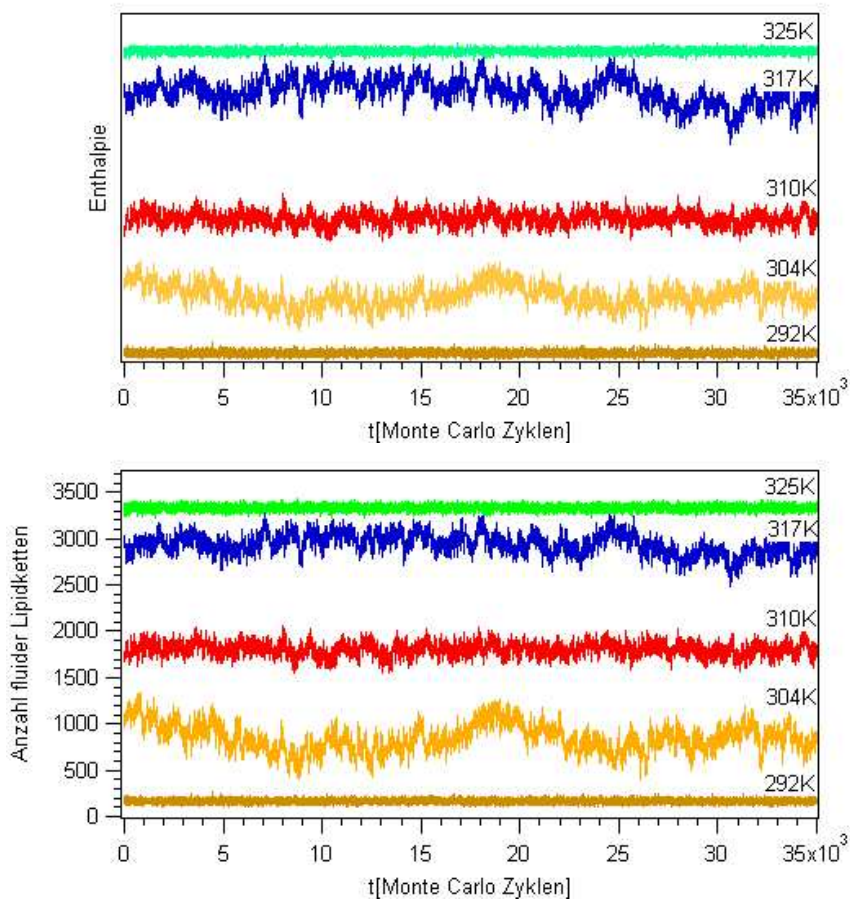


Abbildung 4.2: Oben: Fluktuationen der Enthalpie einer DMPC:DSPC 50:50 Mischung für verschiedene Temperaturen. Die Kurven bei den Temperaturen 304 K und 317 K zeigen große und langsame Fluktuationen. Bei diesen Temperaturen befindet sich die Wärmekapazität (siehe Abb. 4.4) jeweils in einem Maximum. Unten: Die Anzahl an fluiden Lipidketten ist gegen die Zeit aufgetragen und zeigen in Abhängigkeit der Temperatur unterschiedlich schnelle und große Fluktuationen.

wirken sich auch auf die Enthalpiefluktuationen aus, weil eine fluide Kette

im Vergleich zu einer gelförmigen Kette eine höhere Enthalpie besitzt. Bei einer Temperatur von 310 K lassen sich in Abb. 4.2 größere und langsamere Fluktuationen als bei $T = 292$ K und $T = 325$ K beobachten. Diese Fluktuationen sind aber im Vergleich zu denen bei den Temperaturen 304 K und 317 K schneller und schwächer. Bei den letztgenannten Temperaturen befindet sich die Wärmekapazitätskurve jeweils in einem lokalen Maximum (Abb. 4.4) und die Fluktuationen sind stark und langsam.

Die Fluktuationen der fluiden Ketten enthalten einen weiteren Zusammenhang, der in Abb. 4.3 dargestellt ist. Dort sind die Schwankungen der Anzahl an fluiden Ketten nach den beiden Spezies getrennt gezeigt. Die eine Graphik stellt die Fluktuationen bei einer Temperatur von 304 K und die andere Graphik die Schwankungen bei $T = 317$ K dar. Bei der niedrigeren Tempera-

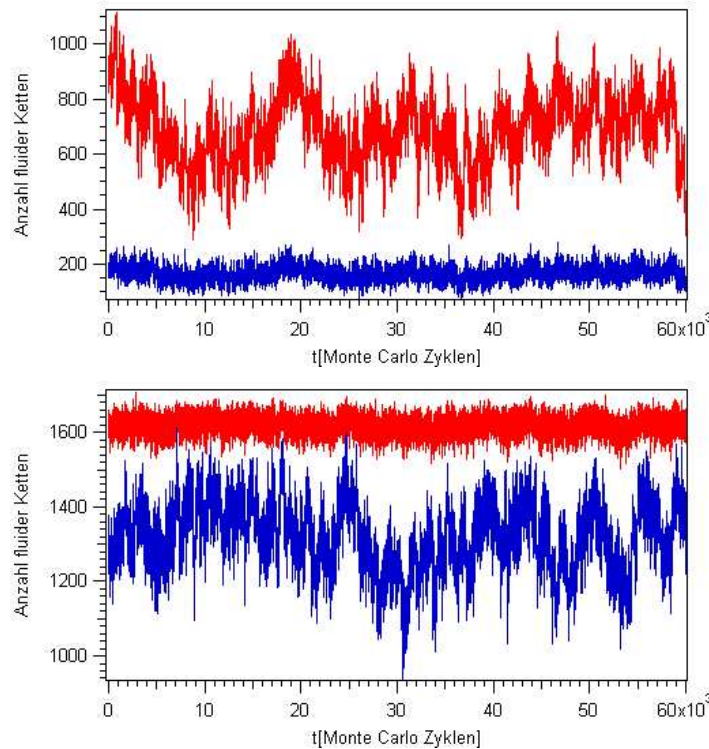


Abbildung 4.3: Die sich zeitlich ändernde Anzahl der fluiden DMPC– (rote Kurven) und DSPC–Ketten (blaue Kurven) sind für die Temperaturen 304 K (oben) und 317 K (unten) abgebildet.

tur zeigt hauptsächlich der Verlauf der Zahl an fluiden DMPC–Ketten hohe und langsame Fluktuationen und bei der höheren Temperatur gilt dies für die Anzahl an fluiden DSPC–Ketten. Zum Verständnis dieses Phänomens ist

eine detaillierte Betrachtung der Schmelzumwandlung und des dazugehörigen Wärmekapazitätsprofils notwendig.

Über das Fluktuations–Dissipations Theorem (Gl. 2.55) können die Fluktuationen der Enthalpie mit dem Wärmekapazitätsprofil in Verbindung gebracht werden. Das aus dem Fluktuations–Dissipations Theorem berechnete Wärmekapazitätsprofil einer äquimolaren DMPC:DSPC Lipidmischung ist in Abb. 4.4 gezeigt. Wird der Kurvenverlauf mit den beschriebenen Fluktuationen verglichen, wird der Zusammenhang von Fluktuationen und Wärmekapazitäten deutlich. In einem zweikomponentigen Lipidsystem bilden sich bis zu zwei Wärmekapazitätsmaxima aus (Theorie der regulären Lösung, Abschnitt 2.2.2), was bei einer DMPC:DSPC 50 : 50 Mischung zu beobachten ist. Die Maxima treten bei Temperaturen von ungefähr 304 K und 317 K auf. Das sind gerade die Temperaturen bei denen große und langsame Fluktuationen zu beobachten sind (Abb. 4.3). Da die reinen Lipidmembranen unterschiedliche Schmelztemperaturen besitzen, sind beim ersten Wärmekapazitätsmaximum ($T=304$ K) die Fluktuationen in der Anzahl an fluiden Lipidketten von der Spezies mit der niedrigeren Schmelztemperatur (DMPC) größer und langsamer als die Fluktuationen in der Anzahl an fluiden Ketten der Spezies (DSPC), die bei einer höheren Temperatur ihren Umwandlungsmittelpunkt besitzt. Beim zweiten Wärmekapazitätsmaximum ($T=317$ K) sind die Fluktuationen in der Anzahl an fluiden Ketten der bei einer höheren Temperatur schmelzenden Lipidspezies (DSPC) größer und langsamer (Abb. 4.3).

Bei den Temperaturen 292 K und 325 K sind die Wärmekapazitätswerte klein und bei diesen Temperaturen sind die Schwankungen der Enthalpie und in der Anzahl der fluiden Lipidketten gering und schnell. Der c_p –Wert bei einer Temperatur von $T=310$ K erklärt die beobachtbaren Fluktuationen.

In Abb. 4.4 ist der Enthalpieverlauf, der den konfigurationsabhängigen Enthalpiemittelwert einer DMPC:DSPC 50:50 Mischung zur jeweiligen Temperatur wiedergibt, dargestellt. Differentiation dieses Enthalpieverlaufs sollte dem Wärmekapazitätsverlauf des durch das Fluktuations–Dissipations Theorem berechneten Profils entsprechen. In Abb. 4.4 ist die durch die Ableitung der Enthalpien erhaltene Wärmekapazitätskurve wiedergegeben und kann mit der durch das Fluktuations–Dissipations Theorem berechneten c_p –Kurve verglichen werden. Die beiden Wärmekapazitätsprofile zeigen eine gute Übereinstimmung. Die auftretenden Abweichungen lassen sich zum Einen durch die begrenzte Statistik, die mit der endlichen Anzahl an Monte Carlo Zyklen zusammenhängt und zum Anderen durch die diskreten Enthalpiewerte und den damit bedingten Differentiationsfehlern² erklären.

² Strenggenommen handelt es sich hier um eine Differenzenquotientenbildung und nicht um eine Differentiation.

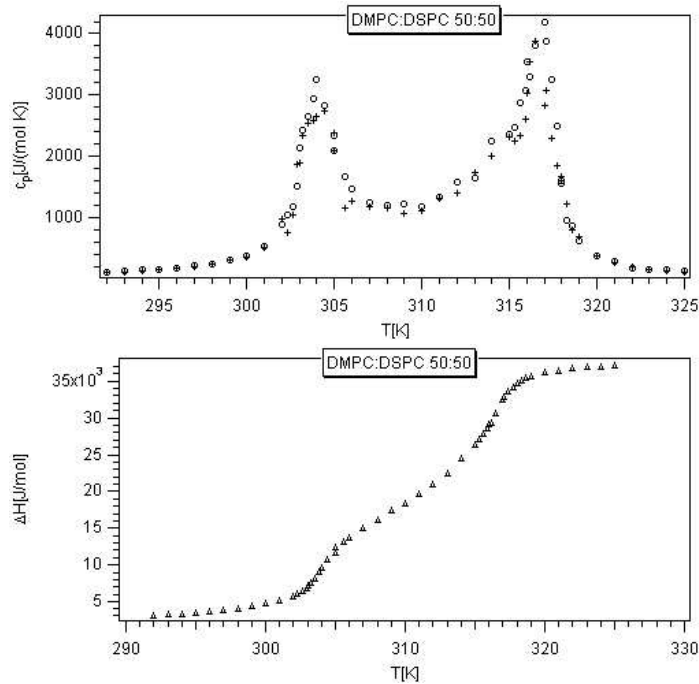


Abbildung 4.4: Oben: Die durch das Fluktuations–Dissipations Theorem (\circ) und durch Differentiation des Enthalpieverlaufs (+) erhaltenen Wärmekapazitätsprofile sind für ein äquimolares DMPC:DSPC Mischungsverhältnis abgebildet. Unten: Der Enthalpieverlauf ist aufgetragen.

Die hier am Beispiel der äquimolaren Lipidmischung erläuterten Zusammenhänge gelten für alle in Abschnitt 3.1.3 genannten Lipidmischungen. Die Enthalpieverläufe, die durch Differenzieren dieser Enthalpieverläufe erhaltenen Wärmekapazitäten und die aus dem Fluktuations–Dissipations Theorem berechneten c_p –Kurven sind für die erwähnten DMPC:DSPC Lipidmischungen in Anhang A dargestellt.

4.2 Vergleich von theoretischen und experimentellen Wärmekapazitätsprofilen

Die Parameter, die die Form der Wärmekapazitätskurven und somit die Höhe der Fluktuationen bei einer bestimmten Temperatur vorgeben, sind so gewählt, dass sich das Verhalten des experimentellen DMPC:DSPC Lipidsystems gut beschreiben lässt. Die theoretischen und experimentellen Wärmekapazitätskurven, aber auch die Phasendiagramme können miteinander ver-

glichen werden.

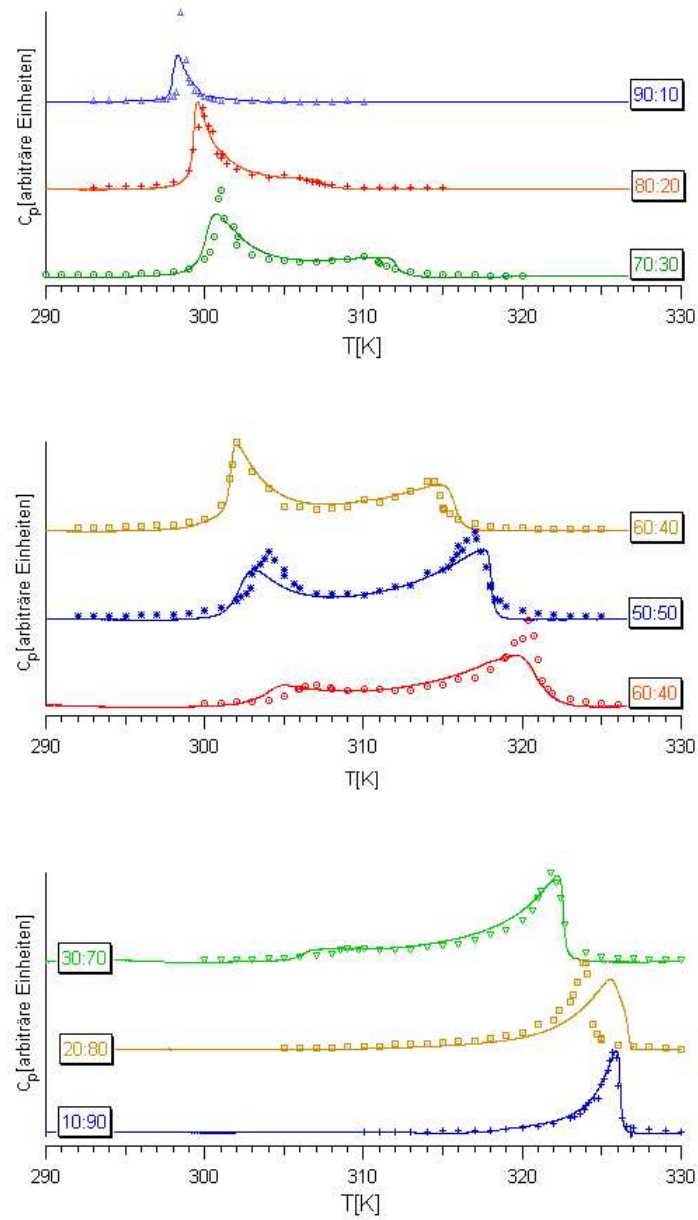


Abbildung 4.5: Die normierten theoretischen und experimentellen Wärmekapazitätskurven sind für verschiedene DMPC:DSPC Mischungsverhältnisse dargestellt. Die durchgezogenen Kurven geben den gemessenen und die Marker den berechneten Verlauf wieder.

In Abbildung 4.5 sind die neun aus dem Fluktuations–Dissipations Theorem berechneten Kurven mit ihren dazugehörigen experimentellen Wärmekapazitätsprofilen in einem Temperaturbereich von 290 K bis 330 K gezeigt. Die Ordinate, die die Wärmekapazitäten wiedergibt ist jeweils auf das globale Maximum normiert. In Anhang A sind alle experimentellen und theoretischen Kurven im Detail abgebildet, aus denen sich auch die Absolutwerte entnehmen lassen. Die hier gewählte Darstellung ermöglicht es, die Verschiebungen der Wärmekapazitätsmaxima der verschiedenen Mischungsverhältnisse untereinander zu vergleichen. Da es sich um ein zweikomponentiges Lipidsystem handelt sind bis zu zwei Wärmekapazitätsmaxima erkennbar. Für hohe DMPC– oder hohe DSPC–Anteile bildet sich jedoch nur ein erkennbarer Extremwert aus. Insgesamt lässt sich feststellen, dass je höher der Anteil der DSPC Lipide, desto stärker ist das bei höheren Temperaturen liegende Maximum ausgebildet und umso weiter ist es zu höheren Temperaturen verschoben. Je geringer der Anteil an DMPC–Lipiden, desto kleiner ist das sich bei niedrigeren Temperaturen befindende lokale Maximum und um so weiter rückt es zu höheren Temperaturen.

Im Großen und Ganzen lassen sich die experimentellen Kurven gut durch die theoretischen Wärmekapazitätsprofile beschreiben. Die Peaks sind leicht verschoben und der Abfall der theoretischen Kurven ist oftmals nicht so scharf, wie es die gemessenen Profile erkennen lassen. Die möglichen Gründe für das Abweichen werden in Abschnitt 4.5 diskutiert.

An dieser Stelle soll aber bereits auf die beiden Wärmekapazitätsverläufe bei einer DMPC:DSPC 20 : 80 Mischung eingegangen werden. Bei dieser Mischung unterscheiden sich die berechneten und gemessenen Kurven stark. Die Temperatur bei der die Wärmekapazität maximal ist, ist gegenüber dem Extremwert des theoretischen Wärmekapazitätsprofils um ungefähr $\Delta T = +2$ K verschoben. Die experimentelle Kurve wurde mehrmals gemessen und es ergab sich jeweils ein Verlauf, bei dem die beiden Maxima um ungefähr $\Delta T = 2$ K auseinanderlagen. Sugár et al. [79, 80] zeigen in ihren Veröffentlichungen einen experimentellen Wärmekapazitätsverlauf zur DMPC:DSPC 20 : 80 Mischung, der mit der theoretischen Kurve gut übereinstimmt. Der Grund für die auftretende Diskrepanz ist nicht bekannt.

Aus den theoretischen und experimentellen Kurven lassen sich nach der in 2.2.3 beschriebenen Methode die Grenztemperaturen bestimmen, die das Phasendiagramm definieren (Abb. 4.6).

In diesem Diagramm lässt sich ebenfalls erkennen, dass die Simulation das experimentelle System gut beschreiben kann. Ergänzend ist das aus der

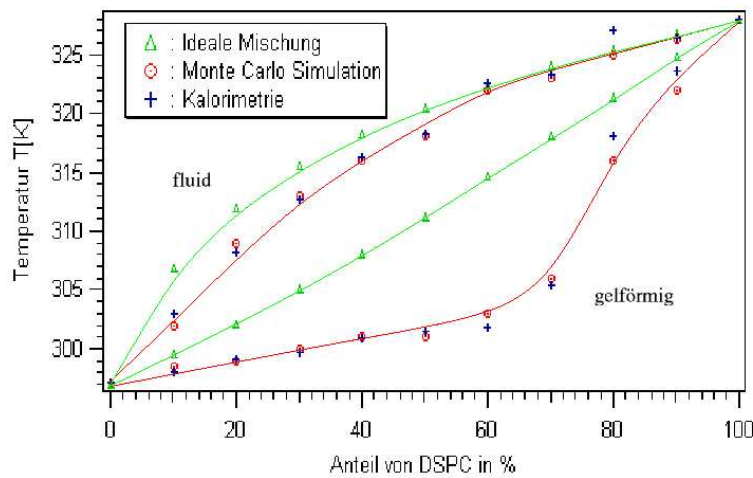


Abbildung 4.6: Aus den kalorimetrischen Experimenten, den Simulationen und der Theorie für ideale Lösungen ermittelte Phasendiagramme des DMPC:DSPC Lipidsystems.

Theorie einer idealen Lösung³ zu erwartende Phasendiagramm eingezeichnet. Die untere Grenztemperatur liegt bei höheren Temperaturen als beim realen DMPC:DSPC-Lipidsystem. Die obere Grenztemperatur ist für geringe DSPC Anteile ebenfalls höher, mit steigendem DSPC-Anteile gehen die Verläufe aber ineinander über.

Das Modell ist in der Lage, die Wärmekapazitätsprofile und das Phasendiagramm des DMPC:DSPC Lipidsystemes richtig wiederzugeben. In Experimenten beobachtbare Domänenbildung ist ebenfalls in den Simulationen beobachtbar und soll im nächsten Abschnitt erörtert werden.

4.3 Domänenbildung in Experiment und Modell

Durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie lassen sich Domänenstrukturen in künstlichen Lipidsystemen feststellen. Dies wurde als erstes von Korlach et al. [39] und Bagatolli et al. [6, 7] publiziert. Mittlerweile wurden einige wei-

³ Eine ideale Lösung wurde in Abschnitt 2.2 derart eingeführt, dass sich die fluiden und gelförmigen Komponenten makroskopisch entmischen und keine Phasengrenzen auftreten. In den makroskopischen Domänen mischen sich die unterschiedlichen Komponenten statistisch. Mittels der in 2.2 vorgestellten Gleichungen (2.34) wird das Phasendiagramm der idealen Mischung bestimmt.

tere Studien hierzu durchgeführt [8, 22]. Als Modellsystem werden in diesen Arbeiten Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) genutzt. Dies sind sphärische Gebilde, die aus einer einzelnen Lipiddoppelschicht bestehen und Durchmesser von $5\text{ }\mu\text{m}$ bis zu mehreren Hundert Mikrometern besitzen.

T. Schlötzer zeigt in seiner Diplomarbeit Bilder solcher Vesikel und der darin beobachtbaren Domänenbildung [72]. Diese hat er freundlicherweise zur Verfügung gestellt. In Abbildung 4.7 sind Bilder von GUVs der Zusammensetzung DLPC:DPPC 50:50 und DLPC:DPPC 20:80 gezeigt, die bei Raumtemperatur aufgenommen wurden. DLPC befindet sich bei dieser Temperatur im fluiden und DPPC im gelförmigen Zustand.

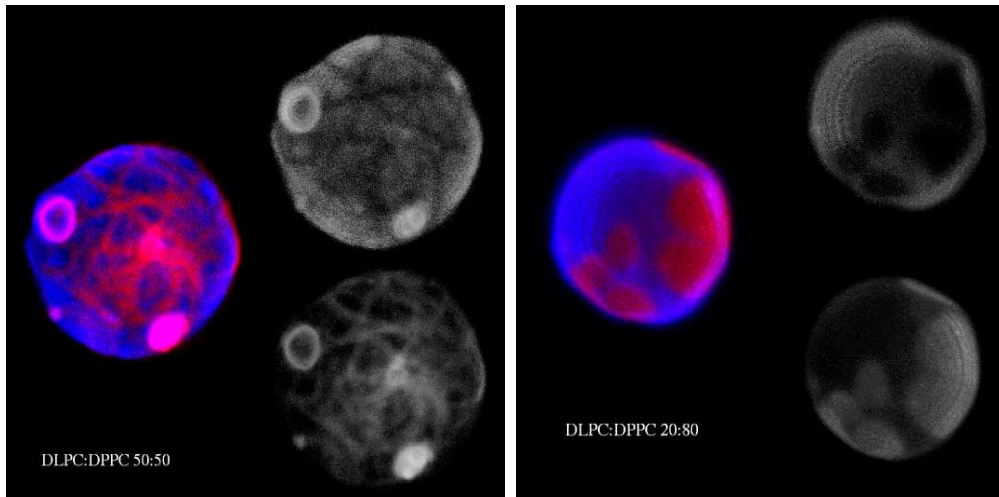


Abbildung 4.7: Konfokale Fluoreszenzmikroskopiebilder zweier GUVs. Das linke Bild ist an einem GUV der Zusammensetzung DLPC:DPPC 50:50 und das rechte Bild an einem GUV des Mischungsverhältnisses 20:80 aufgenommen worden. Die rote Farbe repräsentiert die fluiden und der blaue Farbton die gelförmigen Phasen. Die Vesikelbilder, die jeweils rechts abgebildet sind, ergeben zusammengesetzt die farbigen Darstellungen.

Von dem Fluoreszenzmarker, den der blaue Farbton repräsentiert, wird aufgrund seiner Kettenlänge angenommen, dass er sich vorzugsweise in einer Geldomänen anlagert und der rote Farbstoff repräsentiert ein Label, das sich meist in der fluiden Domänen löst (siehe T. Schlötzer [72]). Die Bilder aus Abb. 4.7 werden derart interpretiert, dass makroskopische Domänenbildung der zwei Zustände beobachtbar ist.

Domänenbildung lässt sich auch in den Simulationen beobachten. In Abbildung 4.8 sind drei Schnappschüsse aus Simulationen einer äquimolaren

DMPC:DSPC Mischung gezeigt, die die Anordnung der Lipide wiedergeben. Die Matrixgröße beträgt 100×100 , was ungefähr einer Größe von $50 \text{ nm} \times 50 \text{ nm}$ entspricht.

