

Domänen in Lipidmembranen:
Untersuchungen zum Phasenverhalten von binären
Lipidmischungen mit Kalorimetrie und konfokaler
Fluoreszenzmikroskopie.

Diplomarbeit

vorgelegt von
Thomas Schlötzer
aus Erbendorf

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

Danksagung

Diese Diplomarbeit entstand in der Zeit von Dezember 2000 bis Mai 2002 am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Heimbürg, in dessen Arbeitsgruppe „Membranthermodynamik und Biophysik“ ich die Diplomarbeit anfertigen konnte. Ich danke ihm für die Betreuung der Arbeit und für die wichtigen Anregungen. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Manfred Radmacher, welcher die Arbeit von Seiten der Universität Göttingen betreute. Darüberhinaus möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die Zusammenarbeit und das gute Klima danken, insbesondere Heiko Seeger, der mit seinen Linuxkenntnissen viel Hilfestellung leistete. Nicht zu vergessen die Mitarbeiter der Werkstätten für Mechanik und Elektronik und die Hilfe von Martin Fechner in Computerfragen.

Allen Leuten, die auch durch ihre emotionale Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben gebührt besonderer Dank.

Göttingen im Mai 2002

Thomas Schlötzer

Zusammenfassung

Phospholipide und Proteine sind die Bausteine biologischer Membranen. Aufgrund deren Komplexität ist es aber nicht möglich exakte Aussagen und Voraussagen zu formulieren. Inhalt dieser Arbeit war es deswegen, ein Modellsystem von nur zwei Phospholipiden (DMPC¹ und DSPC²) mit den Mitteln der Kalorimetrie und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie zu untersuchen. Es wurde ein Phasendiagramm des Mischsystems erstellt und der Einfluss der verwendeten Fluoreszenzmarker, die für die konfokale Mikroskopie zugegeben werden, auf die Phasenübergänge untersucht. Dann wurden mit verschiedenen Techniken Riesenvesikel der unterschiedlichen Kompositionen hergestellt, bei welchen danach mit Hilfe konfokaler Fluoreszenzmikroskopie die vorhergesagte Phasenseparation visualisiert wurde. Diese Aufnahmen wurden dann mit den Ergebnissen aus den Monte-Carlo-Simulationen verglichen.

Es ist festzuhalten, dass diese gemischten Lipidsysteme im Phasenkoexistenzbereich eine makroskopische Entmischung aufweisen. Die Analyse der Bilder und der Vergleich mit den Monte-Carlo-Simulationen legt die Vermutung nahe, dass diese makroskopischen Phasen jedoch auch eine innere Struktur, sog. Mikrodomänen besitzen, die unterhalb des Auflösungsvermögens des Mikroskops liegen.

¹Dimyristoyl-Phosphatidylcholin

²Distearoyl-Phosphatidylcholin

Abkürzungen

DSC	:	Differential Scanning Kalorimetrie
LSM	:	Laser Scanning Mikroskopie
DLPC	:	1,2-Dilauroyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DMPC	:	1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DPPC	:	1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
DSPC	:	1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
D-307	:	1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate (<i>DiIC</i> ₁₈)
D-3803	:	2-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza- <i>s</i> -indacene-3-pentanoyl)-1-hexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine (β -BODIPY)
HEPES	:	(N-[2-Hydroxyethyl] Piperacin-N'-[2-Ethan Sulfonsäure])
EDTA	:	Ethylendiamin-Tetraessigsäure-Diammoniumsalz
SUV	:	Small Unilamellar Vesicle
LUV	:	Large Unilamellar Vesicle
MLV	:	Multilamellar Vesicle
GUV	:	Giant Unilamellar Vesicle

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Biologische Membranen	7
1.2	Membranbausteine	8
1.3	Schmelzprozesse in Membranen	10
1.4	Membranmodelle	13
1.5	Motivation	15
2	Theorie	17
2.1	Phasenübergänge	17
2.2	Lipidmischungen	19
2.2.1	Ideale Mischungen von Zweikomponentensystemen	19
2.2.2	Reale Mischungen	23
2.3	Monte-Carlo-Simulationen von Lipidsystemen	24
2.3.1	Simulation von Einkomponentensystemen	24
2.3.2	Simulation von Mehrkomponentensystemen	28
2.3.3	Fremdmoleküle in Einkomponentensystemen	30
2.4	Zusammensetzung der Domänen	31
3	Materialien und Methoden	35
3.1	Kalorimetrie	35
3.2	Fluoreszenz	37
3.3	Mikroskopie	39
3.3.1	Konventionelle Mikroskopie	39
3.3.2	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	39
3.3.3	Laserscanningmikroskopie und Schichtbilder	40
3.4	Materialien und Probenpräparation	42
4	Giant Unilamellar Vesicles	45
4.1	Guv's als Modellsystem	45
4.2	Herstellung der Vesikel	46
4.2.1	Sanfte Hydratation	47