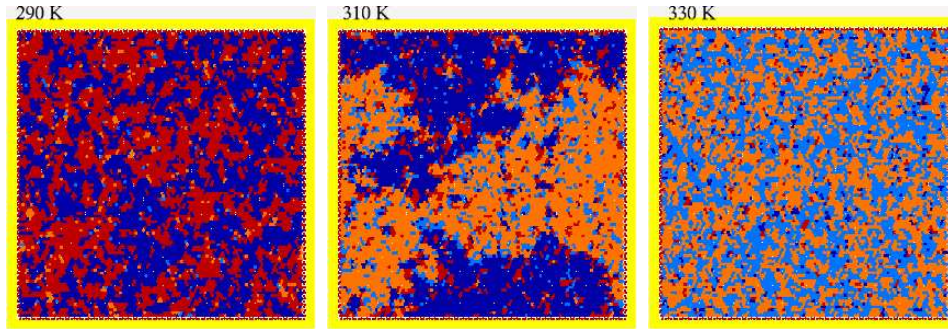


Abbildung 4.8: Schnappschüsse aus einer Monte Carlo Simulation einer 50:50 DMPC:DSPC-Mischung. Von links nach rechts sind die Temperaturen 290 K, 310 K und 330 K repräsentiert. Die Rottöne geben DMPC- und die blauen Farben die DSPC-Ketten wieder. Die hellere Farbe stellt jeweils eine fluide Kette und der dunklere Farbton eine gelförmige Kette dar.

Schnappschüsse sind für drei verschiedene Temperaturen aufgenommen, so dass drei Bereiche des Phasendiagramms repräsentiert werden. Bei einer Temperatur von 290 K befinden sich die Lipidketten in ihrem gelförmigen Zustand. Es bilden sich kleinere Domänen der unterschiedlichen Spezies aus. Phasenkoexistenz liegt bei $T = 310 \text{ K}$ vor. Makroskopische Domänen der beiden Phasen sind deutlich erkennbar. Weiterhin bilden sich kleinere Cluster von Lipiden des anderen Zustandes in den jeweiligen makroskopischen Phasen aus. Wenn alle Lipidketten geschmolzen sind ($T = 330 \text{ K}$) bilden sich wiederum kleinere Domänen der beiden verschiedenen Lipidspezies aus. Ein Vergleich der Matrixschnappschüsse bei den Temperaturen 290 K und 330 K zeigt, dass die mikroskopischen DMPC- und DSPC-Gelcluster im Vergleich zu den mikroskopischen, fluiden DMPC- und DSPC-Domänen größer sind. Die Anordnung der Domänen beeinflusst die molekularen Zustandsfluktuationen einzelner Lipidketten (Abb. 4.9). Die Zustandsfluktuationen in einer DMPC:DSPC 50:50-Mischung bei einer Temperatur von 310 K sind über 100 Zyklen gemittelt, in denen lediglich Zustandsänderungen aber keine Diffusionsabfragen erlaubt sind. Diese Fluktuationen werden derart bestimmt, dass einer fluiden Kette ein Wert von 1 und einer gelförmigen Kette ein Wert 0 zugewiesen wird. Für jedes Lipid ergeben sich 100 Werte. Aus diesen 100 Werten ergeben sich $\langle f_i^2 \rangle$ und $\langle f_i \rangle^2$, mit denen die Zustandsfluktuation einer Kette zu $\Delta f_i^2 = \langle f_i^2 \rangle - \langle f_i \rangle^2$ bestimmt wird. Aufgrund der obigen

Wahl der Werte von Eins für fluide und Null für gelförmige Lipide liegen die Werte von Δf_i^2 in einem Bereich von 0 für geringe bis 0.25 für hohe Zustandsfluktuationen.

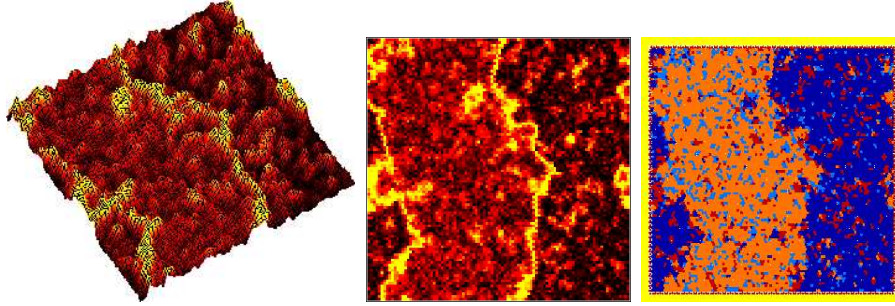


Abbildung 4.9: *Links: Dreidimensionaler Plot der molekularen Zustandsfluktuationen in einer äquimolaren DMPC:DSPC-Mischung bei einer Temperatur von T310 K. Die Farbskala geht hierbei von schwarz (geringe Fluktuationen) über rot (mittlere Fluktuationen) nach gelb (hohe Fluktuationen). Mitte: Draufsicht auf den dreidimensionalen Plot. Rechts: Der Matrixschnappschuss, der den Zustand und die Art des Lipids angibt. Der Farbcode entspricht dem der bereits gezeigten Schnappschüsse.*

In Abbildung 4.9 sind sowohl rechts als auch in der Mitte die Zustandsfluktuationen in einer Skala von schwarz (niedrig) über rot (mittel) bis gelb (hoch) dargestellt. Das rechte Bild zeigt die bekannte Art des Matrixschnappschusses. Aus den drei Bildern ist zu erkennen, dass die Fluktuationen an den Phasengrenzen am größten sind. Dies ist durch die hohen Werte der Wechselwirkungsparameter zwischen gelförmigen und fluiden Lipidketten bedingt. Ebenso fallen höhere Fluktuationen in der fluiden als in der gelförmigen Phase auf. Darstellungen der Fluktuationen der reinen Phasen (Temperaturen 290 K und 330 K) zeigen ebenfalls höhere Fluktuationen in der fluiden als in der gelförmigen Phase (*nicht abgebildet*). Temperaturen, bei denen die Zustandsfluktuationen in der gelförmigen Phase im Vergleich zur fluiden Phase höher sind, sind zunächst einmal nicht auszuschließen. Diesbezüglich sind aber keine systematischen Studien durchgeführt worden, so dass eine weitere Aussage nicht möglich ist.

4.4 Phasenseparation

Das Phasenverhalten idealer und regulärer Lösungen lässt sich mittels Phasendiagrammen beschreiben (Abschnitt 2.2), aus denen in Abhängigkeit der

Temperatur und dem Verhältnis der beiden Spezies zueinander das Verhältnis zwischen fluiden und gelförmigen Molekülen bestimmt werden kann. Von Phasenseparation kann strenggenommen nur dann gesprochen werden, wenn keine Phasengrenzen existieren, wie das bei den idealen und regulären Lösungen der Fall ist.

Das Phasendiagramm des DMPC:DSPC Lipidsystems (Abb. 4.6) ist durch Anlegen von Tangenten an die äußeren Flanken der Wärmekapazitätsprofile bestimmt worden (siehe Abschnitt 2.2). Mit Hilfe der Betrachtung von Matrixschnappschüssen dreier DMPC:DSPC Mischungsverhältnisse (Abb. 4.10 bis 4.12) zu verschiedenen Temperaturen soll die in diesem Lipidsystem stattfindende Ausbildung von mikroskopischen und makroskopischen Domänen verdeutlicht werden. Ebenso lassen sich die Entwicklungen der Wärmekapazitätskurven anhand dieser Bilder verstehen.

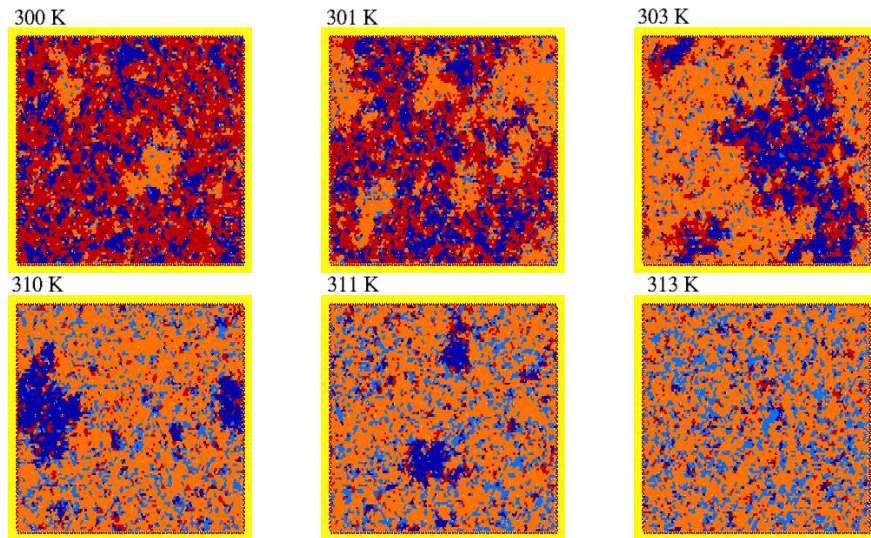


Abbildung 4.10: Schnappschüsse einer 100×100 -Matrix einer DMPC:DSPC 70 : 30 Mischung bei verschiedenen Temperaturen. Betrachten der Wärmekapazitätskurve lässt Maxima bei $T = 301$ K und $T = 310$ K erkennen. Aus dem Phasendiagramm ergeben sich Temperaturgrenzen von $T = 300$ K und $T = 313$ K.

Schnappschüsse bei Temperaturen, die mit den Temperaturgrenzen aus dem Phasendiagramm (Abb. 4.6) identisch sind und Temperaturen an denen ungefähr die Maxima der Wärmekapazitätsprofile liegen sind jeweils abgebildet. Ebenfalls sollen Bilder der Matrix bei Temperaturen um die Maxima den Ablauf der Schmelzumwandlung verdeutlichen. Ist die Temperatur gleich der

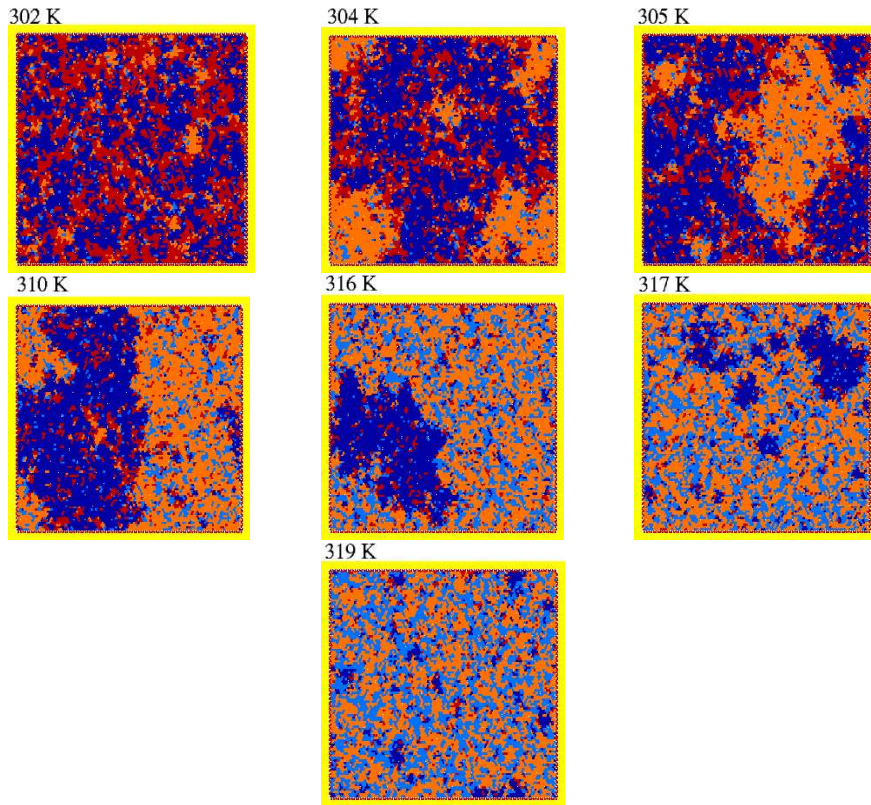


Abbildung 4.11: Für verschiedene Temperaturen sind Schnappschüsse einer äquimolaren DMPC:DSPC-Lipidmischung abgebildet. Die untere Grenztemperatur des Phasendiagramms liegt bei $T = 302$ K und die obere bei $T = 319$ K. Die Maxima des Wärmekapazitätsverlaufs liegen um $T = 304$ K und $T = 317$ K.

unteren Grenztemperatur des Phasendiagramms sind wenige Ketten im fluiden Zustand erkennbar und einzelne kleine, fluide Cluster aus wenigen Ketten lassen sich entdecken. Durch weitere Temperaturerhöhung gehen mehr und mehr Ketten in den fluiden Zustand über. Dies sind hauptsächlich Ketten der Spezies, deren Schmelztemperatur geringer ist (DMPC), als die der anderen (DSPC). Die fluiden Domänen werden größer bis weitere Temperaturerhöhungen zur Ausbildung makroskopischer Domänen führt, die dann die beiden separierten Phasen definieren. Wenige kleinere Domänen des anderen Zustands lassen sich in den makroskopischen Domänen beobachten. Da mit höher werdender Temperatur die Anzahl an gelförmigen Lipidketten abnimmt, werden bei weiterer Temperaturerhöhung die Geldomänen kleiner und es bilden sich kleinere Gelcluster aus, die innerhalb der fluiden Phase

liegen.

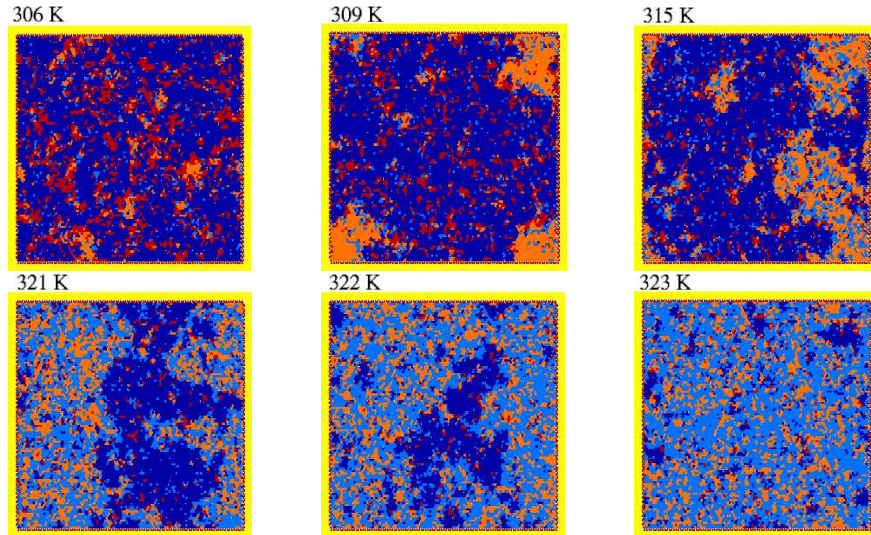


Abbildung 4.12: Die Phasengrenzen einer DMPC:DSPC 30 : 70 Mischung befinden sich bei $T=306\text{ K}$ und $T=323\text{ K}$. Maxima liegen bei $T=309\text{ K}$ und $T=322\text{ K}$. Für diese und für drei weitere Temperaturen sind Schnappschüsse einer 100×100 -Matrix dargestellt.

Die Schnappschüsse zu den drei Mischungsverhältnissen lassen erkennen, wie die Wärmekapazitätsprofile durch die Mischungsverhältnisse beeinflusst werden. Ein hoher Anteil an DMPC-Ketten bewirkt, dass bereits bei relativ niedrigen Temperaturen, die über dem Schmelzpunkt einer reinen DMPC-Lipidmembran liegen, der Schmelzprozess beginnt. Die Kooperativität der Schmelzumwandlung bewirkt ein Schmelzen der DSPC-Ketten bei Temperaturen, die geringer als die Schmelztemperatur des reinen DSPCs sind. Durch einen höheren Anteil an DSPC-Lipiden verschiebt sich die Temperatur, bei der vorwiegend die DMPC-Ketten zu schmelzen anfangen zu höheren Temperaturen. Die Temperatur, bei der hauptsächlich die DSPC-Ketten schmelzen, rückt der Schmelztemperatur der reinen DSPC-Lipidmembran näher.

Domänenbildung wird sowohl durch die konfokalen Fluoreszenzmikroskopiebilder als auch durch die Simulation bestätigt. Die Entwicklung der Domänenbildung kann in Abhängigkeit der Temperatur verfolgt werden. Die Auswirkung auf die Interpretation des Phasendiagramms und eine generelle Diskussion des Modells folgen im nächsten Abschnitt.

4.5 Diskussion: Modell, Phasendiagramm und Domänenbildung

4.5.1 Rechtfertigung des Modells

Obwohl es sich um ein simples und sehr vereinfachendes Modell handelt, können grundlegende thermodynamische Eigenschaften wie Wärmekapazitätsprofile von DMPC:DSPC-Mischungen gut wiedergegeben werden. Es lassen sich geringe Abweichungen feststellen, die mit daran liegen, dass die theoretischen Kurven durch die Wahl der Parameter an die experimentellen Kurven angepasst werden. Die Existenz eines besseren Satzes an Parametern kann nicht ausgeschlossen werden, aufgrund der bereits guten erzielten Übereinstimmungen macht es aber keinen Sinn, einen anderen Satz an Parametern zu suchen. Die Suche nimmt viel Zeit in Anspruch, aber der Erkenntnisgewinn würde sich als gering erweisen. Ebenso ist die Zyklenzahl endlich, so dass Schwankungen im Erscheinungsbild der c_p -Kurven auftreten. Die Fehlerbehaftung der experimentellen Ergebnisse ist ebenfalls zu berücksichtigen. Eine weitere Bestätigung findet das Modell in der Voraussage von Domänenbildung. Die Theorie zeigt im Vergleich zu den präsentierten Fluoreszenzbildern sogar Mikrodomänenbildung. Gelförmige Mikrodomänen konnten aber bereits durch Neutronenbeugung indirekt und durch Atomic Force Microscopy (AFM)⁴ direkt an Lipidmodellsystemen dargestellt werden [27]. Fluide Domänen konnten ebenfalls in einer Größenordnung weniger Nanometer mittels AFM und indirekt mit Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)⁵ Experimenten gefunden werden [54].

4.5.2 Phasendiagramm und Phasenseparation

Die Ausbildung der beobachtbaren Domänen wird durch die gewählten Wechselwirkungsparameter⁶ beeinflusst. Je größer solch ein Parameter ist, desto ungünstiger ist ein Kontakt, der über diesen Wechselwirkungsparameter beschrieben wird. Dies erklärt unter anderem wieso hier die mikroskopischen

⁴ Beim AFM wird eine aus wenigen Atomen bestehende Spitze über die zu untersuchende Fläche geführt. Die auf die Oberfläche wirkende Kraft ist ein Maß für die Struktur der Oberfläche.

⁵ Sind zwei verschiedene Fluoreszenzlabel benachbart, kann ein Energietransfer zwischen diesen beiden stattfinden. Der Energietransfer folgt einem $\frac{1}{r^6}$ -Gesetz. Ein Label ist dabei durch die von einem Laser ausgesendeten Photonen anregbar und das andere Label kann nur dann fluoreszieren, wenn es Energie vom anderen Marker übertragen bekommen hat.

⁶ Diese Parameter sind in Abschnitt 2.3.2 definiert und enthalten die möglichen Wechselwirkungsenergien, wie beispielsweise E_{11}^{ll} oder E_{12}^{gg} .

DMPC- und DSPC-Domänen im Fall eines rein gelförmigen Lipidsystems größer sind als in einer rein fluiden Membran, denn die Wechselwirkungsparameter zwischen fluiden Ketten untereinander sind geringer als die Parameter zwischen gelförmigen Lipiden. Die Wechselwirkungsparameter, die die Wechselwirkungen zwischen fluiden und gelförmigen Lipidketten wiedergeben, sind sehr hoch, was je nach Temperatur zur Bildung makroskopischer Domänen führt. Jedoch sind die Werte nicht so hoch, dass nicht doch einige wenige Lipidketten in der anderen Phase aufzufinden sind. Sugár et al. haben in einer kürzlich erschienen Veröffentlichung diese Feststellungen quantisiert, unter anderem werden Clustergrößen und Perkolationsschwellen⁷ für das DMPC:DSPC Lipidsystem auf Basis des Modells bestimmt [81]. Ab der, aus dem Phasendiagramm bestimmbaren, unteren Grenztemperatur bleibt bei Temperaturerhöhung die Anzahl an fluiden Clustern zunächst einmal konstant bis ungefähr die Temperatur des ersten Wärmekapazitätspeaks erreicht ist. Ab dieser Temperatur beginnen sich makroskopische Domänen auszubilden. Die Perkolationsschwelle der fluiden Cluster wird mit $T = 304.6$ K angegeben [81]. Die Gelcluster perkolieren von niedrigen Temperaturen ausgehend bis zu einer Temperatur von $T = 317.5$ K. Qualitative Vergleiche mit AFM und Elektronenspinresonanz-(ESR)⁸ Experimenten zeigen eine gute Übereinstimmung. Die in dieser Arbeit präsentierten Bilder zeigen ein ähnliches Verhalten.

Diese Resultate zeigen auch, dass sich die DMPC:DSPC Lipidmischungen nicht ideal verhalten, was auch durch das Phasendiagramm deutlich wird (Abb. 4.6). Bei einer idealen Lösung wird davon ausgegangen, dass in den fluiden und gelförmigen Domänen eine statistische Verteilung der Komponenten vorzufinden ist. Dies ist mit einem Wechselwirkungsparameter von Null zu vergleichen. Die gegensätzlichen Phasen mischen sich nicht, so dass deren Wechselwirkungsparameter gegen unendlich geht. Aus den in Abschnitt (2.3.3) dargestellten Werten der Modellparameter ist sofort erkennbar, dass dies in diesem Modell nicht gilt.

Aus den obigen Ausführungen lässt sich folgern, dass die Bestimmung von Phasendiagrammen mittels des Anlegens von Tangenten an die Flanken der Wärmekapazitätsprofile überdacht werden sollte. Nach den Überlegungen aus Abschnitt 2.2 über Phasendiagrammen wird davon ausgegangen, dass in dem

⁷ Hier geben die Perkolationsschwellen an, ab welcher Temperatur die gelförmigen oder die fluiden Cluster perkolieren. Die Schwelle für die fluiden Cluster ist derart definiert, dass von niedrigen Temperaturen ausgegangen die Perkolationsschwelle bei einer höheren Temperatur liegt. Bei den gelförmigen Clustern wird jedoch von hohen Temperaturen ausgegangen und die Perkolationsschwelle liegt bei einer geringeren Temperatur.

⁸ Die Elektronenspinresonanz ist eine spektroskopische Methode, die das magnetische Moment von Elektronen untersucht.

Koexistenzbereich Phasenseparation vorliegt. Hier konnte aber gezeigt werden, dass makroskopische Phasen erst bei einer Temperatur auftreten, die oberhalb der ersten Grenztemperatur liegt. Werden die Temperaturen weiter erhöht, kann schon bei Temperaturen, die unterhalb der zweiten Grenztemperatur liegen, nicht mehr von makroskopischer Phasentrennung gesprochen werden. Michinova–Alexova und Sugár [51] schlagen für die Grenztemperaturen deshalb in Abhängigkeit der Speziesanteile einen Verlauf vor, bei dem die unteren Grenztemperaturen größer sind als die Temperaturen, die mittels der Tangentenkonstruktion ermittelt wurden. Die oberen Grenztemperaturen sind im Vergleich zu den Temperaturen, die aus der Tangentenkonstruktion gewonnen werden, niedriger.

Die Idee der Tangentenkonstruktion kommt aus dem Vergleich mit Wärmekapazitätsprofilen regulärer Lösungen (siehe Abschnitt 2.2.3). Ein Phasendiagramm eines realen Lipidsystems kann mit entsprechenden Wärmekapazitätsprofilen regulärer Mischungen beschrieben werden. Werden für die beiden Phasendiagramme die entsprechenden Wärmekapazitätsprofile regulärer Lösungen gebildet, würde im Vergleich zueinander auffallen, dass die Maxima verschoben sind. Michinova–Alexova’s Interpretation des Phasendiagramms bedeutet, dass das bei der kleineren Temperatur liegende Maximum zu einer höheren und das zu der höheren Temperatur gehörende Maximum zu einer niedrigeren Temperatur verschoben ist.

Die Studien von Sugár et al. [50, 51, 79, 81] und die in dieser Arbeit präsentierten Bilder zeigen, dass die Bestimmung des Phasendiagramms des DMPC:DSPC Lipidsystems mittels des Tangentenverfahrens in Frage zu stellen ist und eigentlich eine andere Art der Bestimmung zu wählen ist.

4.5.3 Vor– und Nachteile des Modells

Es konnte gezeigt werden, dass experimentelle Tatsachen durch das vereinfachende Modell (siehe Abschnitt 2.3) erklärt werden kann. In dieser Einfachheit liegt einer der Vorteile dieses Modells. Die Schmelzumwandlung und auch die Domänenbildung kann durch wenige physikalische Prinzipien erklärt werden. Hierzu gehören die Annahme zweier Lipidkettenzustände, die Existenz von Diffusion, Wechselwirkungsparameter und die Anordnung der Ketten auf einem Gitter.

Der Hauptvorteil liegt darin, dass die in das System einfließenden Parameter direkt aus Experimenten gewonnen werden können. Hierbei sind die Enthalpie– und Entropieänderungen direkt aus den Wärmekapazitätsprofilen der reinen Lipidmembranen zu entnehmen. Die Wechselwirkungsparameter sind durch Anpassen der theoretischen an die experimentellen Kurven festzulegen.

Jedoch offenbart dieses Modell einige ersichtliche Vernachlässigungen. Die Annahme von nur zwei Zuständen ist nicht korrekt. Es existieren intermediäre Zustände wie sie im Pinkmodell [11, 56] eingeführt sind, in dem grundlegende molekulare Prinzipien zur Erklärung der physikalischen Prozesse einer künstlichen Membran herangezogen werden. In dem einfachen Isingmodell ist eine Koexistenz von einer geordneten und einer ungeordneten Kette möglich. Dies wird in einem realen Lipidsystem so nie auftreten. Aus den präsentierten Matrixschnappschüssen zu verschiedenen Temperaturen ist jedoch zu erkennen, dass diese Koexistenz vorwiegend an den Grenzen fluider zu gelförmiger Domänen auftritt. Intermediäre Zustände sind somit vorwiegend für Lipide an den Domänengrenzen zu erwarten. Aufgrund der relativ hohen Wechselwirkungsparameter werden diese Kontakte aber minimal gehalten, so dass in einer hinreichend großen Matrix wenige Lipide mit einer gelförmigen und einer fluiden Kette vorkommen. Somit sollte die Annahme eines Isingmodells der Ketten zu keinen großen Fehlern führen.

Ebenfalls stellt die Annahme eines hexagonalen Gitters eine Vereinfachung dar. Im Niedertemperaturbereich, wo die Lipide in ihrem gelförmigen Zustand sind, sind diese in einer hexagonalen Anordnung orientiert, diese geht aber mit Übergang in die fluide Phase verloren [35]. In der Literatur existieren Nichtgittermodelle, vor allem von den Gruppen um Mouritsen und Zuckermann (z.B. [53, 57]). Diese sind jedoch bei der Beschreibung einfacher Lipidsysteme nicht erfolgreicher, da die Auswirkung des Lipidschmelzens größer ist als das Schmelzen der Gitterstruktur.

Eine weitere Vernachlässigung betrifft das Auftreten der Vorumwandlung, die in reinen Lipidmembranen deutlich beobachtbar ist (siehe Abb. 2.6). Diese Vorumwandlung wird von Heimbürg [31] mit strukturellen und Schmelzprozessen in Verbindung gebracht. Ab einer bestimmten Temperatur bildet sich eine Ripplephase aus, die aus einer räumlichen Anordnung von Domänen aufgrund geometrischer Randbedingungen entsteht. Dies ist in dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell nicht enthalten. Diese Vernachlässigung sollte aber zu keinem großen Fehler führen, da das Modell zur Beschreibung der Hauptumwandlung eines Lipidgemischs gedacht ist.

Im Großen und Ganzen lässt sich feststellen, dass das hier eingeführte Modell messbare Effekte hinreichend gut beschreiben kann und eine Ausweitung des Modells auf das Studium von Diffusionsprozessen als sinnvoll erachtet wird.

Kapitel 5

Diffusion: Resultate und Diskussion

Im vorherigen Abschnitt wurde verdeutlicht, dass mittels des vorgestellten Modells Wärmekapazitätsprofile beschrieben werden können. Domänenbildung läßt sich ebenfalls beobachten und erklären.

Durch die in Abschnitt 2.1.3 erläuterten Monte Carlo Simulations Studien von Saxton ist bekannt, dass Diffusion in biologischen Systemen durch verschiedene Effekte, wie z.B. das Vorkommen von Hindernissen oder Bindungsstellen, behindert werden kann. Hierbei können Hindernisse unter anderem auch Domänen gelförmiger Lipide sein, wie sie auch in den Simulation beobachtbar sind.

In diesem Kapitel sollen Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)– und „Single–Particle Tracking“ (SPT)–Simulationen bei verschiedenen Temperaturen vorgestellt werden. Die Temperaturen sind so gewählt, dass die Diffusionseigenschaften in unterschiedlichen Bereichen des Phasendiagrammes studiert werden können. Die berechneten FCS–Daten können mit ersten experimentellen Daten qualitativ verglichen werden.

Daran schließt sich eine Diskussion der theoretischen und experimentellen Ergebnisse an. Sowohl die experimentelle Methode als auch das theoretische Modell werden kritisch diskutiert.

5.1 FCS: Ensemble und Einzelmolekülsimulationen

In Abschnitt 2.3.4 wurde die Diffusion durch das Austauschen zweier Lipide und Rotationen modelliert. In Abschnitt 3.2.4 wurde erläutert, dass Diffusion in gelförmigen Domänen im Vergleich zur Diffusion in fluiden Domänen ein-

hundertmal unwahrscheinlicher ist. Die Monte Carlo Simulation ermöglicht sowohl Ensemble als auch Einzelmolekülsimulationen zur Untersuchung der Diffusionsprozesse.

5.1.1 Ensemblestudien

Bei den Ensemblestudien ergibt sich das beobachtbare Fluoreszenzsignal aus den Signalen mehrerer Label. Die Autokorrelation spiegelt die Diffusionseigenschaften wieder, die durch all diese Label im Mittel gegeben sind. In Abbildung 5.1 sind zur Verdeutlichung der zeitlichen Entwicklung des Systems zwei Schnappschüsse zu Beginn und am Ende einer Simulation einer DMPC:DSPC 50 : 50-Mischung bei einer Temperatur von $T = 310\text{ K}$ dargestellt. Neben den verschiedenen Lipidspezien in ihren zwei möglichen

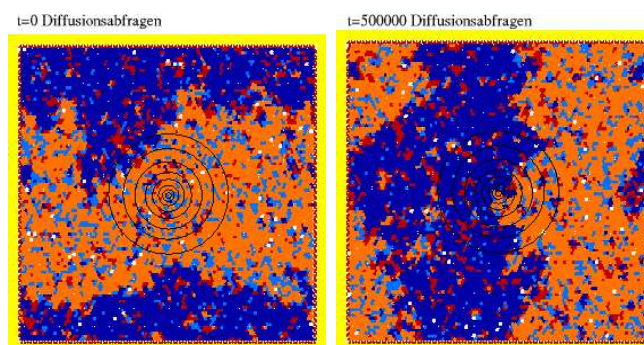


Abbildung 5.1: *Schnappschüsse einer 100×100 -Lipidkettendistribution einer äquimolaren Mischung bei einer Temperatur von 310 K . Die linke Graphik stellt die Lipidkettendistribution zu Beginn und die rechte Zeichnung am Ende der Simulation nach $5 \cdot 10^5$ Diffusionsabfragen dar. Die dunklen Farben repräsentieren gelbförmige Lipidketten. Den DSPC Lipidketten ist ein blauer Farbton zugewiesen und die roten Farben deuten auf eine Belegung mit einer DMPC-Kette hin. Weiße Punkte geben die Position der 50 markierten Lipide an. Die schwarzen, konzentrischen Kreise stellen den gaußförmigen Fokus dar.*

Zuständen sind die markierten Ketten und auch der Fokus gezeigt. Die zeitliche Veränderung des Lipidsystemes ist durch die veränderte Domänenstruktur und die unterschiedlichen Markerdistributionen erkennbar.

Eine DMPC:DSPC 50:50 Mischung wurde auf einem 100×100 Gitter bei den Temperaturen 290 K , 310 K und 330 K simuliert. Die zeitliche Aufnahme der in dieser Simulation gewonnenen Fluoreszenzsignale lässt für unterschiedliche Temperaturen verschieden schnelle Fluktuationen erkennen (Abb. 5.2).

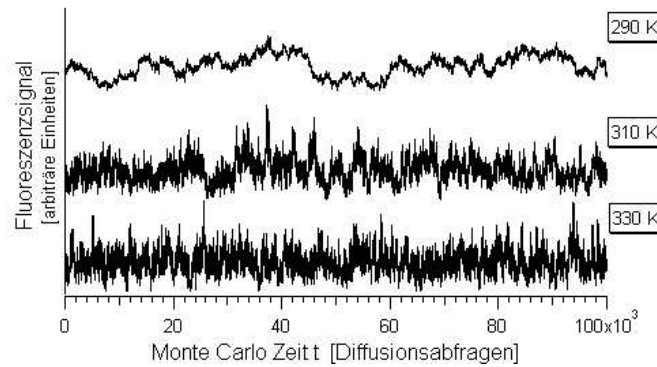


Abbildung 5.2: *Fluoreszenzintensitätsverläufe bei verschiedenen Temperaturen. Eine DMPC:DSPC 50:50 Mischung wurde auf einer 100×100 Matrix simuliert. 50 Ketten waren als fluoreszierend markiert.*

Durch Autokorrelation der gezeigten Intensitätsverläufe ergeben sich Korrelationskurven wie sie in Abb. 5.3 für die drei gewählten Temperaturen gezeigt werden. Von den auf Eins normierten Autokorrelationskurven fällt die zur Temperatur von 330 K gehörende Kurve am schnellsten ab. Bei einer Temperatur von 290 K diffundieren die gelförmigen, markierten Ketten langsam durch den Fokus¹, was sich durch den späten Abfall der Korrelationskurve bemerkbar macht. Im Koexistenzbereich der fluiden und gelförmigen Phase ($T = 310$ K) liegt die Kurve zwischen den beiden Verläufen der reinen Phasen. Die Korrelationskurve spiegelt wieder, dass sowohl fluide als auch gelförmige Lipidketten in dem Lipidsystem diffundieren.

Es lässt sich feststellen, dass die Diffusionseigenschaften von dem Ort im Phasendiagramm des DMPC:DSPC Lipidgemischs (Abb. 4.6) abhängig sind. Aus den Korrelationskurven ist zu erkennen, dass die Diffusionszeit in der fluiden Phase um einen Faktor 100 schneller als in der gelförmigen Phase ist, wie es im Modell vorgegeben ist (siehe Abschnitt 3.2.4).

Es wurde versucht die Korrelationskurven mit den in Abschnitt 3.2.1 vorgestellten Beziehungen zu beschreiben. Hierbei ergaben sich jedoch einige Probleme, die bisher ungelöst sind. So lässt sich der obere Teil der Korrelationskurven bei $T = 290$ K über Gleichung (3.15) gut wiedergeben, aber Versuche die gesamte Kurve zu beschreiben, führen zu großen Fehlern (*nicht abgebildet*). Das Beschreiben der Kurve mit Gleichung (3.15) ist bei $T = 330$ K erfolgreicher, aber auch dort treten Fehler auf. In Abbildung 5.4 ist die oben

¹ Der Fokusradius entsprach bei den vorgestellten Simulationen in etwa der zwanzigfachen Größe der Gitterkonstante.

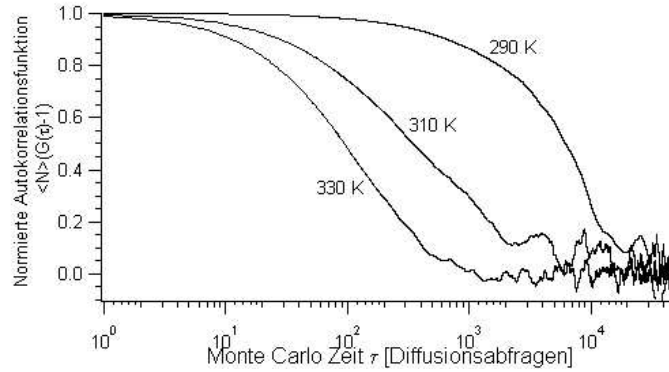


Abbildung 5.3: Korrelationskurven der in Abb. 5.2 gezeigten simulierten Fluoreszenzintensitätsverläufe.

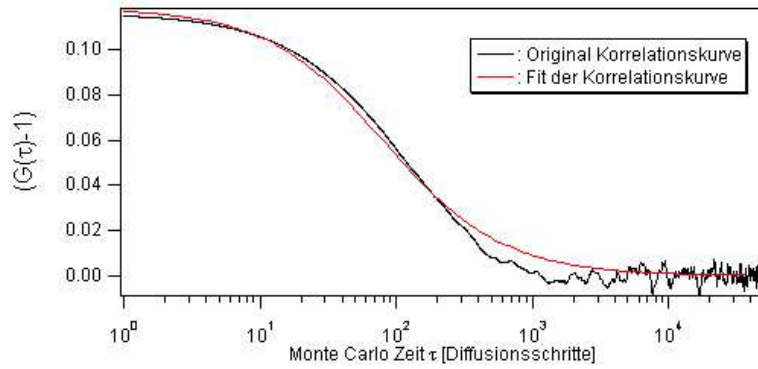


Abbildung 5.4: Die aus der simulierten Fluoreszenzintensitätsspur berechnete Korrelationskurve (s. Abb. 5.2 und 5.3) bei einer Temperatur von 330 K und die entsprechende Fitfunktion (Gleichung 3.15) werden miteinander verglichen.

gezeigte Korrelationsfunktion ($T = 330 \text{ K}$) - diesmal in der nichtnormierten Form- mit dem gefitteten Verlauf gemeinsam dargestellt. Die Fitfunktion wird durch $G(\tau) = \frac{1}{8.43} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{81.57}} \right)$ beschrieben. Abweichungen sind zu erkennen, die insbesondere im unteren Teil der Kurve stärker werden. Mögliche Gründe für die Abweichungen sollen in Abschnitt 5.5.1 diskutiert werden. Die aus den Simulationen erhaltenen theoretischen FCS-Ergebnisse sollen mit FCS-Messungen an zweikomponentigen Lipidsystemen verglichen werden. Damit soll gezeigt werden, dass sich mit dem eingeführten Modell die FCS-Messungen simulieren lassen. Ebenfalls soll mit dem Vergleich die Zeit-

skala der Monte Carlo Simulation geeicht werden. Die Monte Carlo Simulation besitzt eine Entsprechung in Echtzeit, die aber ohne einen Vergleich mit Experimenten nicht zugänglich ist. Zum Vergleich der theoretischen und experimentellen Daten werden zum Einen Ergebnisse aus der Literatur, die durch Messungen an „Giant Unilamellar Vesicles“ (GUV's) gewonnen wurden [39] und zum Anderen eigene Ergebnisse herangezogen. Die eigenen Messungen werden an mehrschichtigen planaren Membranen durchgeführt (Abschnitt 5.2).

Die bisher präsentierten simulierten Fluoreszenzspuren und deren zugehörigen Autokorrelationsfunktionen basieren jedoch auf der Simulation einzelner Monoschichten. Es besteht jedoch die Möglichkeit unabhängig voneinander durchgeführte Simulationen durch Addition der einzeln gewonnenen Fluoreszenzintensitäten miteinander zu kombinieren. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die laterale Diffusion nur durch die Lipidketten beeinflusst wird, die zur zugehörigen Lipidmonoschicht gehören. Eventuell auftretende Wechselwirkungen zwischen den Schichten werden vernachlässigt.

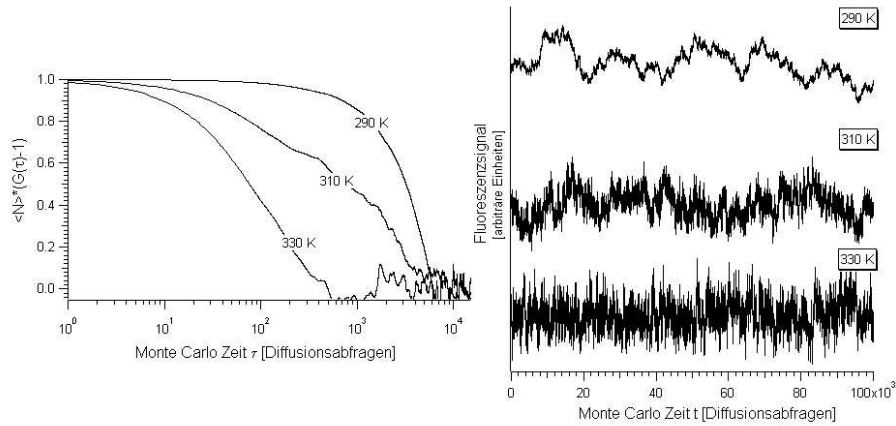


Abbildung 5.5: Zehn verschiedene Simulationen einer DMPC:DSPC 50 : 50 Mischung sind bei drei verschiedenen Temperaturen an einer 100×100 -Matrix durchgeführt worden. Die über 10^5 Diffusionsabfragen gewonnenen Fluoreszenzintensitäten sind dann für jede Temperatur addiert worden und ergeben ein gemeinsames Signal (rechts). Die Autokorrelationskurven dieser Signale sind links abgebildet.

In Abb. 5.5 werden die Ergebnisse aus Multilayersimulationen gezeigt, die bei Temperaturen von 290 K, 310 K und 330 K durchgeführt wurden. Hierbei sind zehn voneinander unabhängige Simulationen über 10^5 Diffusionsabfragen durchgeführt und deren Fluoreszenzsignale durch Addition überlagert

worden. Die so neugewonnenen Intensitäten der drei Temperaturen können wie gehabt autokorreliert werden. Es ergeben sich Korrelationskurven, die denen aus Abb. 5.3 gleichen. Es lassen sich wieder drei verschiedene Bereiche entdecken. Diffusion in den reinen Phasen und die Kombination aus einer langsamen und schnellen Diffusion bei einer Temperatur von 310 K. Die Diffusionszeiten in den rein fluiden und den rein gelförmigen Phasen entsprechen den Zeiten, die sich aus den in Abb. 5.3 abgebildeten Korrelationskurven ergeben. FCS-Messungen an übereinanderliegenden Lipiddoppelschichten sollten somit zu ähnlichen Ergebnissen wie Messungen an einer einzelnen Lipiddoppelschicht führen. In dem realen System können Beeinflussungen der Lipiddoppelschichten untereinander nicht ausgeschlossen werden, so dass die Diffusionskoeffizienten voneinander abweichen könnten. In Abschnitt 5.2 werden Messungen an planaren multilamellaren Lipidmembran vorgestellt. Zuvor sollen aber Simulationen von FCS-Experimenten an einzelnen Molekülen präsentiert werden.

5.1.2 FCS-Simulationen von Einzelmolekülen

Das Verfolgen einer einzigen Kette über die Zeit ermöglicht die Aufnahme der Fluoreszenzintensität dieser einen Lipidkette. Bei den Simulationen werden periodische Randbedingungen benutzt. In Abschnitt 5.4 werden SPT-Simulationen vorgestellt, in denen die periodischen Randbedingungen dahingehend berücksichtigt werden müssen, dass die Kette sich im allgemeinen zu großen Zeiten von ihrem Ausgangspunkt weiter entfernt als es die Gitterkoordinaten wiedergeben. Deshalb werden dabei auch die relativen Positionsänderungen verfolgt (Abschnitt 3.3). Bei den Einzelmolekül-FCS-Simulationen wird dies nicht berücksichtigt. Dies hat keinen Einfluss auf die Physik des Systems und die Aussagekraft des Fluoreszenzsignals, da bei der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie für die Bestimmung der Diffusionseigenschaften lediglich die Diffusionszeit durch den Fokus entscheidend ist.

Es wurde wieder ein äquimolares DMPC:DSPC System und ein 100×100 Gitter gewählt. Die Simulationen werden wieder für drei verschiedene Temperaturen, die drei Bereiche des Phasendiagrammes der DMPC:DSPC Lipidmischung (Abb. 4.6) abdecken, durchgeführt. Bei $T = 290$ K liegt eine rein gelförmige und bei $T = 330$ K eine rein fluide Membran vor. Sowohl makroskopische fluide Domänen als auch makroskopische gelförmige Domänen existieren bei einer Temperatur von 310 K. Aus den Einzelmolekülspuren (Abb. 5.6) ist bereits eine Tendenz zu erkennen, ob die jeweilige Kette schnell oder

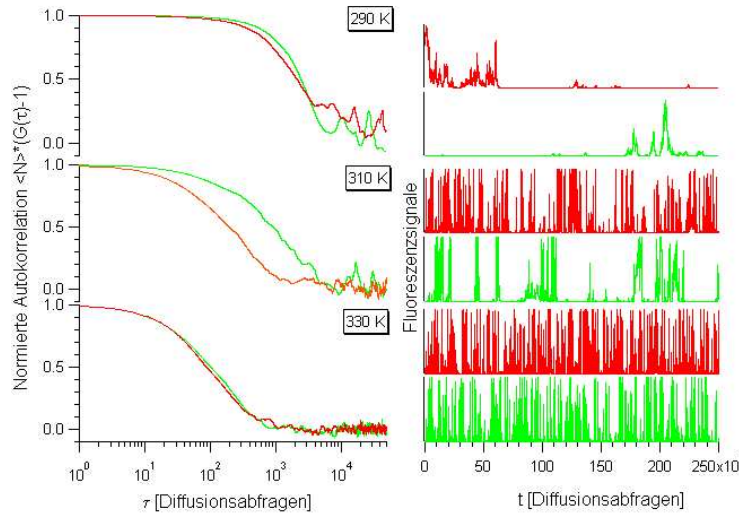


Abbildung 5.6: Einzelmolekulpuren und deren Autokorrelationen: Zu jeder Temperatur sind je eine DMPC- (rote Kurven) und eine DSPC-Kette (grüne Kurven) repräsentiert. Die Autokorrelationskurven sind auf Eins normiert. Die maximale Fluoreszenzintensität beträgt Eins.

langsam durch den Fokus² diffundiert. Die Spuren, die für je eine DMPC- und je eine DSPC-Kette abgebildet werden, lassen bei einer Temperatur von 290 K erkennen, dass die Diffusion langsam ist. Ergibt sich ein Fluoreszenzsignal, so sind über einen längeren Zeitraum deutliche Signale erkennbar. Die Korrelationsfunktion fällt deshalb zu einer relativ späten Zeit ab. Die Intensitätsspuren bei einer Temperatur von 310 K lassen sowohl schnelle als auch langsame Änderungen erkennen. Insbesondere zeigt die DMPC-Kette eine schnellere Diffusion als die DSPC-Kette. Dies ist dadurch bedingt, dass bei einer Temperatur von 310 K DMPC-Ketten mit einer höheren Wahrscheinlichkeit im fluiden Zustand sind als DSPC-Ketten (siehe Kapitel 4). Die beiden Korrelationsfunktionen liegen in einem Bereich, der zwischen den Autokorrelationsverläufen bei den Temperaturen 290 K und 330 K liegt. Die Diffusion bei einer Temperatur von 330 K ist schnell, was sich durch die scharfen Peaks des Fluoreszenzsignals bemerkbar macht.

Die Einzelmolekulpuren ergeben zu den Ensemblesimulationen zusätzliche Informationen über die Mikroumgebung der Ketten, wobei die Ensemblestudien Informationen über das gesamte System liefern.

² Der Radius wurde wieder in einer Größenordnung des zwanzigfachen der Gitterkonstante gewählt.

5.2 FCS-Messungen an planaren Membranen

Im vorhergehenden Abschnitt konnte gezeigt werden, dass mittels des vorgestellten Modells FCS-Experimente simuliert werden können. In Abhängigkeit der Temperatur, die mit verschiedenen Regionen des Phasendiagramms in Verbindung gebracht werden kann, lassen sich unterschiedliche Diffusionsverhalten beobachten.

Die vorgestellten theoretischen Autokorrelationskurven sollen mit experimentellen Daten verglichen werden. Idealerweise hätten die Experimente an einem DMPC:DSPC System durchgeführt werden sollen, um quantitative Vergleiche anstellen zu können, die auch die Eichung der Monte Carlo Zeit auf Echtzeit ermöglichen würde. Bis zum jetzigen Zeitpunkt waren diese Messungen jedoch nicht möglich. Aus diesem Grund können zum Vergleich lediglich erste Daten, die an planaren DLPC:DPPC-Lipidsystemen gewonnen wurden, herangezogen werden. Das Phasendiagramm eines DLPC:DPPC Li-

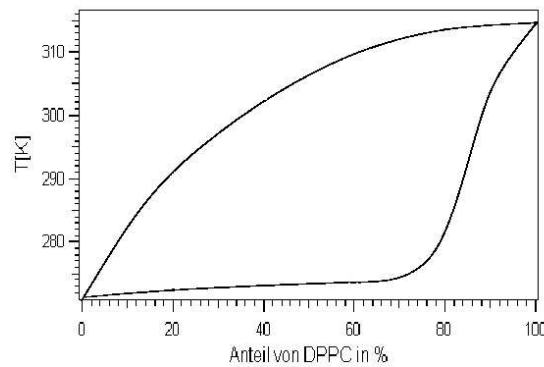


Abbildung 5.7: Aus Wärmekapazitätsprofilen verschiedener DLPC:DPPC Mischungen bestimmtes Phasendiagramm von DLPC:DPPC.

pidsystems ist in Abb. 5.7 gezeigt. Es ähnelt dem Phasendiagramm von DMPC:DSPC (Abb. 4.6). Die Grenztemperaturen sind jedoch zu niedrigeren Temperaturen verschoben. Der Vorteil der DLPC:DPPC Lipidmischungen gegenüber dem DMPC:DSPC Lipidsystem besteht darin, dass bei Raumtemperatur ($T_R \approx 298K$) mit verschiedenen Mischungsverhältnissen unterschiedliche Bereiche des Phasendiagramms untersucht werden können. Reine DLPC-Membranen bestehen aus fluiden Lipiden während sich in reinen DPPC-Membranen alle Lipide in ihrem gelförmigen Zustand befinden. Bei DMPC:DSPC Mischungen liegen bei Raumtemperatur die Lipide immer in ihrem gelförmigen Zustand vor, so dass bei Messungen bei an den DMPC:DSPC Systemen die Membranen temperiert werden müssen. Dies ist

aber mit experimentellen Problemen versehen, die hier aber nicht weiter ausgeführt werden sollen.

Vor den experimentellen FCS-Messungen muss der Fokusradius bestimmt werden (siehe Abschnitt 3.2.3). Dies soll mit Hilfe des bekannten Diffusionskoeffizienten von in Wasser diffundierendem Rhodamin geschehen ($D = 3 \cdot 10^{-3} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$, [39]). Über fünf Minuten wird ein Fluoreszenzsignal einer 10^{-9} M Rhodaminlösung aufgenommen und autokorreliert. Aus der Korrelationskurve ergibt sich der Fokusradius unter Benutzung der dreidimensionalen Autokorrelationsfunktion (Gl. 3.12) und dem bekannten Diffusionskoeffizienten von Rhodamin. Im Anschluss daran können die auf die Quarzträger aufgebrachten planaren Lipiddoppelschichten auf deren Diffusionsprozesse hin untersucht werden. Die in den übereinanderliegenden Lipiddoppelschichten diffundierenden TRITC DHPE Fluoreszenzlabel³ bewirken Schwankungen des Fluoreszenzsignals. Aus der Beschreibung der erhaltenen Korrelationskurven mit Gl. (3.15) ergeben sich die Diffusionszeiten der diffundierenden Label.

In Abbildung 5.8 sind unter anderem Korrelationskurven aus FCS-Messungen von Rhodamin, DLPC+TRITC und DPPC+TRITC abgebildet. Bei diesen Messungen ist eine $100 \mu\text{m}$ -Lochblende verwendet worden und es wurde unter Raumtemperaturbedingungen experimentiert. Dabei sollten die DLPC-Lipide in ihrem fluiden und die DPPC-Lipide in ihrem gelförmigen Zustand sein. Unterschiedliche Diffusionszeiten sind für die drei Messungen zu erkennen. Das frei diffundierende Rhodamin diffundiert im Vergleich zu den TRITC DHPE Labeln in der DLPC und DPPC Umgebung am schnellsten. Die Diffusion in der fluiden Phase ist wiederum schneller als in dem gelförmigen Lipidsystem. Auswerten der aus der Rhodamin erhaltenen Korrelationskurve ergibt einen Fokusradius von $r_0 = 579.65 \text{ nm}$. Damit ergeben sich die Diffusionszeiten und -konstanten der in den beiden Lipidsystemen diffundierenden Labeln zu:

- DLPC+TRITC DHPE: $\tau_d = 58.6 \text{ ms}$, $D = 1.43 \cdot 10^{-8} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$
und
- DPPC+TRITC DHPE: $\tau_d = 1120.0 \text{ ms}$, $D = 7.36 \cdot 10^{-10} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$.

Vor kurzem sind A. Haç erste Messungen an planaren DLPC:DPPC 50:50 Membranen gelungen. In Abb. 5.8 ist ebenfalls eine Korrelationskurve abgebildet, die durch FCS-Messungen an planaren DLPC:DPPC 50:50 Membranen ermittelt wurde. Zum Beschreiben des Kurvenverlaufs sind zwei Diffusionszeiten nötig (siehe Gleichung 3.18), die sich zu $\tau_1 =$

³ Siehe Abschnitt 3.2.3 und Anhang B.

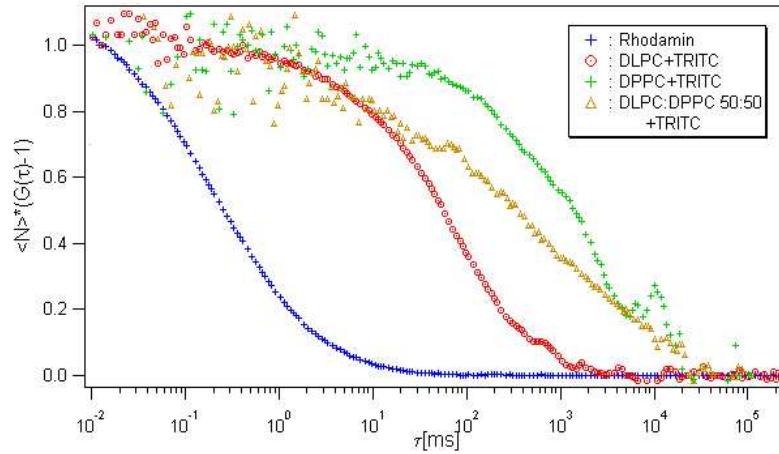


Abbildung 5.8: Autokorrelationsfunktionen die durch FCS-Messungen an in Wasser diffundierendem Rhodamin und von in einer reinen DLPC-Lipidmembran und in einer reinen DPPC-Membran diffundierenden TRITC DHPE Farbstoffs stammen. (Die FCS-Messung am DLPC:DPPC 50:50 System sind von A. Haç durchgeführt und die bisher unveröffentlichten Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden.)

$11.40 \cdot 10^{-3}$ s und $\tau_2 = 1.13$ s ergeben. Diese Diffusionszeiten ergeben bei einem zuvor ermittelten Fokusradius von $r_0 = 460$ nm Diffusionskoeffizienten von $D_s = 4.47 \cdot 10^{-8}$ cm²/s für die schnell diffundierende und $D_l = 4.44 \cdot 10^{-10}$ cm²/s für die langsame Komponente. Die ermittelten Diffusionskoeffizienten liegen in Größenordnungen, die den Diffusionskoeffizienten in rein fluiden bzw. rein gelförmigen DLPC bzw. DPPC Lipidmembranen entsprechen. Die Beschreibung der Korrelationskurve mit Gleichung (3.18) ergab weiterhin, dass die schnelle Komponente zu 36% und die langsame Komponente zu 64% in die Beschreibung eingingen.

Die Fokusradien in den vorgestellten Messungen an den rein fluiden bzw. rein gelförmigen Membranen und in den Messungen an dem DLPC:DPPC 50:50 Lipidsystem unterscheiden sich. Dies ist bei der Darstellung in Abb. 5.8 berücksichtigt. Aus den beiden Radien $r_0^{(1)} = 579.65$ nm und $r_0^{(2)} = 460$ nm lässt sich schließen, dass die Diffusionszeiten in den Messungen um ca. einen Faktor 1.59 differieren müssen. Daraus folgt, dass die Zeitskala der zur DLPC:DPPC 50:50 Lipidmischung gehörenden Autokorrelationskurve um diesen Faktor multipliziert werden muss. Ein Vergleich der Korrelationskurven lässt erkennen, dass diese Kurve zwischen den beiden durch Messungen an reinen DLPC bzw. DPPC Membranen ermittelten Autokorrelationskur-

ven liegt.

Die Messungen an den fluiden planaren DLPC–Lipidschichten sind gut reproduzierbar. Auch die Beschreibung mit Gleichung (3.15) zeigt eine gute Übereinstimmung. Dies gibt Abb. 5.9 wieder. Dies gilt für die gelförmigen

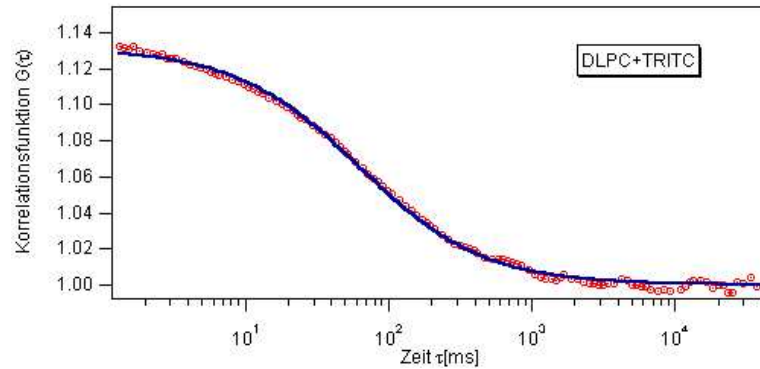


Abbildung 5.9: Die aus den gemessenen Intensitätsschwankungen berechnete Korrelationskurve (rote Marker) im DLPC+TRITC DHPE System ist mit Gleichung (5.8) beschrieben. Die Fitkurve ist durchgezogen und blau eingezeichnet.

DPPC–Systeme nicht mehr.

Ein Problem liegt dabei an der langsamen Diffusion der Fluoreszenzlabel durch den Fokus. Eine lange Aufenthaltsdauer im Fokus bedeutet, dass die Label oft Photonen absorbieren und auch emittieren. Im allgemeinen werden 10^4 Photonen eines Labels detektiert, bevor dieses die Fähigkeit zum Fluoreszieren verliert, es bleicht. Tritt Bleichen auf, kann dies an der sinkenden mittleren Fluoreszenzintensität erkannt werden. Dies erschwert dann oftmals das Feststellen der Diffusionszeit des Fluoreszenzmarkers. Um das Bleichen zu vermeiden, muss die Anregungsintensität des Lasers durch die Verwendung von Filtern möglichst gering gehalten werden. Dies führt jedoch zu einem schwachen Signal, wodurch die Qualität der Korrelationskurve leidet.

Ein weiteres Problem liegt im möglichen Ablösen von Membranfragmenten. Wird das Wasser, welches zum Hydratisieren der Membran auf diese gegeben wird, nach Beendigung des Hydratisierens nicht abgesogen, kommen während der Messung unerwartet große Fluoreszenzintensitäten über eine längere Zeit in den Fluoreszenzsignalen vor. Dies beruht vermutlich auf größere in dem destillierten Wasser diffundierenden Membranstücken. Aus diesem Grund sollte nach dem Hydratisieren jedesmal der restliche Wassertropfen abgesogen werden.

5.3 Vergleich theoretischer und experimenteller Korrelationskurven

Die bisherigen experimentellen Daten zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, an dem vorgestellten unterstützten Doppelmembranschichtsystem FCS-Messungen durchzuführen. Vergleiche dieser experimentellen Ergebnisse mit den präsentierten theoretischen Ergebnissen zeigen, dass die Kurvenverläufe der berechneten Korrelationsfunktionen qualitativ mit den durch die FCS-Messungen an den planaren Membranen gewonnenen Kurvenverläufen übereinstimmen.

Korlach et al. haben ähnliche Korrelationskurven, die an GUV's verschiedener DLPC:DPPC Mischungen gemessen sind, publiziert [39]. Diese werden in Abb. (5.10) gezeigt. Die FCS-Messungen sind bei Raumtemperatur

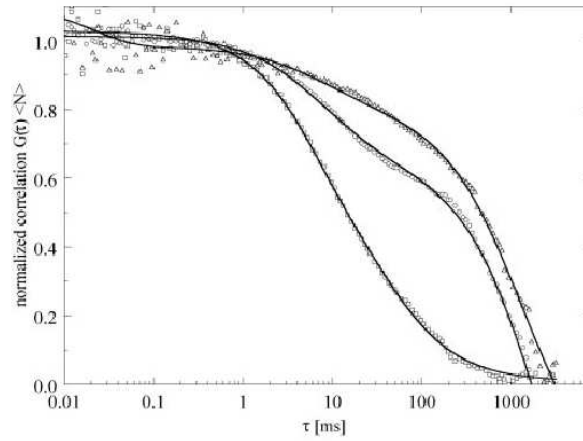


Abbildung 5.10: Von Korlach et al. [39] sind Korrelationskurven, die durch Messungen an GUV's verschiedener DLPC:DPPC Mischungen (100 : 0 (\square), 60 : 40 (\circ) und 20 : 80 (\triangle)) gemessen sind, publiziert. Diese Abbildung stammt aus der Originalpublikation von Korlach et al.

$T_R \approx 298$ K durchgeführt worden, so dass die genutzten Mischungsverhältnisse unterschiedliche fluide und gelförmige Anteile besitzen. Eine DLPC:DPPC 100 : 0 Mischung besteht bei dieser Temperatur aus fluiden Lipiden, da der Schmelzpunkt von DLPC bei $T = 271$ K liegt. Mit steigendem Anteil von DPPC ($T_m = 314.5$ K) befinden sich immer mehr Lipidketten im ungeordneten Zustand. Eine Komposition von 60:40 heisst nicht, dass 60% der Lipide fluid und 40% gelförmig sind. Das Verhältnis muss mittels des Hebelgesetzes aus dem Phasendiagramm bestimmt werden (siehe Abschnitt 2.2). Wich-

tig ist, dass sich sowohl gelförmige als auch fluide Domänen ausbilden. Aus herstellungstechnischen Gründen haben Korlach et al. anstelle eines komplett gelförmigen GUV's die 20 : 80 Mischung gewählt, die hauptsächlich aus gelförmigen Lipiden besteht. Die in dieser Arbeit vorgestellten theoretischen und experimentellen Kurven entsprechen qualitativ denen von Korlach. Kurze Diffusionszeiten für die rein fluiden Lipidsysteme und lange Diffusionszeiten für die gelförmigen Lipidsysteme. Im Koexistenzbereich bilden sich Kurven aus, die sowohl die Diffusion fluider Lipidketten als auch die Diffusion gelförmiger Lipidketten wiedergibt.

5.4 Theoretische Ergebnisse der Single-Particle Tracking Simulationen

Lipidketten diffundieren in ihrem gelförmigen Zustand langsamer als in ihrem fluiden Zustand, wie es im vorherigen Abschnitt durch FCS-Experimente verdeutlicht wurde. Dieser experimentelle Fakt ist im Modell enthalten (siehe Abschnitt 3.2.4). Bisher konnte dargestellt werden, dass sich FCS-Experimente mit dem eingeführten Modell qualitativ beschreiben lassen.

Die Position einer Kette lässt sich ebenfalls verfolgen und aus den daraus erhaltenen Trajektorien lässt sich bereits die unterschiedlich schnelle Diffusion fluider und gelförmiger Ketten erkennen. Als Beispiel sind drei Ausschnitte aus einer Positionsspur einer DMPC-Kette, die bei einer Temperatur von 310 K in einer DMPC:DSPC 50 : 50 Lipidmischung diffundiert, zu verschiedenen Zeiten in Abb. 5.11 dargestellt. Die Ausschnitte geben jedesmal die Positionsänderungen in einem Zeitintervall von 200 Diffusionsabfragen wieder. Ein Ausschnitt zeigt den Fall, dass die Kette die gesamten 200-Diffusionsabfragen über im fluiden Zustand ist. Zu einem anderen Zeitpunkt kann die Kette das gesamte Zeitintervall über im gelförmigen Zustand sein. Ein dritter Ausschnitt repräsentiert die Möglichkeit, dass sich der Zustand der Kette in dem beobachteten Zeitintervall zweimal ändert. Über die ersten 50 Diffusionsabfragen befindet sich die DMPC-Kette in ihrem ungeordneten Zustand, anschließend im gelförmigen Zustand und die letzten 50 Diffusionsabfragen wieder im fluiden Zustand.

Der quadrierte Abstand zwischen Anfangs- und Endpunkt ist die quadratische Verschiebung. Das Mitteln mehrerer quadratischer Verschiebungen (r_i^2) zum gleichen Zeitintervall Δt ergeben den „Mittleren Quadratischen Abstand“ (MSD):

$$\langle r^2(\Delta t) \rangle = \frac{1}{N_A} \sum_{i=1}^{N_A} r_i^2(\Delta t) .$$

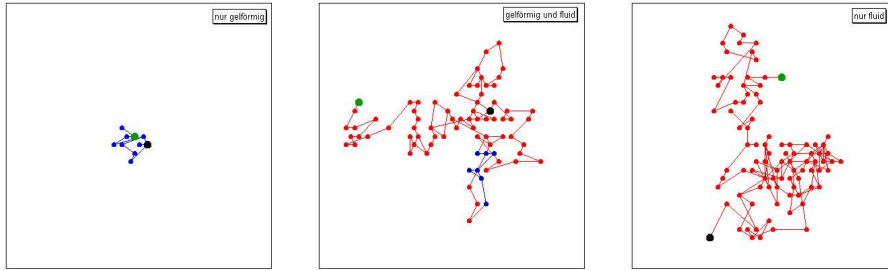


Abbildung 5.11: Bei einer Temperatur von 310 K sind drei Ausschnitt zu verschiedenen Zeiten einer Trajektorie einer DMPC-Kette dargestellt. Links befindet sich die DMPC-Kette über 200 Diffusionsabfragen im gelförmigen Zustand. Die mittlere Graphik gibt eine Situation wieder, in der sich die Kette zunächst 50 Diffusionsabfragen in ihrem fluiden Zustand befindet. Anschließend ist sie über 100 Diffusionsabfragen gelförmig und über die letzten 50 Diffusionsschritte ist sie fluid. Die rechte Abbildung repräsentiert den Fall, dass die Kette die 200 Diffusionsabfragen über im fluiden Zustand ist. Die blaue Farbe repräsentiert den gelförmigen und die rote Farbe den fluiden Zustand. Der grüne Marker gibt jeweils den Anfangs- und der schwarze jeweils den Endpunkt nach den 200-Diffusionsabfragen an. Die eingezeichnete Fläche ist jeweils $15 \text{ nm} \times 15 \text{ nm}$ groß.

N_A gibt dabei die Anzahl an quadratischen Verschiebungen an, über die gemittelt wird. Die Analyse des MSD oder der quadratischen Änderungen enthält Aussagen über die Diffusion der beobachteten Lipidketten.

Aus den verschiedenen Trajektorien können mittels der Methode der „Mittelung über alle Paare“ (siehe Abschnitt 3.3) die MSDs einzelner Trajektorien gebildet werden. Diese lassen sich dann wiederum mitteln. Von normaler Diffusion wird gesprochen, wenn das erhaltene MSD einem linearen Zeitgesetz folgt. Bei anomaler Diffusion geht dieses lineare Verhalten verloren und das MSD folgt einem t^α Gesetz (Abschnitt 2.1.1).

Jedoch enthalten auch schon die quadratischen Verschiebungen Informationen über den Zustand einer Lipidkette. In Abbildung 5.12 sind für die Temperaturen 290 K, 310 K und 330 K der Unterschied der quadratischen Verschiebung zum Zeitpunkt $t + \Delta t$ zur quadratischen Verschiebung zur Zeit t zu verschiedenen Zeiten abgebildet:

$$\Delta r^2 = r^2(t + \Delta t) - r^2(t). \quad (5.1)$$

Es sind jeweils eine DMPC- und eine DSPC-Kette repräsentiert. Bei 290 K sind die Ketten meistens im gelförmigen Zustand. Bei $T = 330 \text{ K}$ sind die

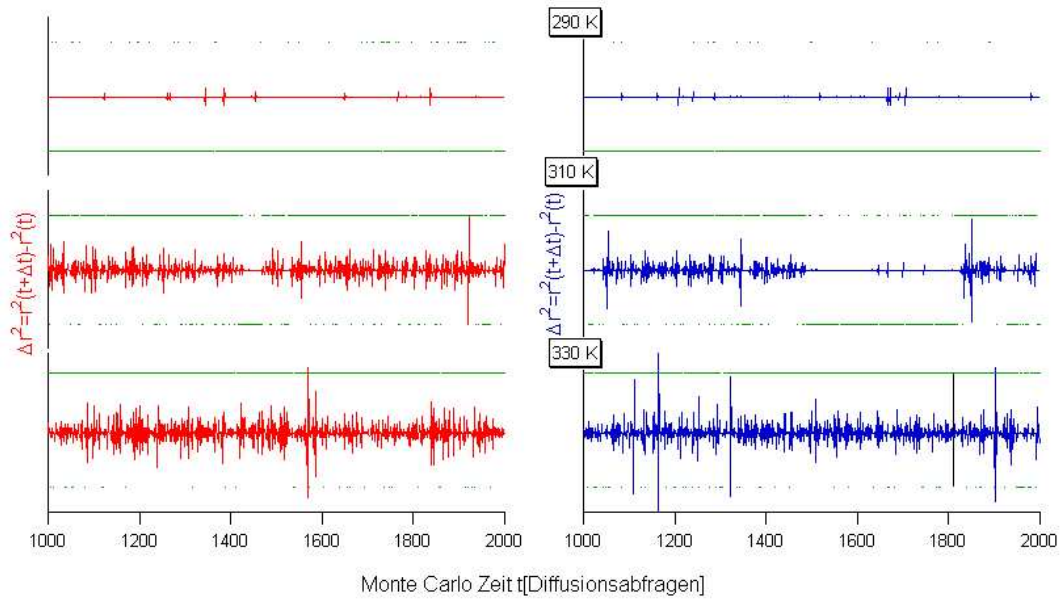


Abbildung 5.12: Für die drei Temperaturen 290 K, 310 K und 330 K sind jeweils $\Delta r^2 = r^2(t + \Delta t) - r^2(t)$ und der Zustand der Kette für je eine DMPC- (links) und je eine DSPC-Kette (rechts) abgebildet. Die Graphen sind so gezeichnet, dass der oberste Punkt $+20 \text{ nm}^2$ und der unterste Punkt -20 nm^2 entsprechen. Die Zustände der Ketten können an den grünen Punkten erkannt werden. Sollten sie sich in der oberen Hälfte des jeweiligen Graphen befinden, ist die Kette ungeordnet, ansonsten geordnet.

Ketten meistens fluid. In Abb. 5.12 ist zu erkennen, dass die Änderungen der quadratischen Abweichungen bei niedriger Temperatur (290 K) gering und bei einer großen Temperatur (330 K) hoch sind. Die roten (DMPC) und blauen (DSPC) Kurvenverläufe bei einer Temperatur von 310 K lassen verschiedene Bereiche erkennen. In einigen Bereichen sind die Änderungen groß und zu anderen Zeiten gering. Dies kann mittels der Angabe der Zustände mit dem Aufenthalt in verschiedenen Domänen in Verbindung gebracht werden. Die Wahrscheinlichkeit eine Lipidkette in einem bestimmten Zustand zu finden ist in einer diesem Zustand entsprechenden Domäne höher als in einer Domäne des anderen Zustands. Befindet sich eine Kette über einen längeren Zeitraum in einem bestimmten Zustand, so ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass sich die Kette in einer Domäne dieses Zustands aufhält. Die diffundierenden Lipidketten halten sich bei einer Temperatur von 310 K mal in einer fluiden Domäne, in denen die Unterschiede der quadratischen Abwei-

chungen hoch sind, und mal in gelförmigen Domänen auf. In den gelförmigen Domänen sind die Unterschiede der quadratischen Abweichungen gering. Wie gesehen, lassen sich also bereits aus den quadratischen Abweichungen Informationen über das verfolgte Teilchen gewinnen. Jedoch enthält das MSD detailliertere Aussagen über die Diffusionsprozesse eines diffundierenden Teilchens.

Zunächst soll die Diffusion in den reinen Phasen betrachtet werden, um im Anschluss daran die Diffusionseigenschaften im Koexistenzbereich von makroskopischen fluiden und gelförmigen Domänen zu diskutieren. Die Ergebnisse wurden durch Simulationen einer DMPC:DSPC 50 : 50 Mischung auf einem 100×100 Gitter ermittelt.

In Abb. 5.13 sind die MSDs je einer DMPC-Kette bei den Temperaturen 290 K und 330 K abgebildet. Bei diesen Temperaturen befinden sich die Ketten, bis auf wenige Ausnahmen, in ihrem gelförmigen bzw. im fluiden Zustand. Die Ergebnisse entstammen einer Simulation einer äquimolaren DMPC:DSPC Lipidmischung auf einer 100×100 Matrix. Auftragen der MSDs gegen die Zeit erweckt zunächst den Eindruck, dass es sich um normale Diffusion beobachtet wird (Abb. 5.13). Beide Kurven lassen sich mittels eines linearen Zeitgesetzes beschreiben:

$$\langle r^2(t) \rangle = 4Dt.$$

Bei einer Temperatur von 290 K ergibt sich:

$$\langle r^2 \rangle = (0.01032 \pm 0.00001) \frac{\text{nm}^2}{\text{Diffusionsabfragen}} \cdot t.$$

Das MSD im Falle von $T = 330$ K kann über

$$\langle r^2 \rangle = (0.79349 \pm 0.00015) \frac{\text{nm}^2}{\text{Diffusionsabfragen}} \cdot t$$

beschrieben werden.

Würde das MSD dieser Ketten tatsächlich linear mit der Zeit anwachsen, sollte $\langle r^2 \rangle / t$ eine Konstante von $4D$ ergeben. Dabei ist D die Diffusionskonstante. Eine Logarithmusbildung würde daran nichts ändern:

$$\log \left(\frac{\langle r^2 \rangle}{t} \right) = \log(4D). \quad (5.2)$$

In beiden doppeltlogarithmischen Auftragungen der Abbildung 5.13 ist zu erkennen, dass sich keine konstanten Geraden ergeben.

Bei $T = 290$ K erscheint zunächst eine Gerade der Steigung Null, die dann von einer linearen Gerade einer Steigung kleiner als Null gefolgt wird und

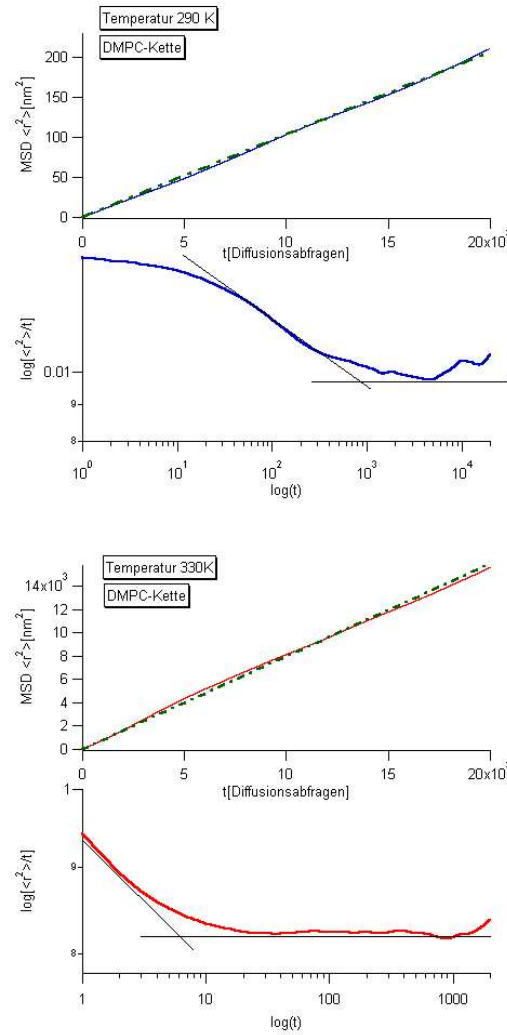


Abbildung 5.13: Von bei den Temperaturen 290 K und 330 K berechnete DMPC–Trajektorien werden die MSDs $\langle r^2 \rangle$ dargestellt und mit einer doppeltlogarithmischen Auftragung werden sie weiter analysiert. Die MSDs (durchgezogene Linien) scheinen mittels eines linearen Zeitgesetzes beschrieben werden zu können (gestrichelte, grüne Linie). Die doppeltlogarithmischen Auftragungen lassen ein Abweichen vom normalen Diffusionsverhalten erkennen.

die anschließend in einen Teil übergeht, der scheinbar um eine konstante Gerade schwankt. Die Kurve bei der Temperatur von 330 K zeigt ähnliches Verhalten, bis auf den Wegfall des ersten, konstanten Teils der Kurve. Bei-

de doppeltlogarithmische Auftragungen zeigen ein Abweichen von normaler Diffusion.

Für den Fall anomaler Diffusion ($\langle r^2(t) \rangle = 4\Gamma t^\alpha$) ergibt eine doppeltlogarithmische–Auftragung:

$$\log \left(\frac{\langle r^2 \rangle}{t} \right) = \log(4\Gamma) + (\alpha - 1) \log t. \quad (5.3)$$

Eine Gerade konstanter Steigung $m = \alpha - 1$ ist zu erwarten. In den Graphen der Abbildung (5.13) sind negative Steigungen erkennbar, so dass $\alpha < 1$ gelten muss. Wird der erste Teil der doppeltlogarithmischen Auftragung bei $T = 290$ K außer Acht gelassen, kann für kurze Zeitskalen festgehalten werden, dass anomale Diffusion beobachtet wird.

Ist der Kurvenverlauf bei langen Zeiten normal, so sollte sich in der doppeltlogarithmischen Darstellung eine Gerade ergeben. Der Kurvenverlauf weicht aber von einer Geraden ab, aber es entsteht der Eindruck, dass die Kurve um eine Gerade schwankt. Um eine Aussage über das Diffusionsverhalten bei langen Zeiten sicher treffen zu können, ist es notwendig ausschließen zu können, dass der beobachtbare Verlauf nicht durch andere Diffusionseigenschaften bedingt ist. Qian et al. [59] haben durch eine Analyse des „Random Walks“ für die „Methode der Mittelung über alle Paare“ festgestellt, dass die Standardabweichung von dem zu erwartenden MSD selbst und der Anzahl an Punkten über die gemittelt wird abhängt. Der analytische Ausdruck für die Standardabweichung σ ist der folgende:

$$\sigma = \begin{cases} (4Dn\Delta t) \cdot \sqrt{\left(\frac{n^2 N_A + 2N_A n - n^3}{6nN_A^2} \right)} & \text{falls } N_A \geq n \\ (4Dn\Delta t) \cdot \sqrt{\left(1 + \frac{N_A^3 - 4nN_A^2 + 4n - N_A}{6n^2 N_A} \right)} & \text{sonst.} \end{cases} \quad (5.4)$$

Hierbei soll Δt die Zeit darstellen, nach der jeweils der Aufenthaltsort des Teilchens gemessen wird. Die Größe $n\Delta t$ definiert die Zeit von dem das MSD gewonnen werden soll. Die Gesamtzahl an quadratischen Abweichungen über die zu einer bestimmten Zeit gemittelt werden soll, wird mit N_A angegeben. Ist N die Gesamtanzahl an Positionsmessungen, berechnet sich N_A zu: $N_A = N - n$. In der Simulation ist Δt mit einer Diffusionsabfrage gleichzusetzen: $\Delta t = 1$ Diffusionsabfrage.

Eine statistische Analyse der durch die Simulationen gewonnenen Spuren und deren MSDs gibt einen Hinweis darauf, in wie weit die Daten bei langen Zeiten tatsächlich auf normale Diffusion hindeuten. In den Abbildungen (5.14) und (5.15) sind die MSDs der Spuren zweier DSPC-Ketten bei den Temperaturen 290 K und 330 K dargestellt. Die Spuren sind durch Simulationen einer 100×100 -Matrix einer DMPC:DSPC 50:50 Mischung gewonnen.

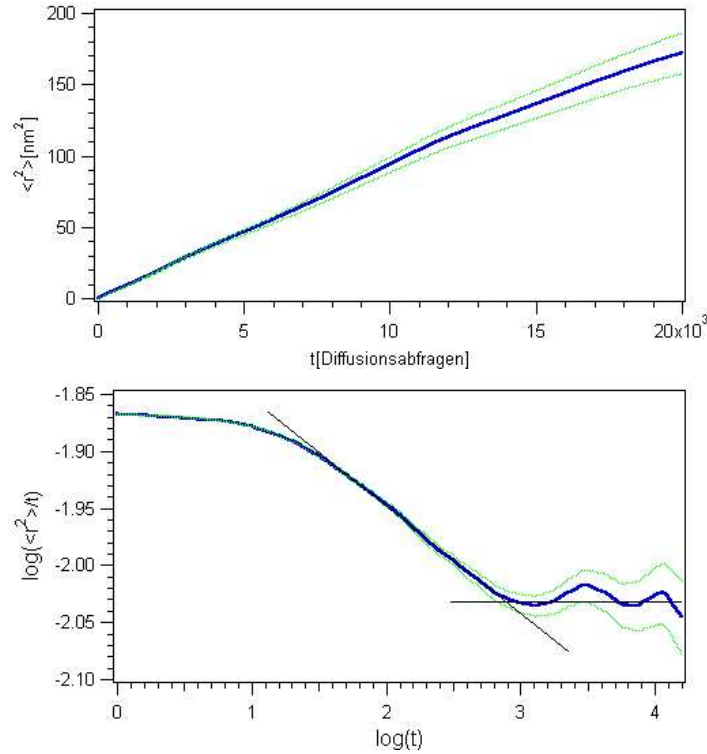


Abbildung 5.14: Oben: Das MSD einer DSPC-Kette bei einer Temperatur von 290 K ist durch die blaue Kurve dargestellt. Zur Ermittlung des MSD ist eine Spur mit $5 \cdot 10^5$ Positionsdaten verwendet worden. Die beiden gepunkteten grünen Kurven sind die Kurven, die durch Addition und Subtraktion der Standardabweichung vom MSD entstehen: $\langle r^2 \rangle + \sigma$ und $\langle r^2 \rangle - \sigma$. Unten: Der bereits bekannte doppeltlogarithmische Plot ist für die drei oben gezeigten Kurven abgebildet.

Ebenfalls sind die Kurven, die sich durch Addition und Subtraktion der Standardabweichungen ergeben, eingezeichnet. Zur Berechnung der Standardabweichung wird Formel (5.4) benutzt und es wird jeweils das MSD (entspricht $4n\Delta t$ in Gl. (5.4).) benutzt, das durch die „Mittelung über alle Paare“ der entsprechenden Positionsmessungen enthaltenen Spur gewonnen wird. Es ist festzustellen, dass die Standardabweichung mit größerer Zeit anwächst. Dies lässt sich auch in den doppeltlogarithmischen Auftragungen von $\langle r^2 \rangle / t$ erkennen. In beiden Fällen lässt sich eine Gerade finden, die zwischen den beiden Kurven, die die Standardabweichungen enthalten, liegt. Es ist aber nicht unwahrscheinlich, falls eine Gerade nicht zu allen Zeiten innerhalb dieses Bereichs liegen sollte. In dem Intervall $[\langle r^2 \rangle - \sigma, \langle r^2 \rangle + \sigma]$ sind im statisti-

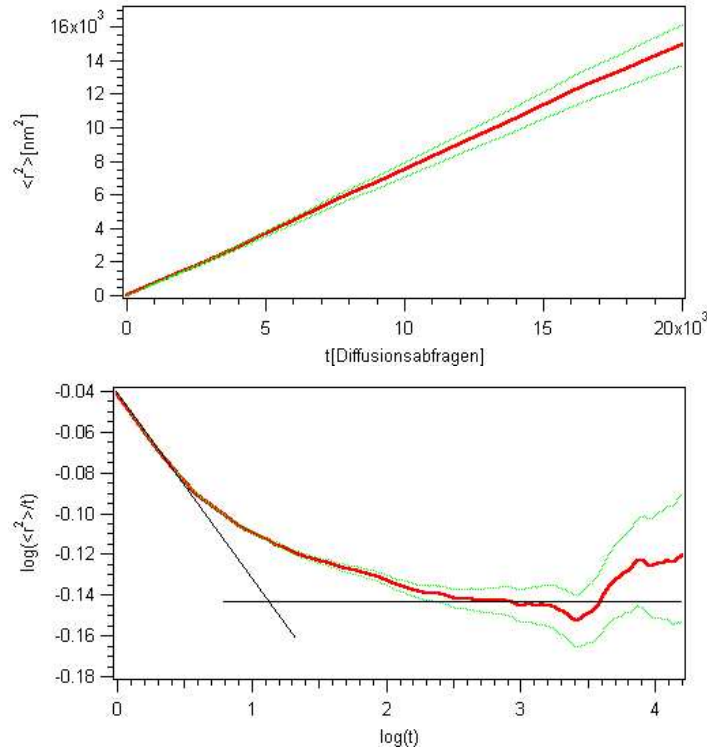


Abbildung 5.15: $5 \cdot 10^5$ Datenpunkte einer DSPC-Kette bei einer Temperatur von 330 K sind ausgewertet worden. Oben wird das berechnete MSD (rot) mit den Kurven, die durch Addition und Subtraktion der Standardabweichung zum MSD ermittelt werden (grüne gepunktete Verläufe), verglichen. Ebenfalls sind die drei dargestellten Kurven durch die Zeit geteilt und in einer doppelt-logarithmischen Auftragung abgebildet.

schen Mittel 68% der MSDs enthalten. Im Intervall $[\langle r^2 \rangle - 2\sigma, \langle r^2 \rangle + 2\sigma]$ sind dies dann bereits 95%. Eine kleine, aber nicht zu vernachlässigende Wahrscheinlichkeit besteht, dass die berechneten von den zu erwartenden MSDs stark Abweichen. Dies wurde von Qian et al. [59] durch Computersimulationen eines „Random Walks“ ebenfalls bestätigt. Aus diesem Grund schlagen sowohl Qian et al. [59] als auch Saxton [68] vor, die MSDs der Trajektorien einzelner diffundierender Teilchen zu bestimmen und diese MSDs miteinander zu mitteln.

Aufgrund der präsentierten Daten lässt sich festhalten, dass bei Temperaturen von 290 K und 330 K ein anomales Diffusionsverhalten bei kurzen und ein normales bei langen Zeiten zu beobachten ist.

Bisher wurden nur die MSDs diskutiert, die sich durch Simulationen bei ho-

hen oder niedrigen Temperaturen, bei denen sich die meisten Lipidketten in ihrem ungeordneten oder geordneten Zustand befinden, ergeben. Bei einer Temperatur von 310 K koexistieren nach den Ausführungen aus Kapitel 4 makroskopische Domänen der fluiden und gelförmigen Lipidketten. Im Zusammenhang mit Abb. (5.12) wurde bereits erläutert, dass schon die Betrachtung der Änderungen der quadratischen Verschiebungen $\Delta r^2 = r^2(t + \Delta t) - r^2(t)$ eine Aussage über die Domänen zulässt (Abb. 5.12). Es stellt sich heraus, dass die Lipidketten häufiger ihren Zustand ändern und mit unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten in den fluiden oder gelförmigen makroskopischen Domänen diffundieren. Mittels der FCS-Simulationen konnte gesehen werden, dass bei einer Temperatur von 310 K zwei verschiedene Diffusionsprozesse zu beobachten sind. Schnelle und langsame Diffusion findet statt. MSDs enthalten diese Informationen nicht, sondern sie mitteln über die beiden Diffusionsprozesse, so dass sich ein Mittelwert ergeben sollte, der zwischen den MSDs der rein fluiden und rein gelförmigen Lipidmembran liegen sollte. In

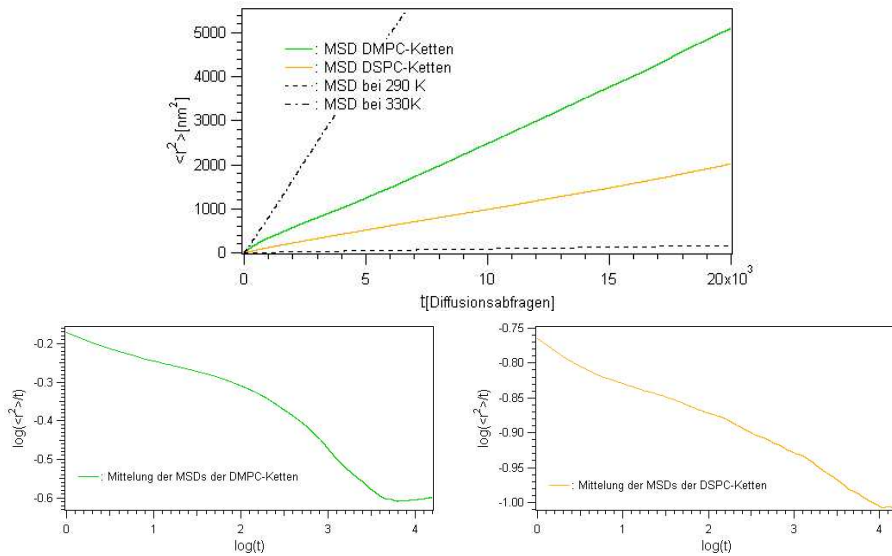


Abbildung 5.16: Oben: Eine äquimolare DMPC:DSPC Mischung wurde auf einer 100×100 großen Matrix simuliert. Die Temperatur betrug dabei 310 K. Die Trajektorien von jeweils zwei DMPC- und DSPC-Ketten sind verfolgt und 50^5 Positionen aufgenommen worden. Mit diesen Daten wurde ein gemittelt MSD der DMPC- (grün) und ein gemittelt MSD der DSPC-Ketten (orange) berechnet. Ergänzend sind MSDs bei den Temperaturen 290 K und 330 K eingezeichnet (schwarz, gestrichelt). Unten: Doppeltlogarithmische Auftragung der beiden MSDs.

Abbildung (5.16) sind zwei MSDs abgebildet, die aus Daten, die aus einer Simulation einer DMPC:DSPC 50:50 Mischung bei einer Temperatur von 310 K stammen, ermittelt wurden. Das eine MSD gibt den Mittelwert zweier MSDs zweier DMPC-Ketten (grüner Verlauf) und das andere MSD den Mittelwert der MSD-Werte, die sich aus zwei verschiedenen DSPC-Spuren ergaben (orangene Kurve), wieder. Beide Kurven liegen wie erwartet zwischen den MSD-Verläufen wie sie sich in den rein fluiden bzw. rein gelförmigen Systemen ergeben. An den beiden zur Temperatur 310 K gehörenden Verläufen ist ebenfalls zu erkennen, dass die DMPC-Lipidketten schneller diffundieren als die DSPC-Ketten. Der Grund für die langsamere Diffusion der DSPC-Ketten liegt darin, dass die Wahrscheinlichkeit bei einer Temperatur von 310 K eine fluide DSPC-Kette zu finden geringer ist als die Wahrscheinlichkeit des Auffindens einer fluiden DMPC-Kette. Werden die beiden MSDs in der bekannten Art und Weise durch die Zeit geteilt und der Logarithmus davon und von der Zeit gebildet, ist auch bei dieser Temperatur zu erkennen, dass es sich nicht um normale Diffusion handelt. Der Übergang von anomaler zu normaler Diffusion findet zu einem späteren Zeitpunkt statt als bei den Verläufen in den Abbildungen (5.14) und (5.15).

Wie die vorgestellten Daten zu interpretieren sind und insbesondere wo die Vor- und Nachteile des benutzten Diffusionsmodells liegen, soll Bestandteil der folgenden Diskussion sein.

5.5 Diskussion: Theorie und Experimente

In diesem Abschnitt sollen die vorgestellten experimentellen und theoretischen Diffusionsstudien einer ausführlichen Diskussion unterworfen werden. Dies betrifft sowohl die physikalischen Ergebnisse als auch die konzeptionellen Schwächen des Modells und der vorgestellten FCS-Experimente an planaren Membranen.

Zunächst einmal soll auf die physikalischen Zusammenhänge eingegangen werden, bevor eine generelle Kritik der Methoden folgt. Den Abschluss dieses Kapitels bildet eine Diskussion der in Abschnitt 2.1 vorgestellten Diffusionskonzepte und eine Erörterung, inwiefern das hier vorgestellte numerische Modell eine sinnvolle Ergänzung zu den bisherigen Diffusionsstudien bildet.

5.5.1 Diffusion und Heterogenitäten

Qualitativ konnte gezeigt werden, dass sich FCS-Experimente mit den vorgestellten Monte Carlo Simulationen und dem zugrundeliegenden Modell beschreiben lassen. Die ausschließlich an äquimolaren DMPC:DSPC Mischung-

en durchgeführten Simulationen wurden bei jeweils drei verschiedenen Temperaturen ausgewertet. Diese drei Temperaturen sind mit drei verschiedenen Bereichen des Phasendiagramms in Verbindung zu bringen. Hierbei sind drei verschiedene Diffusionsprozesse zu beobachten.

Bei einer Temperatur von 290 K sind die Ketten vorwiegend in ihrem geordneten Zustand und die Diffusion langsam. Bei einer Temperatur von 330 K ist schnelle Diffusion zu beobachten, da sich die Lipidketten hauptsächlich in ihrem fluiden Zustand befinden. Dies ist jeweils an der Form der Korrelationskurven zu erkennen; ein Abfall zu frühen Zeiten bei $T = 330$ K und ein späterer Abfall bei $T = 290$ K. Dies entspricht qualitativ den Korrelationskurven, die durch Messungen an den fluiden bzw. gelförmigen planaren Membranen (DLPC bzw. DPPC) ermittelt wurden. Autokorrelationskurven, die zur Diffusion in den fluiden Membranen gehört, zeigt einen Abfall im Bereich von 10 ms und ein Abfall im Sekundenbereich lässt sich für die Autokorrelationskurven beobachten, die die Diffusion in gelförmigen Membranen wiedergeben.

Bei einer Temperatur von 310 K liegt die Korrelationskurve zwischen den beiden anderen Korrelationskurven. Die Kurve zeigt ein Verhalten, das sich durch zwei Diffusionsprozesse interpretieren lässt, wie dies auch Korlach et al. [39] berichten. Die schnelle Diffusion lässt sich mit einer Diffusion in fluiden Domänen und die langsame Diffusion mit einer Diffusion in Domänen bestehend aus gelförmigen Lipidketten erklären.

Die Simulation der Einzelmolekülspuren ist ein Maß für die Mikroumgebung einzelner Lipidketten. Die darin enthaltenen Informationen ergänzen die Ensemblesimulationen, die Aussagen über die gesamte Umgebung machen.

Weiterhin können die FCS-Experimente und Simulationen durch das Verfolgen einzelner Lipidketten über die Zeit („Single-Particle Tracking“) ergänzt werden.

Die SPT-Daten wurden zur Berechnung von „Mittleren Quadratischen Abweichungen“ benutzt. Eine Auftragung der MSDs gegen die Zeit erweckte dabei den Eindruck, dass es sich um normale Diffusion zu allen Zeiten handelt, aber die Auftragung des Logarithmus der durch die Zeit geteilten MSDs gegen den Logarithmus der Zeit hat gezeigt, dass das MSD nicht über alle Zeiten einem linearen Zeitgesetz folgt, sondern erst zu langen Zeiten normale Diffusion auftritt. Zuvor ist anomale Diffusion zu beobachten und im Falle der Simulationen bei einer Temperatur von 290 K zeigt die doppeltlogarithmische Auftragung bei sehr kurzen Zeiten ebenfalls ein normales Diffusionsverhalten. Diese anfängliche normale Diffusion könnte als Diffusion in Mikrodomänen einer einzigen Spezies gedeutet werden. Sowohl in den Arbeiten von Sugár et al. [50, 79, 80, 81] als auch in den in dieser Arbeit präsentierten Schnappschüssen der Matrixdistribution konnte gezeigt werden, dass

sich bei einer DMPC:DSPC 50 : 50 Mischung bei niedrigen Temperaturen (z.B. 290 K) gelförmige Mikrodomänen der beiden Lipidspezies ausbilden. Da die Diffusion gelförmiger Lipidketten langsam ist, diffundieren die Ketten auf kurzen Zeitskalen innerhalb der Cluster der eigenen Spezies. Hierbei wird die Diffusion nicht behindert und die Diffusion ist auf mikroskopischen Skalen normal. Der Kurvenverlauf bei einer Temperatur von 330 K zeigt anomales Diffusionsverhalten von Beginn der gezeigten logarithmischen Auftragsungen. Die Mikrodomänen, die sich in einer rein fluiden DMPC:DSPC 50:50 Lipidmischung ausbilden, sind im Vergleich zu denen der rein gelförmigen Lipidmischungen klein. Die im fluiden Zustand schnell diffundierenden Lipidketten sollten innerhalb kurzer Zeit durch die einzelnen Mikrodomänen diffundieren. Existiert ein mikroskopischer Diffusionskoeffizient, so wäre eine andere Zeitauflösung als die bisherige zu wählen. Dafür müsste der Monte Carlo Zyklus umdefiniert werden.

Abgesehen von der normalen Diffusion auf kurzen Zeitskalen tritt bei einer Temperatur von 290 K das anomale Diffusionsverhalten zu mittleren Zeiten und auf langen Zeitskalen normale Diffusion auf. Bei $T=330$ K ist zunächst anomale und dann ebenfalls normale Diffusion erkennbar.

Saxton diskutiert das Auftreten anomaler Diffusion im Zusammenhang mit der Existenz von Hindernissen (siehe Abschnitt 2.1.3). Die in dieser Arbeit beobachtbare anomale Diffusion kann ebenfalls mit Hindernissen in Verbindung gebracht werden. Für die diffundierenden Lipide bilden dabei die Lipide der anderen Spezies bzw. die mikroskopischen Domänen die Hindernisse. Diese sind nicht immobil, sondern verändern sich mit der Zeit und Lipidketten der jeweils anderen Spezies können in die Domänen der anderen Spezies diffundieren. Die Lipide der anderen Spezies werden als Hindernisse wahrgenommen, da sich die rein gelförmigen und rein fluiden DMPC:DSPC Mischungen nicht ideal mischen, d.h. Wechselwirkungen zwischen den beiden Spezies treten auf.

Saxton führt zur Charakterisierung der anomalen Diffusion eine Kreuzungszeit T_{CR} und eine Kreuzungslänge R_{CR} ein [66]. Die Kreuzungszeit T_{CR} ist die Zeit bei der die Diffusion von anomaler in normale Diffusion übergeht und die Kreuzungslänge die Distanz über die ein Teilchen anomal diffundiert. Die Kreuzungslänge hängt mit der Kreuzungszeit und dem zu großen Zeiten auftretenden Diffusionskoeffizienten zusammen:

$$R_{CR} = \sqrt{D \cdot t_{CR}}. \quad (5.5)$$

Für das MSD gilt dann:

$$\langle r^2 \rangle \propto \begin{cases} t^\alpha & r \ll R_{CR} \\ t & r \gg R_{CR}, \end{cases} \quad (5.6)$$

dabei ist α der aus Abschnitt 2.1.1 bekannte Exponent.

Bei den Temperaturen von 290 K und 330 K unterscheiden sich die Kreuzungszeiten, bei Vernachlässigung des ersten normalen Diffusionsverhaltens bei $T = 290$ K, um einen Faktor 100. Die makroskopischen Diffusionskoeffizienten differieren ebenfalls um einen Faktor von Hundert und da die Kreuzungszeit in dem fluiden Lipidsystem geringer, der Diffusionskoeffizient jedoch höher als im Fall einer rein gelförmigen Matrix ist, ergeben sich in beiden Fällen ungefähr gleiche Kreuzungslängen.

Bei einer Temperatur von 310 K existieren makroskopische fluide und makroskopische gelförmige Domänen. DMPC-Ketten befinden sich bei dieser Temperatur mit einer höheren Wahrscheinlichkeit im fluiden als im gelförmigen Zustand. DSPC-Ketten befinden sich bei dieser Temperatur vorwiegend in ihrem gelförmigen Zustand. Deshalb diffundieren die DMPC-Ketten im Vergleich zu den DSPC-Ketten schneller. Die doppeltlogarithmischen Auftragungen zeigen, dass für beide Ketten über lange Zeiten anomale Diffusion zu beobachten ist. Die Ketten diffundieren schneller als bei einer Temperatur von 290 K und die Kreuzungszeit liegt bei größeren Zeiten, so dass die Kreuzungslänge im Vergleich zu den Kreuzungslängen bei den Temperaturen 290 K und 330 K größer ist. Dies deutet darauf, dass die makroskopischen Domänen die Diffusion stark behindern.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mittels der präsentierten theoretischen SPT-Studien Informationen über die Diffusionsprozesse und deren Beeinflussung durch Mikro- und Makrodomänen gefunden werden können. SPT Experimente sollten durchgeführt werden um die theoretischen Vorhersagen zu bestätigen.

5.5.2 Diskussion des Diffusionsmodells

In den vorherigen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass das vorgestellte Modell in der Lage ist qualitativ ein Fluoreszenzkorrelationsspektroskopieexperiment zu beschreiben. Wie in Messungen konnten unterschiedliche Kurvenverläufe charakterisiert werden.

Jedoch fehlt bisher die Möglichkeit Vergleiche mit FCS-Messungen an DMPC:DSPC Lipidsystemen verschiedener Mischungsverhältnisse heranzuziehen, da diese Experimente noch nicht durchgeführt wurden. Wenn diese Daten zur Verfügung stehen, besteht die Möglichkeit die theoretisch und experimentell gewonnenen Diffusionszeiten qualitativ zu vergleichen. Dies würde unter anderem eine Eichung der Zeitskala der Monte Carlo Rechnung ermöglichen. Diese hat eine Entsprechung in Echtzeit, die aber ohne Experimente nicht zugänglich ist.

Ein Problem stellt die begrenzte Simulationszeit und die damit verbundene

schlechte Statistik dar. Analysen unterschiedlicher Anzahlen an Fluoreszenzdaten zeigen, dass das Rauschen der Korrelationskurven abnimmt, wenn mehr Diffusionsabfragen verfolgt werden. Jedoch bedeutet eine hohe Zahl an Diffusionsabfragen eine hohe Rechenzeit, so dass die Anzahl an Zyklen beschränkt bleiben muss.

In dem Modell werden Annahmen gemacht, die die Modellierung vereinfachen, aber die Realität nicht richtig wiedergeben. Dies wären zum Einen die Annahme instantaner Fluoreszenz, die Vernachlässigung von Dipolorientierungen und zum Anderen die Vernachlässigung von Störeffekten durch die Fluoreszenzmarker.

Bei den FCS-Simulationen wird angenommen, dass instantane Fluoreszenz stattfindet. Dies bedeutet, dass ein Marker direkt nach der Absorption eines Photons emittiert. Reale Label fluoreszieren nicht instantan. Nach der Anregung verbleiben sie zunächst im angeregten Zustand, bevor sie nach ca. $10^{-9} - 10^{-7}$ s ein Photon emittieren.

Im Modell wird angenommen, dass die Orientierung der Dipole bei der Anregung keinen Einfluss hat. In realen Systemen hängt aber die Absorption eines Photons von der Orientierung des Dipols des Fluoreszenzlabels in Bezug auf die Polarisation der einfallenden Lichtwelle ab. Ebenfalls beeinflusst die Orientierung die Polarisation des abgestrahlten Photons.

Bei Betrachtung lateraler Diffusion sollten die Annahme instantaner Fluoreszenz und die Vernachlässigung der Dipolorientierungen die beobachtbaren Diffusionsprozesse richtig wiedergeben.

Weiterhin wird in dem Modell angenommen, dass der Fluoreszenzmarker die physikalischen Eigenschaften der Lipide besitzt. In der Simulation existieren nur DMPC- und DSPC-Ketten, die als fluoreszierend markiert werden können, denen aber keine von den DMPC- und DSPC-Ketten abweichenden Eigenschaften zugewiesen werden. Für real verwendete Label gilt dies nicht, sondern sie unterscheiden sich von den Lipiden. Diese Unterschiede können unter anderem mittels Kalorimetrie verdeutlicht werden. Bei hohen Labelkonzentrationen können Verschiebungen der Wärmekapazitätskurven beobachtet werden. Bei FCS-Messungen sollte sich dies aber nicht stark auswirken, da die Label lediglich in geringen Konzentrationen vorkommen (siehe T. Schlötzer [72]).

Das Single-Particle Tracking erlaubt das Verfolgen einzelner Ketten und ermöglicht die Berechnung der „Mittleren Quadratischen Abweichung“. Hierfür ist es nötig eine Gitterkonstante zu definieren, die mit der Größe eines Lipids zusammenhängt. In dieser Arbeit ist unabhängig von der Temperatur eine Gitterkonstante von 0.5 nm^2 verwendet worden. Diese Temperaturunabhängigkeit ist jedoch in realen Systemen nicht gegeben. Ein fluides Lipid bedeckt im allgemeinen eine um ca. 25% größere Fläche als ein gelförmiges

Lipid. Die Gitterkonstante von 0.5 nm^2 gilt für die Beschreibung bei niedrigen Temperaturen [81], so dass bei einer fluiden Membran eine größere Gitterkonstante anzunehmen wäre. Dabei ist dann aber auch zu bedenken, dass mit höheren Temperaturen die Gitterstruktur in realen Lipidmodellsystemen verloren geht und die Annahme eines Gitters sowieso eine Vereinfachung darstellt.

Jedoch sollten diese beiden Vereinfachungen das Auftreten von anomaler Diffusion nicht erklären, da dieses sowohl bei geringen Temperaturen, bei denen die Lipide auf einem Gitter angeordnet sind, als auch bei hohen Temperaturen zu beobachten ist. Es ist anzunehmen, dass lediglich die Details, wie z.B. die genauen Diffusionskoeffizienten, nicht richtig wiedergegeben werden.

5.5.3 Die experimentellen Resultate

Korlach et al. haben mittels FCS Diffusionskonstanten innerhalb von fluiden und gelförmigen Domänen an DLPC:DPPC GUVs gemessen. Der Grund für die Wahl der GUV's als Modellsystem ist zum Einen, dass GUV's eine ähnliche Größe wie Zellen ($10 \text{ }\mu\text{m}$ – $100 \text{ }\mu\text{m}$) besitzen und zum Anderen können Wechselwirkungen mit einem Träger, auf denen oftmals Modellsysteme aufgebracht werden, wie es bei den hier vorgestellten Experimenten das Quarzglas ist, ausgeschlossen werden. In der Arbeit von Korlach ergaben sich Diffusionskonstanten in den Größenordnungen von $D = 3 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ für die schnell diffundierende Komponente und von $D = 2 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ für die langsame Komponente. Für unterschiedliche DLPC:DPPC Verhältnisse wurden leicht unterschiedliche Diffusionskonstanten gefunden, die aber immer jeweils in den angegebenen Größenordnungen liegen.

Diffusionskoeffizienten von $D = 1.43 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ und $D = 7.36 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ wurden durch Messungen an fluiden planaren DLPC-Membranen und gelförmigen planaren DPPC-Membranen ermittelt. A. Haç hat bei FCS-Messungen an einem DLPC:DPPC 50:50 System Diffusionskonstanten von $D = 4.47 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ und $D = 4.44 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ erhalten. Die gemessenen Diffusionskonstanten liegen in den gleichen Größenordnungen wie die von Korlach gemessenen Diffusionskonstanten.

Bei Messungen, bei denen die Modellmembran auf einen Träger aufgebracht ist, sind Wechselwirkungen der Lipide mit dem Trägermaterial, hier das Quarzglas, zu bedenken. SPT Messungen an unterstützten Lipidsystemen haben gezeigt, dass ein Glas-Träger die Diffusion einer einzigen Lipidschicht im Vergleich zu einem nicht unterstützten Modellsystem stark behindert [78]. Es wird berichtet, dass die Lipide mit dem Glas-Support um einen Faktor 4.5 langsamer diffundieren, als in Membranen, die auf kein Trägermaterial aufgebracht sind. Dieser Unterschied wird durch Wechselwirkungen der Lipide

mit dem Glas erklärt.

Bei den hier präsentierten Messungen sind Beeinflussungen durch das Trägermaterial ebenfalls zu berücksichtigen und deren Einfluss auf die Diffusion der Lipide zu diskutieren. Zu den in [78] diskutierten Messungen besteht der Unterschied, dass die hier erwähnten FCS-Experimente an einem Modellsystem durchgeführt wurden, bei dem mehrere hundert übereinanderliegende Lipiddoppelschichten zum Fluoreszenzsignal beitragen. Es ist zu erwarten, dass die unterste Schicht mit dem Träger stark wechselwirkt und Wechselwirkungen mit oberen Schichten gering oder nicht vorhanden sind. Ebenfalls ist anzunehmen, dass mehr durch das Trägermaterial wenig beeinflusste Lipidschichten zum Fluoreszenzsignal beitragen, so dass hauptsächlich eine durch das Trägermaterial unbeeinflusste Diffusion beobachtbar sein sollte. Insbesondere deutet der Vergleich mit den von Korlach et al. publizierten Ergebnissen daraufhin, dass die Annahmen als sinnvoll erscheinen.

Bei Messungen an übereinanderliegenden planaren Membranen sind jedoch Wechselwirkungen zwischen den Lipiddoppelschichten nicht auszuschließen, so dass sich die Diffusionskoeffizienten, die in einlamellaren Systemen und in multilamellaren Modellsystemen gemessen werden, unterscheiden können.

5.5.4 Diskussion verschiedener Diffusionsmodelle

Diffusion in Membranen wird durch Heterogenitäten beeinflusst [4, 12, 70]. Heterogenitäten treten jedoch nicht nur in Systemen mit Proteinen, Peptiden usw. auf, sondern sie sind bereits in einfachen zweikomponentigen Lipidsystemen beobachtbar. Wie in den vorangegangenen Kapiteln gesehen, bilden sich abhängig von der Temperatur sowohl Mikro- als auch Makrodomänen gelförmiger und fluider Lipide aus. Bereits die Ausbildung von Lipiddomänen beeinflusst die Diffusionsprozesse in einem einfachen Lipidsystem. Es gibt aber weitere Mechanismen, wie z.B. die Existenz von Korralen⁴ die zu einer Beeinflussung der Diffusion eines Moleküls führen können.

Zur Beschreibung der Diffusion von sich in einer homogenen Membran befindenden Proteinen haben sich hydrodynamische Theorien wie die von Saffman und Delbrück als sinnvoll herausgestellt [60]. Die Diffusion fluider Lipide kann mittels „Freies Volumen“ Theorien erklärt werden [24, 44, 45]. Saxton konnte verschiedenste Situationen durch numerische Methoden modellieren ([61] bis [68], [71]). Er beschreibt sowohl Lipid- als auch Proteindiffusion und berücksichtigt auch das Auftreten von Heterogenitäten.

⁴ Diese werden z.B. durch eine Ansammlung von Proteinen gebildet und sorgen dafür, dass die Diffusion eines Tracers auf ein bestimmtes Gebiet beschränkt ist (siehe Abschnitt 2.1.4).

Hydrodynamische Theorien haben sich zur Beschreibung von Lipiddiffusion als nicht sinnvoll herausgestellt (siehe 2.1.2) und sollen in der weiteren Diskussion, in der es um Lipiddiffusion geht, nicht weiter betrachtet werden.

Die „Freies Volumen“ Theorien gehen zunächst einmal von homogenen Systemen aus und das mittlere freie Volumen oder die mittleren freien Flächen sind temperaturabhängig, so dass auch die Diffusionskoeffizienten temperaturabhängig sind. Heterogenitäten, wie sie durch gelförmige Domänen gebildet werden können, sind selten berücksichtigt und in diesen wird den gelförmigen Lipiden keine Diffusion zugeschrieben [3]. Experimentelle Daten können in dem Zusammenhang mittels eines freien Volumens interpretiert werden [2, 83], sie können aber anomale Diffusion oder andere von normaler Diffusion abweichende Diffusionsarten nicht beschreiben.

Unterschiedliche Diffusionseigenschaften können jedoch mittels der Monte Carlo Simulationen von Saxton erklärt werden. Diese Arbeiten beruhen auf sehr vereinfachenden Annahmen, so dass sie zwar unterschiedliche Diffusionsprozesse beschreiben können, aber Lipidsysteme können nicht direkt beschrieben werden. So ist das Gitter bei diesen Simulationen als eine Lipidschicht anzusehen, in die mobile oder immobile Hindernisse eingebaut sind. Diese Hindernisse repräsentieren Geldomänen oder einzelne Proteine oder sogar Proteinaggregate. Diese Eigenschaften werden aber bei diesen Modellen „künstlich“ ins System integriert, d.h. Heterogenitäten bilden sich nicht aufgrund physikalischer Eigenschaften aus, sondern werden durch eine statistische Auswahl auf dem Gitter verteilt. Temperaturabhängigkeiten der Diffusion können mit den von Saxton durchgeführten Monte Carlo Simulationen nicht beschrieben werden.

Das in dieser Arbeit speziell zur Beschreibung eines zweikomponentigen Lipidsystems genutzte Modell entgeht den genannten Kritikpunkten. Domänenbildung kann mittels der Wechselwirkungsenergien, die zwischen den Lipiden herrschen erklärt werden und eine Temperaturabhängigkeit ist automatisch im Modell enthalten. Diffusion findet sowohl in den gelförmigen als auch fluiden Domänen statt. Ebenso kann ein fluides Lipid in eine Geldomäne diffundieren oder ein gelförmiges Lipid in eine fluide Domäne, was in den beiden anderen Ansätzen nicht berücksichtigt wird. Weiterhin ist zu bemerken, dass hier ein reales Lipidsystem beschrieben wird und das Modell auf experimentell leicht zugänglichen Daten basiert. Mit diesem speziellen Modell sind somit Diffusionsprozesse in Lipidsystemen auf einer anderen Ebene verstehbar als mit den Modellen von Saxton und den „Freies Volumen“ Ansätzen.

Kapitel 6

Diskussion

6.1 Vom Modellsystem zur biologischen Membran

In ihrer Arbeit aus dem Jahr 1968 hatten Adam und Delbrück [1] betont, dass es zum Zustandekommen von Reaktionen in mikrobiologischen Systemen vorteilhaft sein kann, dass Diffusion der beteiligten Moleküle, wie z.B. Rezeptoren, nicht im Dreidimensionalen, sondern im Zweidimensionalen stattfindet. Die Reduktion von drei auf zwei Dimensionen übernehmen dabei biologische Membranen, in denen die Moleküle, die miteinander reagieren sollen, diffundieren. Melo et al. [48] zeigen in ihrer theoretischen Arbeit, dass die Ausbildung von Domänen einen Einfluss auf bimolekulare Reaktionen haben kann. Sind fluide durch gelförmige Domänen getrennt und befinden sich die Moleküle, die miteinander reagieren sollen, in den fluiden Phasen, so kann dies die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Reaktion verringern. Um also zu verstehen, ob die Reduzierung der Diffusion von drei auf zwei Dimensionen tatsächlich ein Vorteil biologischer Systeme ist, müssen somit die Membranorganisation und die damit verbundenen Diffusionsprozesse bzw. deren gegenseitige Beeinflussungen verstanden werden. Dies ist beispielsweise von Jørgensen et al. [37] im Kontext lateraler Membranorganisation mit dem Transport und der Aktivität von Enzymen untersucht worden. Sie folgerten, dass sowohl die Lipidmembranstruktur als auch deren Dynamik einen Einfluss haben.

Edidin [17] äusserte die Hypothese, dass die Entstehung von Mikrodomänen eher auf Lipid-Protein als auf Lipid-Lipid Wechselwirkungen basiert. Theoretische Ergebnisse wie die von Sugár et al. [50, 81] oder Nielsen et al. [53] zeigen aber gerade, dass bereits in zweikomponentigen Lipidmembranen Mikrodomänen, aber auch Makrodomänen zu beobachten sind. Ergebnisse der

hier vorliegenden Arbeit bestätigen dies und es ist zu beobachten, dass Mikrodomänen sich schnell verändern, die Strukturänderungen makroskopischer Domänen im Vergleich dazu aber langsam ablaufen. Diese Strukturänderungen können dann wieder Einfluss auf die Wahrscheinlichkeiten des Auftretens verschiedener Reaktionen haben. Im Fall der Überlegungen von Melo et al. [48], in denen sich die Domänenstrukturen nicht ändern, stellt sich die Frage wie die Wahrscheinlichkeiten der dort diskutierten Reaktionen durch dynamische Prozesse beeinflusst werden könnten.

Die bisher diskutierten Effekte sind am Beispiel von Modellsystemen vorgestellt worden. Es stellt sich die Frage, wie sehr Diffusion in zwei Dimensionen und die mögliche Beeinflussung der Struktur einer biologischen Membran die Biologie befähigt hat, Reaktionen, z.B. in Zellen, je nach Bedingung zu ermöglichen oder zu verhindern. Bereits die laterale Organisation der Lipide in biologischen Membranen kann nach den Überlegungen an Modellmembranen eine Beeinflussung ausüben. Biologische Membranen sind jedoch wesentlich komplexer als die Modellsysteme, so dass hierbei weitere Effekte, wie Protein–Lipid, Protein–Protein Wechselwirkungen usw. zu berücksichtigen sind und diese Wechselwirkungen nicht getrennt voneinander betrachtet werden können. All diese Wechselwirkungen können einen Einfluss auf die Organisation innerhalb der Membran haben [26]. Die Komplexität in biologischen Systemen führt zu verschiedensten Diffusionsprozessen wie anomale Diffusion von Proteinen [21] oder Diffusion, die räumlich beschränkt ist [82], deren Bedeutung für die Biologie bisher unverstanden ist.

Die Existenz mikroskopischer und makroskopischer Domänen und deren physikalische Eigenschaften könnten ebenfalls auf andere Weise die Biologie beeinflussen. Im Zusammenhang mit der Fusion synaptischer Vesikel wird der Einfluss einer bestimmten Familie von Proteinen, den SNARE Proteinen, diskutiert. In einer aktuellen Arbeit werfen Lang et al. [41] die Frage auf, ob auf der Membran ausgeprägte Fusionsstellen mit hohen SNARE Konzentrationen existieren. Sie kommen zu dem Schluss, dass für eine effiziente Fusion wahrscheinlich hohe Konzentrationen an SNARE Proteinen benötigt werden. In ihrer Studie vernachlässigen sie aber mögliche Einflüsse durch die die Membran bildenden Lipide und deren physikalische Eigenschaften. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die molekularen Zustandsfluktationen innerhalb makroskopischer Domänen variieren können.

In wie weit dies auch einen Effekt auf die Fusion von Vesikeln haben kann, wäre eine Frage die in diesem Zusammenhang aufgeworfen werden sollte, um zu verstehen, ob hauptsächlich Proteine für die Fusion verantwortlich sind oder ob das Zusammenspiel von Proteinen und Lipidumgebung eine Bedeutung besitzt. Ob verschiedene Fusionsmechanismen, bei denen unterschiedliche Moleküle mitwirken, unter verschiedenen Bedingungen sich als vor- oder

nachteilhaft erweisen können, ist ebenfalls eine Frage, die aufgeworfen werden kann.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass biologische Membranen innerhalb der Biologie eine große Bedeutung haben. Membranorganisation kann dabei einen entscheidenden Einfluss auf mikrobiologische Prozesse haben.

Aus den angestellten Betrachtungen und den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen können Ideen für neue Studien gewonnen werden. Diese sollen im folgenden Abschnitt vorgestellt werden.

6.2 Ausblick

In diesem abschließenden Abschnitt soll ein kurzer Ausblick gegeben werden, in wie weit die vorgestellten Studien weitergeführt und vertieft werden könnten. Einige dieser Vorstellungen sind bereits im Laufe dieser Arbeit genannt worden. Insbesondere ist zu betonen, dass sowohl experimentelle als auch theoretische Studien durchgeführt werden sollten, um das Verständnis für die Interpretation der Experimente und für die Modellierung zu vertiefen. Begonnen werden soll mit Überlegungen weiterer experimenteller Fluoreszenz-korrelationsspektroskopiestudien.

Die Studien an den planaren DLPC:DPPC Lipidmembranen stehen bisher noch am Anfang und sollten deshalb weiter betrieben werden. Studien an DMPC:DSPC Mischungen sind ebenfalls durchzuführen, um damit einen quantitativen Vergleich mit den Simulationen des DMPC:DSPC Lipidsystems zu ermöglichen. Eine Fragestellung ist dabei, in wie weit sich die Diffusionskoeffizienten der schnellen und langsamen Komponenten bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen ändern, wie dies bei Korlach et al. [39] bereits angedeutet wurde, und wenn dies der Fall ist, woran dies liegen könnte.

Im Weiteren ist es lohnenswert, neben den Messungen an planaren Modellsystemen, auch mit anderen Modellsystemen wie GUV's zu arbeiten (siehe T. Schlötzer [72]), um zu sehen, in wie weit die Diffusionseigenschaften in diesen Modellsystemen voneinander abweichen.

Die in den FCS-Messungen beobachtbare Diffusion ist die Diffusion der Label und nicht der Lipide. Es sollte deshalb geklärt werden, ob die Diffusionskoeffizienten lipid- oder markerspezifisch sind. Die Variation der Fluoreszenzlabel sollte dabei helfen festzustellen, wie sehr die Diffusionskonstanten voneinander abweichen. Da eigentlich die Lipiddiffusion untersucht werden soll, sollte idealerweise keine Veränderung festgestellt werden, denn dann kann mit hoher Sicherheit gefolgert werden, dass die beobachtete Diffusion der Fluoreszenzlabel als lipidspezifisch und nicht markerspezifisch angesehen werden

kann.

Rotationsstudien sollten ebenfalls Informationen über Heterogenitäten enthalten. Rotationen gelförmiger Lipide sind langsamer als Rotationen fluider Lipide. Die Anregung der Label hängt unter anderem von der Orientierung der Dipole der Label ab. Die Polarisationsrichtung der emittierten Photonen hängt ebenfalls von der Orientierung eines Dipols ab. Ein angeregtes Fluoreszenzlabel rotiert in der Zeit zwischen Absorption und Emission. Die Analyse der Fluoreszenzsignale, die zur parallelen bzw. senkrechten Polarisation des Fluoreszenzlichts gehören, sollte Informationen über die Rotation der Lipide enthalten.

Eine Weiterentwicklung des Modells sollte dann zur Beschreibung der Rotationsstudien und zum Vergleich mit den experimentellen Ergebnissen genutzt werden. Hierbei ist zu bedenken, dass bei den Rotationsstudien die Annahme instantaner Fluoreszenz unabhängig von irgendwelchen Dipolorientierungen nicht mehr angemessen ist. Die Absorption und Emission eines Photons hängt von der Orientierung ab und während der Zeit, die zwischen Absorption und Emission liegt, ändert sich die Orientierung in Abhängigkeit der Rotationsgeschwindigkeit.

Die „Single-Particle Tracking“ Simulationen haben interessante Effekte aufgezeigt, die für ein besseres Verständnis notwendigerweise fortzuführen sind. Ebenfalls sollten sie durch experimentelle Daten bestätigt werden.

Es soll bemerkt werden, dass das Modellsystem auf eine einfache zweikomponentige Lipidmischung mit Proteinen erweitert werden könnte, so dass die Beeinflussungen der Diffusionsprozesse von Proteinen und Lipiden in solch einem Modellsystem im Rahmen eines einfachen numerischen Modelles verstanden werden können. Solche Studien sollten die Beantwortung der Frage nach der Anordnung von Proteinen und Lipiden und der dabei entscheidenden Wechselwirkungen (Lipid-Lipid oder Lipid-Protein oder Protein-Protein) beantworten können.

Diese Studien sollen zu einem besseren Verständnis von Diffusion und der Ausbildung von Domänen und deren gegenseitige Beeinflussung führen. Temperaturabhängigkeit von Diffusionsprozessen und der Ausbildung von Heterogenitäten befähigen die Biologie über physikalische Regelmechanismen biologische Prozesse zu steuern, die ebenfalls verstanden werden sollen.

Anhang A

Wärmekapazitätskurven

In diesem Abschnitt des Anhanges sind die berechneten und gemessenen Wärmekapazitätskurven der DMPC:DSPC Verhältnisse 90 : 10, 80 : 20, 70 : 30, 60 : 40, 50 : 50, 40 : 60, 30 : 70, 20 : 80 und 10 : 90 im Detail abgebildet. Im Weiteren werden jeweils die theoretischen Kurven, die sich aus dem Fluktuations-Dissipations Theorem und den Ableitungen der Enthalpien ergeben verglichen. Der Enthalpieverlauf wird ebenfalls für jedes berechnete Mischungsverhältnis abgebildet.

In sämtlichen Abbildungen wird oben die aus dem Fluktuations-Dissipations Theorem berechnete Wärmekapazitätskurve (jeweils durch (\circ) gekennzeichnet) mit der experimentellen Kurve (durchgezogene Linie) verglichen. In der Mitte sind jeweils die beiden theoretischen Kurven dargestellt. Die $(+)$ kennzeichnen die c_p -Werte, die sich aus den Ableitungen der Enthalpie ergeben und die (\circ) sind die Werte, die aus dem Fluktuations-Dissipations Theorems folgen. Die unterste Graphik stellt den Enthalpieverlauf dar.

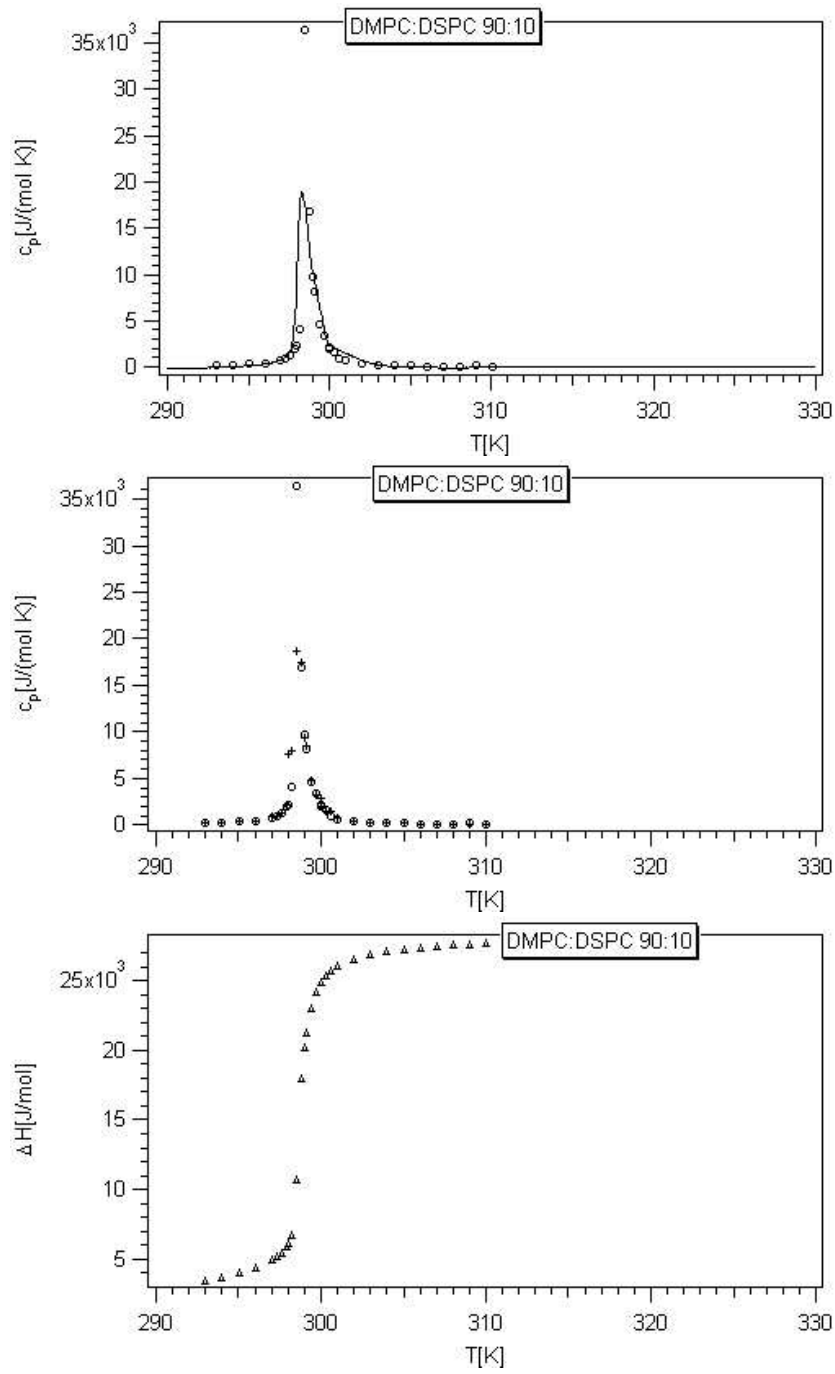


Abbildung A.1: *DMPC:DSPC 90:10*

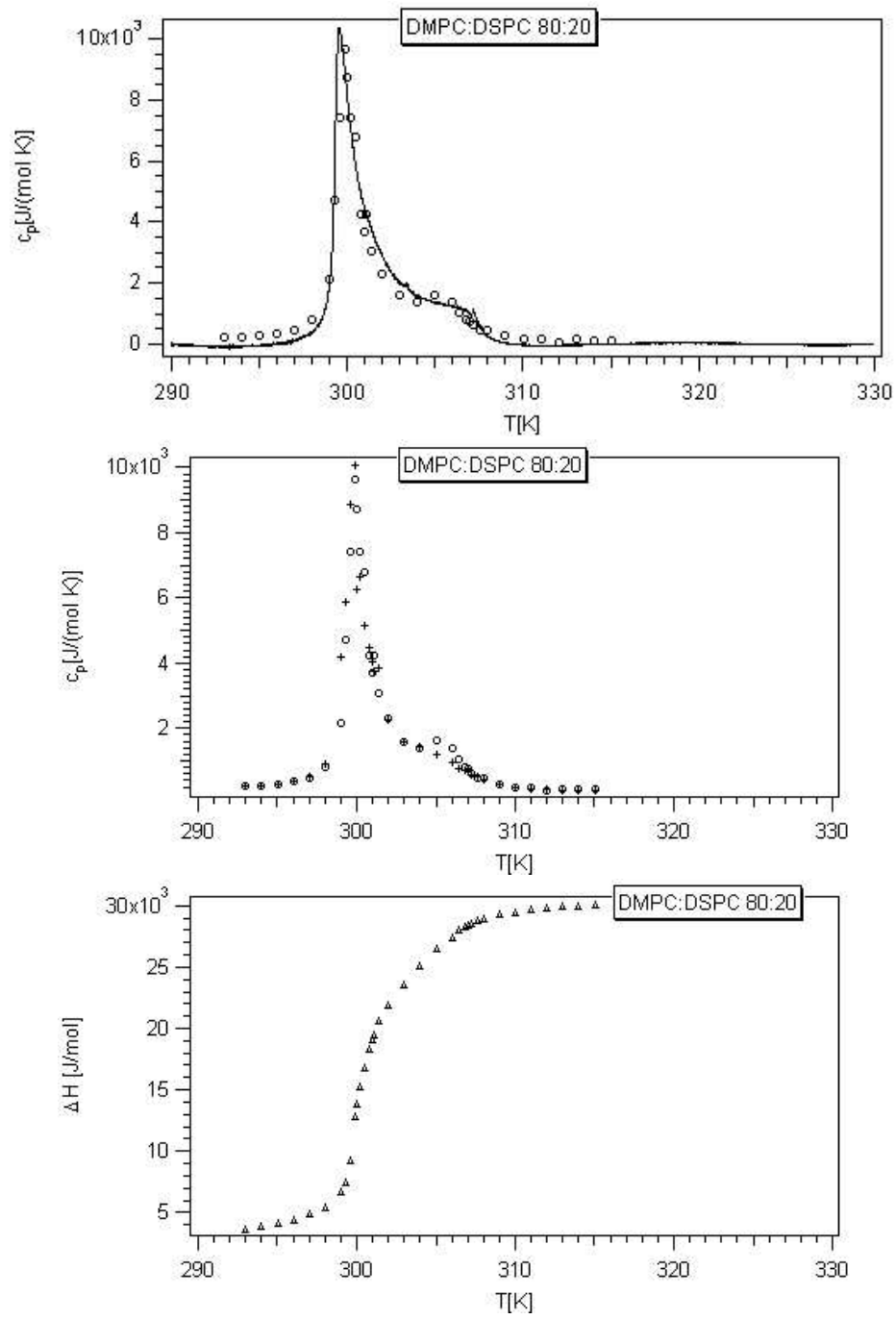
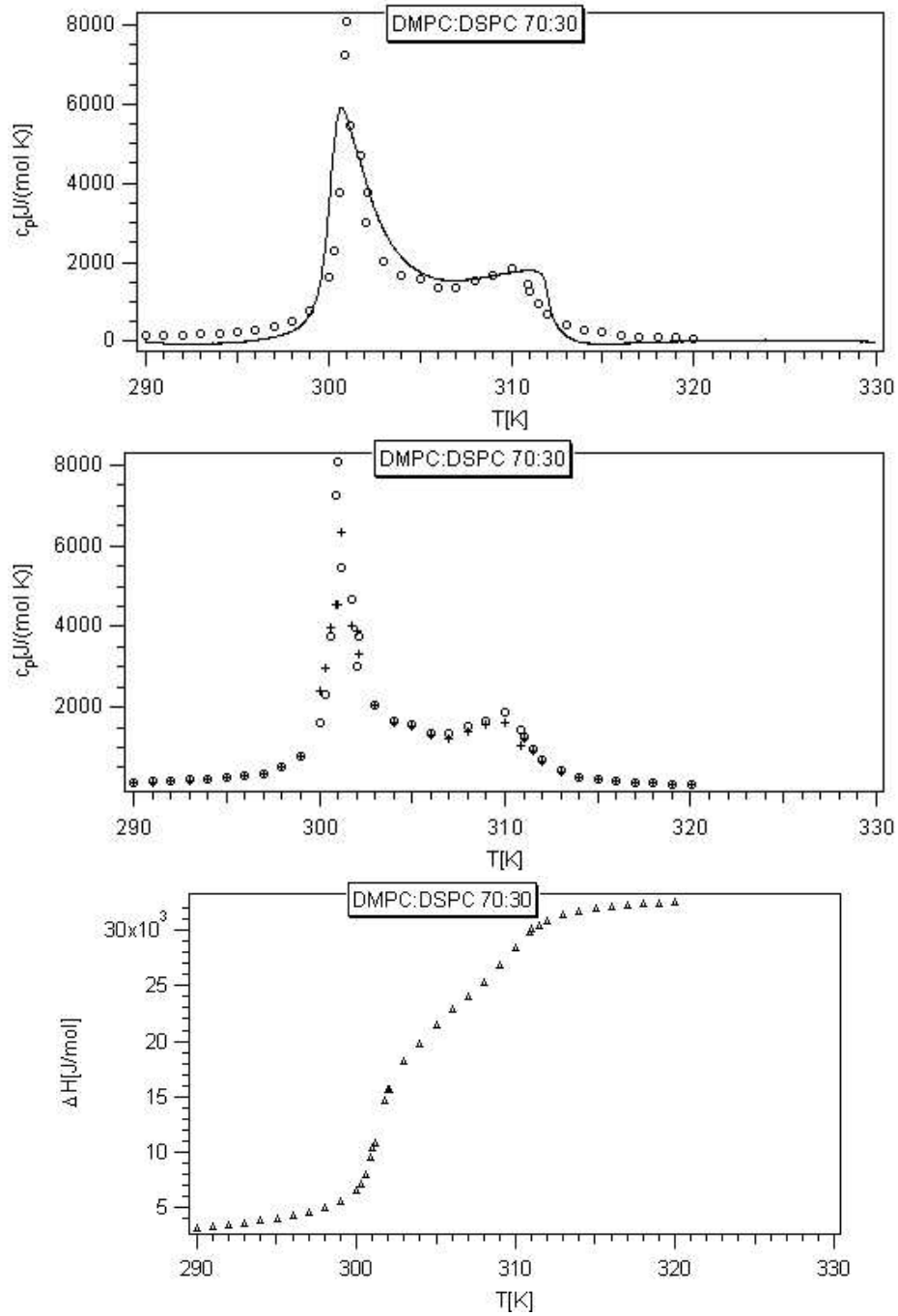
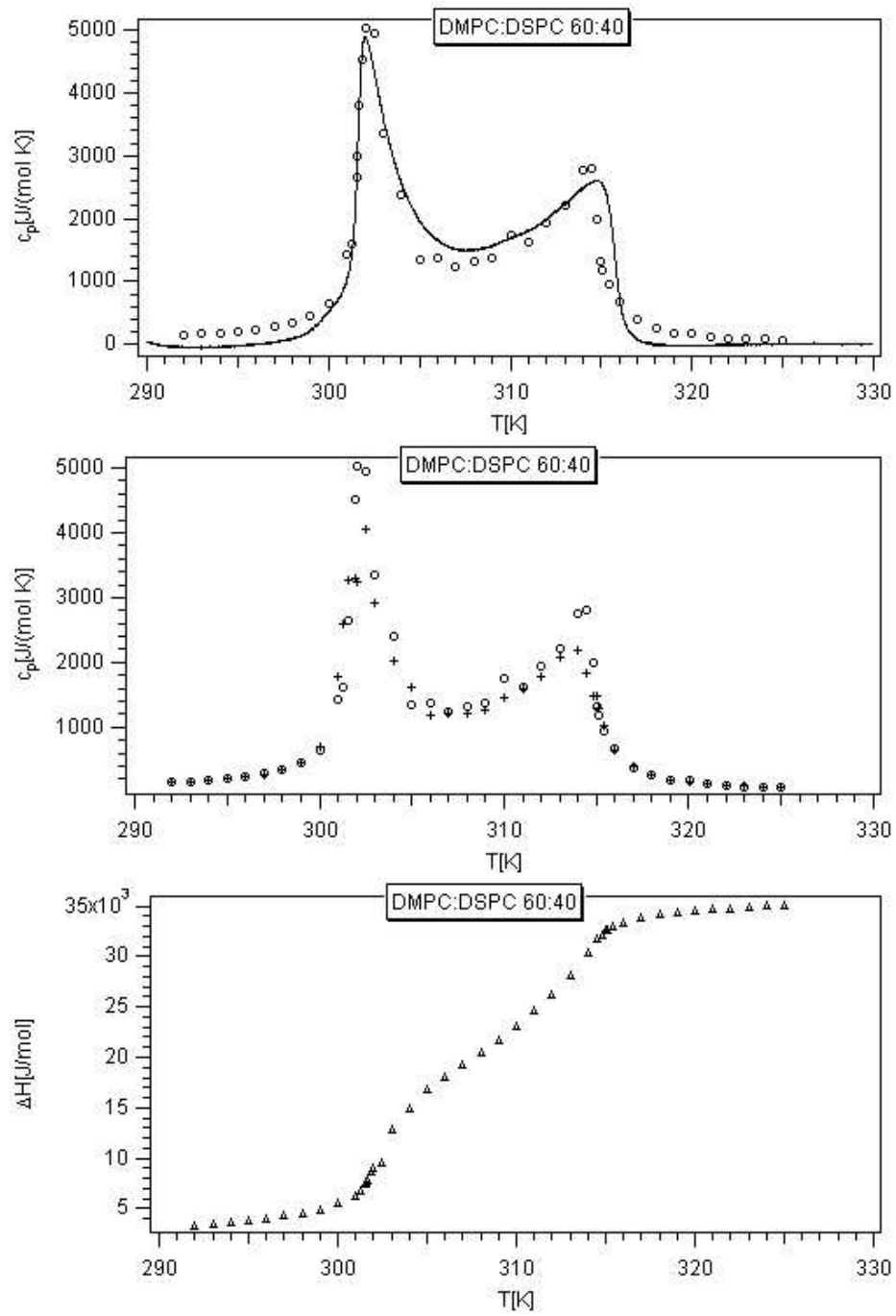
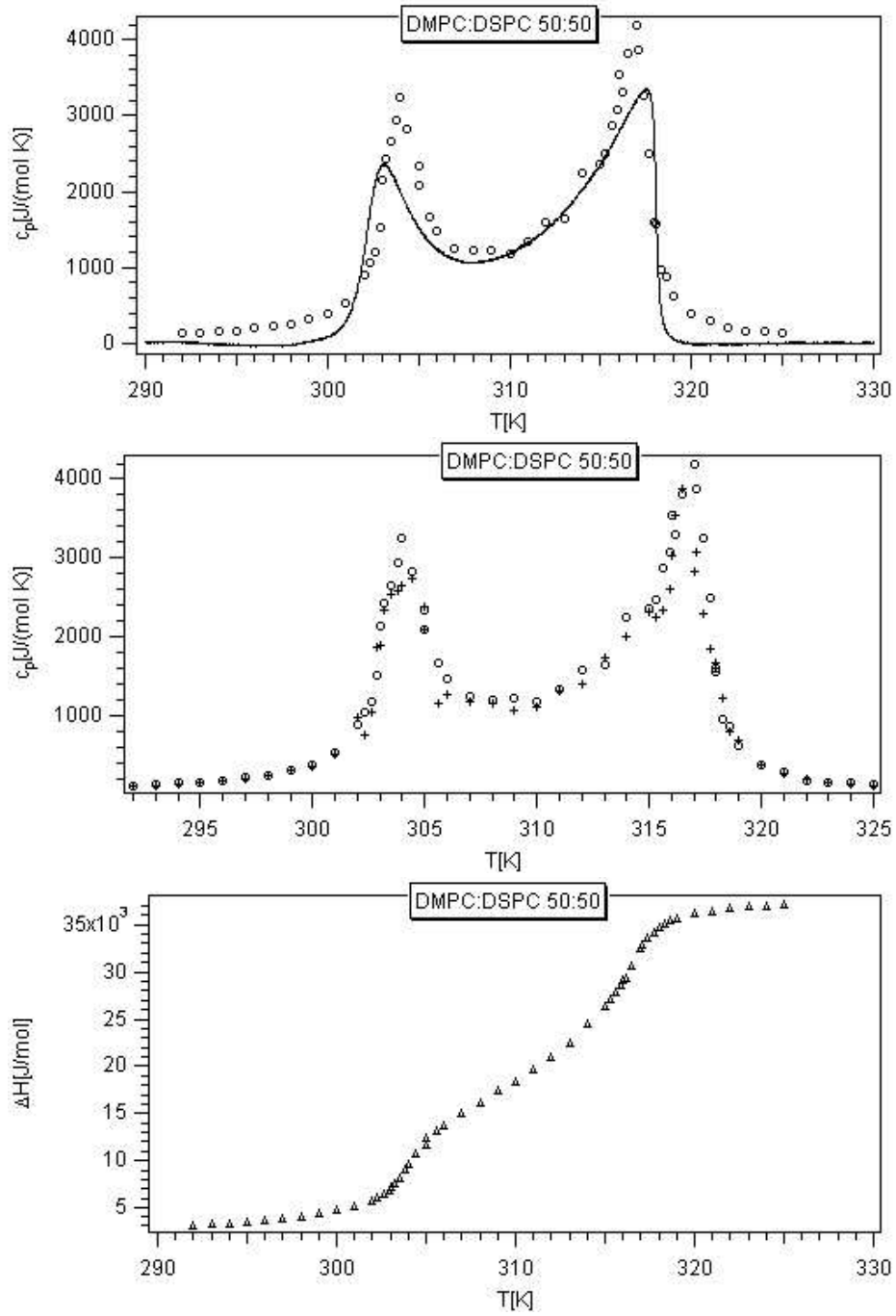
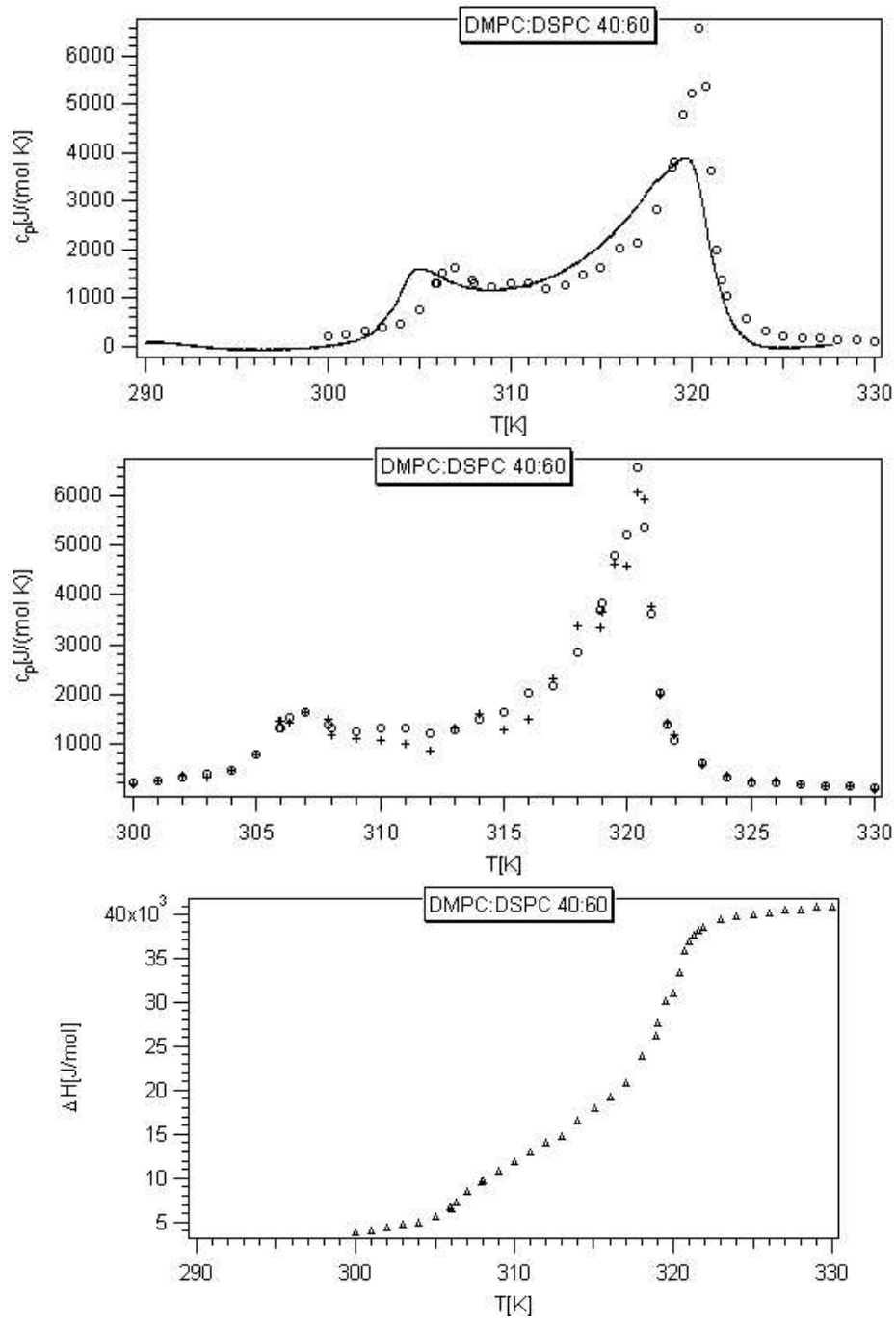


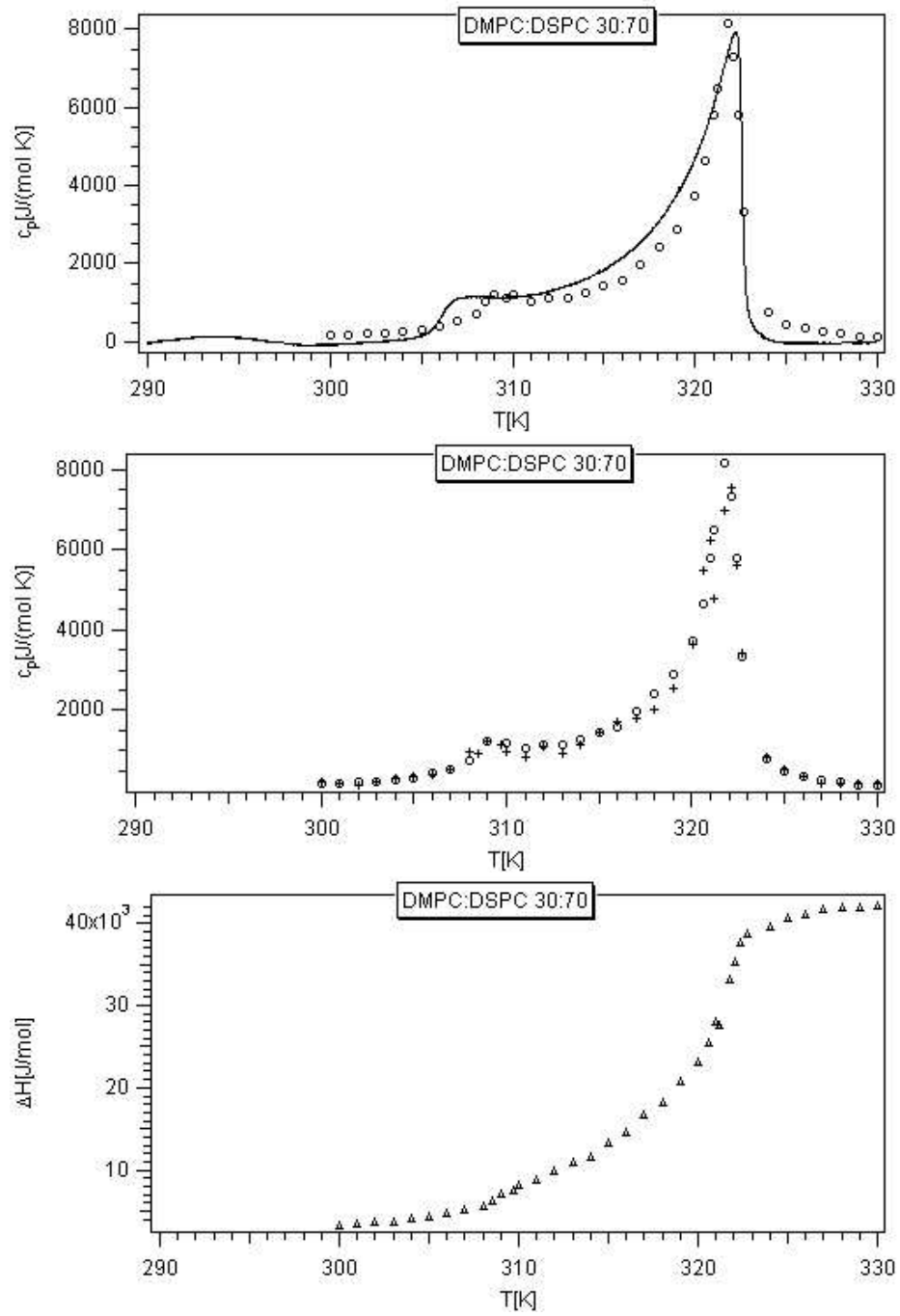
Abbildung A.2: *DMPC:DSPC 80:20*

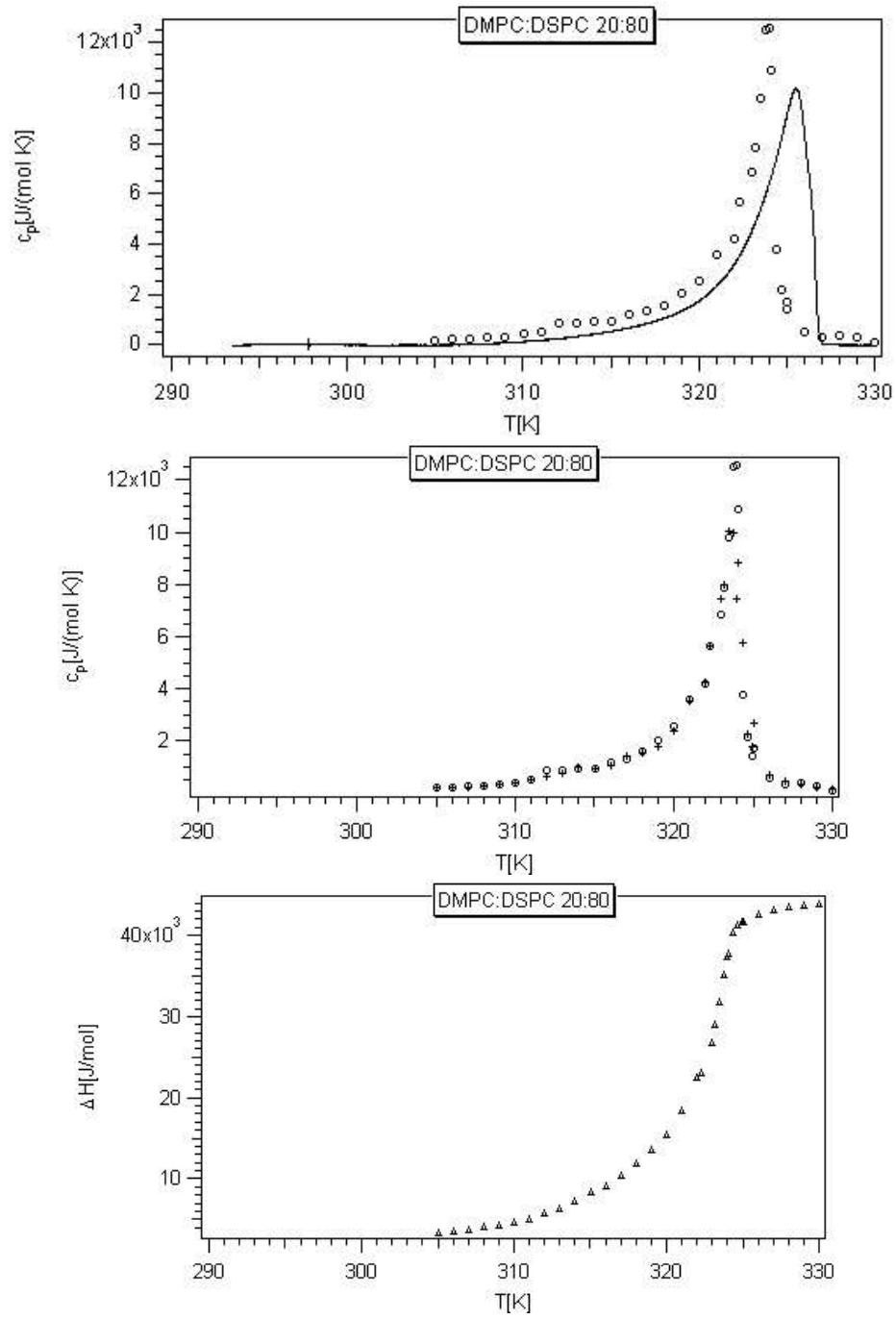
Abbildung A.3: *DMPC:DSPC 70:30*

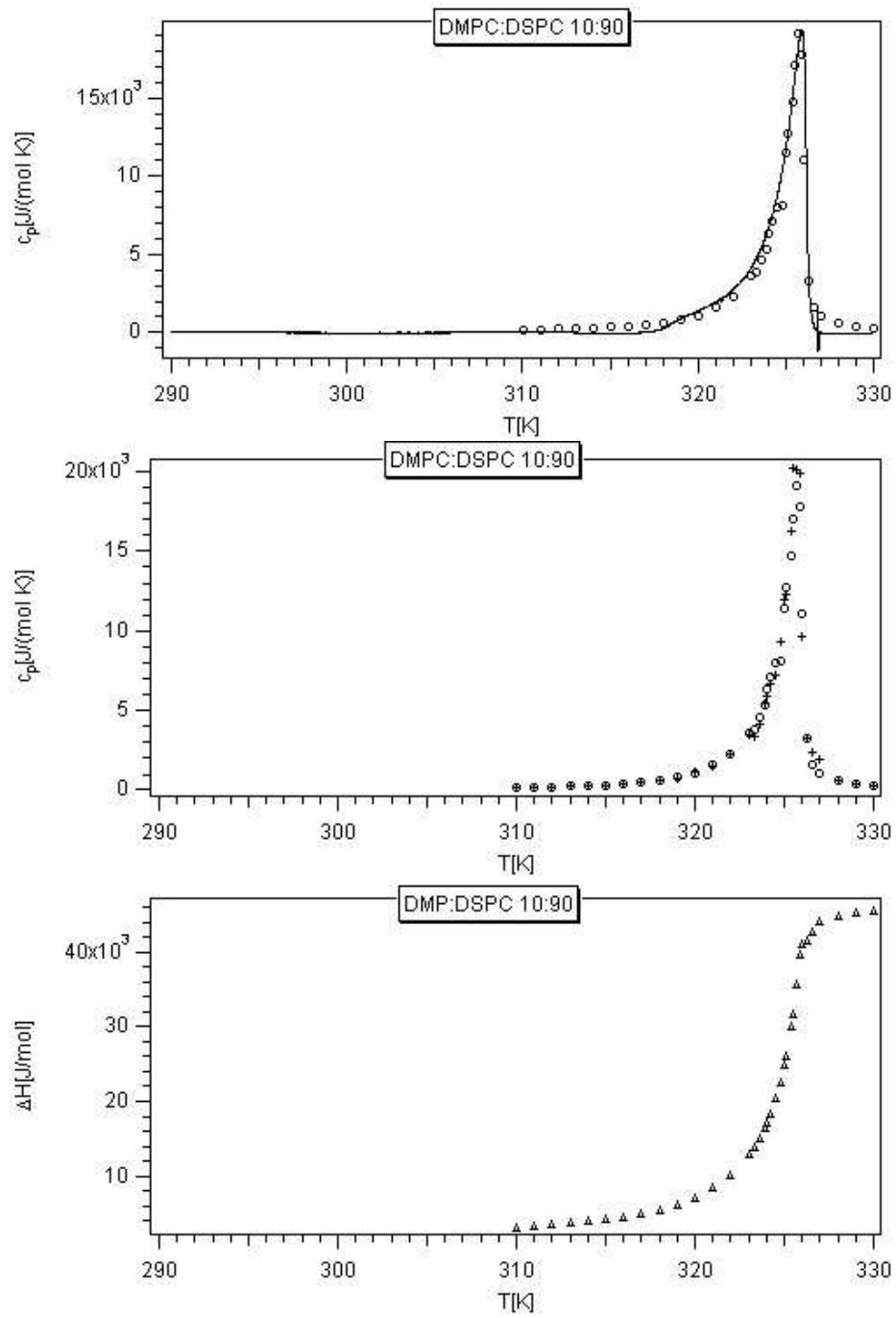
Abbildung A.4: *DMPC:DSPC 60:40*

Abbildung A.5: *DMPC:DSPC 50:50*

Abbildung A.6: *DMPC:DSPC 40:60*

Abbildung A.7: *DMPC:DSPC 30:70*

Abbildung A.8: *DMPC:DSPC 20:80*

Abbildung A.9: *DMPC:DSPC 10:90*

Anhang B

Abkürzungen

FCS	: Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
FRAP	: Fluorescence After Photobleaching
DSC	: Differentialkalorimetrie
MSD	: Mittlerer Quadratischer Abstand
SPT	: Single-Particle Tracking
ZGS	: Zentraler Grenzwertsatz
DMPC	: 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DSPC	: 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DLPC	: 1,2-Dilauroyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DPPC	: 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DOPC	: 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
EDTA	: Ethylen-diamin-tetraessigsäure-diamoniumsalz
HEPES	: 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-etan-sulfonsäure
TRITC DHPE	: N-(6-tetramethylrhodaminethiocarbamoyl) -1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium Salz

Literaturverzeichnis

- [1] Adam G., Delbrück M. (1968). Reduction of Dimensionality in Biological Processes. *Structural Chemistry and Biology*, W.H. Freeman and Company S. 198-215
- [2] Almeida P.F.F., Vaz W.L.C., Thompson T.E. (1992). Lateral Diffusion in the Liquid Phases of Dimyristoylphosphatidylcholine/Cholesterol Lipid Bilayers: A Free Volume Analysis. *Biochemistry* **31**:6739-6747
- [3] Almeida P.F.F., Vaz W.L.C., Thompson T.E. (1992). Lateral Diffusion and Percolation in Two-Phase, Two-Component Lipid Bilayers. Topology of the Solid-Phase Domains In-Plane and Across the Lipid Bilayer. *Biochemistry* **31**:7198-7210
- [4] Almeida P.F.F., Vaz W.L.C. (1995). Lateral Diffusion in Membranes. *Structure and Dynamics of Membranes: From Cells to Membranes, Handbook of Biological Physics Volume 1*, Elsevier, eds. Lipowsky R., Sackmann E. **1**:305-357
- [5] Aragón S.R., Pecora R. (1975). Fluorescence Correlation Spectroscopy as a Probe of Molecular Dynamics. *J. Chem. Phys.* **64**:1791-1803
- [6] Bagatolli L.A., Gratton E. (1999). Two-Photon Fluorescence Microscopy Observation of Shape Changes at the Phase Transition in Phospholipid Giant Unilamellar Vesicles. *Biophys. J.* **77**:2090-2101
- [7] Bagatolli L.A., Gratton E. (2000). Two Photon Fluorescence Microscopy of Coexisting Lipid Domains in Giant Unilamellar Vesicles of Binary Phospholipid Mixtures. *Biophys. J.* **78**:290-305
- [8] Bagatolli L.A., Gratton E. (2000). A Correlation between Lipid Domain Shape and Binary Phospholipid Mixture Composition in Free Standing Bilayers: A Two-Photon Fluorescence Microscopy Study. *Biophys. J.* **79**:434-447

- [9] Bouchaud J.P., Georges A. (1990). Anomalous Diffusion in Disordered Media: Statistical Mechanisms, Models and Physical Applications. *Phys. Rep.* **195**:127-293
- [10] Brenig (1996). Statistische Theorie der Wärme. *Springer Lehrbuch 4. Auflage*
- [11] Caillé A., Pink D., de Verteuil F., Zuckermann M.J. (1980). Theoretical Models for Quasi-Two-Dimensional Mesomorphic Monolayers and Membrane Bilayers. *Can. J. Phys.* **58**:581-611
- [12] Clegg R.M., Vaz W.L.C. (1985). Translational Diffusion of Proteins and Lipids in Artificial Lipid Bilayer Membranes. A Comparison of Experiment with Theory. *Progress in Protein-Lipid Interactions, Elsevier Science Publications*. Chapter 5:174-229
- [13] Cohen M.H., Turnbull D. (1959). Molecular Transport in Liquids and Gases. *J. Chem. Phys.* **31**:1164-1169
- [14] Corvera E., Laradji M., Zuckermann M.J. (1993). Application of Finite-Size Scalling to the Pink Model for Lipid Bilayers. *Phys. Rev. E* **47**:696-703
- [15] Dietrich C., Yang B., Fujiwara T., Kusumi A., Jacobson K. (2002). Relationship of Lipid Rafts to Transient Confinement Zones Detected by Single Particle Tracking. *Biophys. J.* **82**:274-284
- [16] Doniach S. (1977). Thermodynamic Fluctuations in Phospholipid Bilayers. *J. Chem. Phys.* **68**:4912-4916
- [17] Edidin M. (1997). Lipid Microdomains in Cell Surface Membranes. *Curr. Op. Struct. Biol.* **7**:528-532
- [18] Einstein A. (1905). Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik* **17**:548-560
- [19] Einstein A. (1906). Zur Theorie der Brownschen Bewegung. *Annalen der Physik* **19**:370-381
- [20] Elson E.L., Magde D. (1974). Fluorescence Correlation Spectroscopy I. Conceptual Basis and Theory. *Biopolymers* **13**:1-27

- [21] Feder T.J., Brust-Maschner I., Slattery J.P., Baird B., Webb W.W. (1996). Constrained Diffusion or Immobile Fraction on Cell Surfaces: A New Interpretation. *Biophys. J.* **70**:2767-2773
- [22] Feigenson G.W., Buboltz J.T. (2001). Ternary Phase Diagram of Dipalmitoyl-PC/Cholesterol: Nanoscopic Domain Formation Driven by Cholesterol. *Biophys. J.* **80**:2775-2788
- [23] Glauber R. J. (1963). Time-Dependent Statistics of the Ising Model . *J. Math. Phys.* **2**:294-307
- [24] Galla H.-J., Hartmann W., Theilen U., Sackmann E. (1979). On Two-Dimensional Passive Randomwalk in Lipid Bilayers and Fluid Pathways in Biomembranes. *J. Membr. Biol.* **48**:215-236
- [25] Gennis R.B. (1989). Biomembranes. Molecular Structure and Function. *Springer Verlag*.
- [26] Gil T., Ipsen J.H., Mouritsen O.G., Sabra M.C., Sperotto M.M., Zuckermann M. (1998). Theoretical Analysis of Protein Organization in Lipid Membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1376**:245-266
- [27] Gliss C., Clausen-Schaumann H., Günther R., S. Odenbach, Randl O., Bayerl T.M. (1998). Direct Detection of Domains in Phospholipid Bilayers by Grazing Incidence Diffraction of Neutrons and Atomic Force Microscopy. *Biophys. J.* **74**:2443-2450
- [28] Grabitz P. (2001). Dynamische Vorgänge in Phospholipidmembranen. Relaxationsprozesse und Viskoelastizität in der Nähe der Schmelzwandlung. *Diplomarbeit, Georg-August-Universität Göttingen*
- [29] Havlin S., Avraham D.B. (1987). Diffusion in Disordered Media. *Adv. Phys.* **36**:695-798
- [30] Havlin S., Bunde A. (1996). Percolation II. *Fractals and Disordered Systems, 2. Auflage, Springer-Verlag* S. 115-176
- [31] Heimburg T. (2000). A Model for the Pretransition: Coupling of Ripple Formation with the Chain-Melting Transition. *Biophys. J.* **78**:1154-1165
- [32] Heimburg T. (2000). Monte Carlo Simulations of Lipid Bilayers and Lipid Protein Interactions in the Light of Recent Experiments. *Curr. Op. Coll. & Inter. Sci.* **5**:224-231

- [33] Hill T.L. (1962). Energy Distribution among Independent Molecules. *Introduction to Statistical Thermodynamics, 2nd Edition, Addison-Wesley* S. 64-66
- [34] Ising E. (1925). Beitrag zur Theorie des Ferromagnetismus. *Zeits. f. Physik.* **31**:253-258
- [35] Janiak M.J., Small D.M., Shipley G.G. (1979). Temperature and Compositional Dependence of the Structure of Hydrated Dimyristoyl Lecithin. *J. Biol. Chem.* **254**:6068-6078
- [36] Jerala R., Almeida P.F.F., Biltonen R.L. (1996). Simulation of the Gel-Fluid Transition in a Membrane Composed of Lipids with Two Connected Acyl Chains: Application of a Dimer-Move Step. *Biophys. J.* **71**:609-615
- [37] Jørgensen K., Høyrup P., Pedersen T.B., Mouritsen O.G. (2001). Dynamical and Structural Properties of Lipid Membranes in Relation To Liposomal Drug Delivery Systems. *Cell. Molec. Biol. Lett.* **6**:255-263
- [38] Kawasaki K. (1972). Kinetics of Ising Models. *Phase Transitions and Critical Phenomena Vol. 2, Acad. Press* S. 443-501
- [39] Korlach J., Schwille P., Webb W.W., Feigenson G.W. (1999). Characterization of Lipid Bilayer Phases by Confocal and Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:8461-8466
- [40] Landau L.D., Lifschitz E.M. (1966). Kapitel 1. *Lehrbuch der theoretischen Physik VI: Hydrodynamik, Akademie Verlag*
- [41] Lang T., Bruns D., Wenzel D., Riedel D., Holroyd P., Thiele C., Jahn R. (2001). SNAREs are Concentrated in Cholesterol-Dependent Clusters that Define Docking and Fusion Sites for Exocytosis. *EMBO* **20**:2202-2213
- [42] L'Ecuyer P. (1988). Efficient and portable combined Random Number Generators. *Com. of ACM* **31**:742-751
- [43] Lee A.G. (1977). Lipid Phase Transitions and Phase Diagrams II. Mixtures Involving Lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **472**:285-344
- [44] MacCarthy J.E., Kozak J.J. (1982). Lateral Diffusion in Fluid Systems. *J. Chem. Phys.* **77**:2214-2216

- [45] Macedo P.B., Litovitz T.A. (1965). On the Relative Role of Free Volume and Activation Energy in the Viscosity of Liquids. *J. Chem. Phys.* **42**:245-256
- [46] Magde D., Elson E.L. (1972). Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System— Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* **29**:705-708
- [47] Marčelja S. (1974). Chain Ordering in Liquid Crystals. I. Even–Odd Effect. *J. Chem. Phys.* **60**:3599-3604
- [48] Melo E.C.C., Lourtie I.M.G., Sankaram M.B., Thompson T.E., Vaz W.L.C. (1992). Effects of Domain Connection and Disconnection on the Yields of In–Plane Bimolecular Reactions in Membranes. *Biophys. J.* **63**:1506-1512
- [49] Metropolis N., Rosenbluth A.W., Rosenbluth M.N., Teller A.H., Teller E. (1953). Equation of State Calculations by Fast Computing Machines. *J. Chem. Phys.* **21**:1087-1092
- [50] Michinova-Alexova E.I., Sugár I.P. (2001). Size Distribution of Gel and Fluid Clusters in DMPC:DSPC Lipid Bilayers. A Monte Carlo Simulation Study. *J. Phys. Chem.* **105**:10076-10083
- [51] Michinova-Alexova E.I., Sugár I.P. (2002). Phase and Compositional Separation in DMPC/DSPC Lipid Bilayers. *Abstract 46th Annual Meeting San Francisco, California* Poster 766
- [52] Mouritsen O.G., Bloom M. (1984). Mattress Modell of Lipid–Protein Interactions in Membranes. *Biophys. J.* **46**:141-153
- [53] Nielsen M., Miao L., Ipsen J.H., Zuckermann M.J., Mouritsen O.G. (1999). Off-lattice Model for the Phase Behavior of Lipid-Cholestrol Bilayers. *Phys. Rev. E* **59**:5790-5803
- [54] Nielsen L.K., Vishnyakov A., Jørgensen K., Bjørnholm T., Mouritsen O.G. (2000). Nanometre-scale Structure of Fluid Lipid Membranes. *J. Phys. Condens. Matter* **12**: A309-A314
- [55] Pink D.A., Chapman D. (1979). Protein-Lipid Interactions in Bilayer Membranes: A Lattice Model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:1542-1546
- [56] Pink D.A., Green T.J., Chapman D. (1980). Raman Scattering in Bilayers of Saturated Phosphatidylcholines. Experiment and Theory. *Biochemistry* **19**:349-356

- [57] Polson J.M., Vattulainen L., Zhu H., Zuckermann M.J. (2001). Simulation Study of Lateral Diffusion in Lipid-Sterol Bilayer Mixtures. *Eur. Phys. J. E* **5**:485-497
- [58] Press W.H., Teukolsky S.A., Vetterling W.T., Flannery B.P. (1997). Random Numbers *Online Version Numerical Recipes in C, Second Edition, Reprint 1997, Cambridge University Press* S. 274-283
- [59] Qian H., Sheetz M.P., Elson E.L. (1991). Single Particle Tracking: Analysis of Diffusion and Flow in Two Dimensional Systems. *Biophys. J.* **60**:910-921
- [60] Saffman P.G., Delbrück M. (1975). Brownian Motion in Biological Membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**:3111-3113
- [61] Saxton M.J. (1987). Lateral Diffusion in an Archipelago. The Effect of Mobile Obstacles. *Biophys. J.* **52**:989-997
- [62] Saxton M.J. (1990). Lateral Diffusion in a Mixture of Mobile and Immobile Particles: A Monte Carlo Study. *Biophys. J.* **58**:1303-1306
- [63] Saxton M.J. (1992). Lateral Diffusion and Aggregation. *Biophys. J.* **61**:119-128
- [64] Saxton M.J. (1993). Lateral Diffusion in an Archipelago: Dependence on Tracer Size. *Biophys. J.* **64**:1053-1062
- [65] Saxton M.J. (1993). Single-Particle Tracking: Effects of Corrals. *Biophys. J.* **69**:389-398
- [66] Saxton M.J. (1994). Anomalous Diffusion Due to Obstacles: A Monte Carlo Study. *Biophys. J.* **66**:394-401
- [67] Saxton M.J. (1996). Anomalous Diffusion Due to Binding: A Monte Carlo Study. *Biophys. J.* **70**:1250-1262
- [68] Saxton M.J. (1997). Single-Particle Tracking: The Distribution of Diffusion Coefficients. *Biophys. J.* **72**:1744-1753
- [69] Saxton M.J., Jacobson K. (1997). Single-Particle Tracking: Applications to Membrane Dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**:373-399
- [70] Saxton M.J. (1999). Lateral Diffusion of Lipids and Proteins. *Curr. Top. Membr.* **48**:229-282

- [71] Saxton M.J. (2001). Anomalous Subdiffusion in Fluorescence Photobleaching Recovery: A Monte Carlo Study. *Biophys. J.* **81**:2226-2240
- [72] Schlötzer T. (2002) Domänen in Lipidmembranen: Untersuchungen zum Phasenverhalten von binären Lipidmischungen mit Kalorimetrie und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. *Diplomarbeit, Georg-August-Universität Göttingen*
- [73] Schmidt T., Schütz G.J., Baumgartner W., Gruber H.J., Schindler H. (1996). Imaging of Single Molecule Diffusion. *PNAS* **93**:2926-2929
- [74] Simons K., Ikonen E. (1997). Functional Rafts in Cell Membranes. *Nature* **387**:569-572
- [75] Simson R., Sheets E.D., Jacobson K. (1995). Detection of Temporary Lateral Confinement of Membrane Proteins Using Single-Particle Tracking Analysis. *Biophys. J.* **69**:989-993
- [76] Singer S.J., Nicolson G.L. (1972). The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* **175**:720-731
- [77] Schwille P., Koriach J., Webb W.W. (1999). Fluorescence Correlation Spectroscopy with Single-Molecule Sensitivity on Cell and Model Membranes. *Cytometry*. **36**:176-182
- [78] Sonnleitner A., Schütz G.J., Schmidt T. (1999). Free Brownian Motion of Individual Lipid Molecules in Biomembranes. *Biophys. J.* **77**:2638-2642
- [79] Sugár I.P., Thompson T.E., Biltonen R.L. (1999). Monte Carlo Simulation of Two-Component Bilayers: DMPC/DSPC mixtures. *Biophys. J.* **76**:2099-2110
- [80] Sugár I.P., Biltonen R.L. (2000). Structure-Function Relationships in Two-Component Phospholipid Bilayers: Monte Carlo Simulation Approach Using a Two-State Model. *Meth. Enzym.* **323**:340-372
- [81] Sugár I.P., Michinova-Alexova E., Chong P.L. (2001). Geometrical Properties of Gel and Fluid Clusters in DMPC/DSPC Bilayers: Monte Carlo Simulation Approach Using a Two-State Model. *Biophys. J.* **81**:2425-2441
- [82] Tsuji A., Ohnishi S. (1986). Restriction of the Lateral Motion of Band 3 in the Erythrocyte Membrane by the Cytoskeletal Network: Dependence on Spectrin Association State. *Biochemistry* **25**:6133-6139

- [83] Vaz W.L.C., Criado M., Madeira V.M.C., Schoellmann G., Jovin T.M. (1982). Size Dependence of the Translational Diffusion of Large Integral Membrane Proteins in Liquid-Crystalline Phase Lipid Bilayers. A Study using Fluorescence Recovery after Photobleaching. *Biochemistry*. **21**:5608-5612
- [84] Vaz W.L.C., Clegg R.M., Hallmann D. (1985). Translational Diffusion of Lipids in Liquid Crystalline Phase Phosphatidylcholine Multibilayers. A Comparison of Experiment with Theory. *Biochemistry* **24**:781-786