4.2.2	Elektroformation	48
4.3	Beobachtungen und Erkenntnisse	50
5	Resultate	55
5.1	Phasendiagramm	55
5.2	Farbstoffe in der Membran	58
5.2.1	Interpretationsmodell	59
5.2.2	Mischsystem aus DLPC und DPPC	60
5.2.3	Mischsystem von DMPC und DSPC	63
5.3	Konfokale Bilder von Riesenvesikeln	64
5.4	Bestimmung der Domänengrößen	65
5.5	Vergleich mit MC-Simulationen	72
6	Ausblick	75

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Biologische Membranen

Überall in der belebten Natur finden wir Membranen. Die Entstehung des Lebens selbst wurde nur möglich durch die Entwicklung der Membran. Erst so ist es möglich, ein Innen und Aussen zu definieren und lebende Entitäten von einer leblosen und feindlichen äusseren Umgebung zu isolieren. So entstanden die kleinsten strukturellen Einheiten des Lebens.

Durch deren Evolution entwickelten sich die Zellen, deren Funktion auf dem wohlkontrolliertem Zusammenspiel und dem Austausch von Materie der einzelnen Kompartimente beruht, die alle ihre spezifischen Aufgaben erfüllen. All diese Untereinheiten oder Organellen, wie Zellkern, Mitochondria, Golgiapparat usw. auch genannt werden, sind von Membranen umgeben. Durch die Beschränkung auf zwei Dimensionen wurden diffusionsabhängige Prozesse wesentlich wahrscheinlicher. Prozesse, die erst durch das Zusammentreffen von spezifischen Molekülen gesteuert werden, wurden so in adequaten Raten möglich. Daher ist die Membran auch ein Ort der Synthese von biologischem Material wie den Proteinen oder Enzymen und der Katalyse von biologischen Prozessen.

Die Aufteilung in verschiedene Kompartimente eröffnete die Möglichkeit zur Ladungstrennung (wie zum Beispiel bei den Ladungstransferketten der photosynthetischen Membranen) und dem zeitweiligen Speichern von Energie in Form von elektrochemischen Gradienten über die Membranen.

Auch für die Nervenreizleitung spielt die Membran eine grosse Rolle. Hier wird der Nervenpuls als ein über die Membran laufender elektrischer Puls interpretiert, immer verbunden mit dem Ein- oder Ausströmen von Ionen wie Natrium oder Kalium durch spezifische Ionenkanäle. Diese Ionenkanäle werden entweder von einzelnen Proteinen oder von Proteingruppen gebildet.

1.2 Membranbausteine

Die biologischen Membranen sind Systeme von enormer Komplexität, denn sie bestehen aus einer Vielzahl von verschiedenen Bausteinen, hauptsächlich aus Phospholipiden und Proteinen. Diese Vielfalt ist sicher nicht zufällig, sondern zweckgebunden. Welchem exakten Zweck diese Vielfalt dient, ist unklar. Man geht davon aus, dass es durch die Notwendigkeit bedingt ist, den Membranproteinen die benötigte spezifische Mikroumgebung aus den „richtigen“ Lipiden zur Verfügung zu stellen [50]. Die Proteine werden im allgemeinen für die Funktionen und Prozesse in biologischen Systemen verantwortlich gemacht. Sie sind allerdings hier nicht Gegenstand eingehender Betrachtungen. Phospholipide sind amphiphile Moleküle mit einer polaren Kopfgruppe und einem oder zwei unpolaren Fettsäureresten, die durch eine Glycerolbrücke verbunden sind (siehe Abb. 1.1). Die Lipide, die in der Natur vorkommen, unterscheiden sich untereinander durch folgende Eigenschaften:

- Grösse und Ladung der Kopfgruppe: Sie kann negativ geladen, zwitterionisch oder auch neutral sein.
- Anzahl der Kohlenstoffatome in den Ketten: Diese schwankt für die meisten Phospholipide zwischen 12 und 24 Atome.
- Anzahl und Lage der Doppelbindungen in den Ketten (von 0 bis 6)

Die Plasmamembran menschlicher Erythrocyten zum Beispiel bestehen aus 150 bis 200 verschiedenen Lipiden [2].

Setzt man die Phospholipide einem polaren Lösungsmittel wie dem Wasser aus (wie das ja in der Natur auch meistens der Fall ist), so bilden sie Makrostrukturen, die durch die Geometrie der Lipide und den „hydrophoben Effekt“ bestimmt werden.

Dazu gehören unter anderem (siehe Abb. 1.2):

- Mizellen - kugelförmige Geometrie
- Lipid-Doppelschichten (Bilayer) - zweidimensionale, planare Geometrie → Membranen
- invers hexagonale Phasen - zylinderförmige Geometrie mit einem inneren Wasserkern: Die Zylinder lagern sich zu zweidimensionalen, hexagonalen Gittern zusammen.

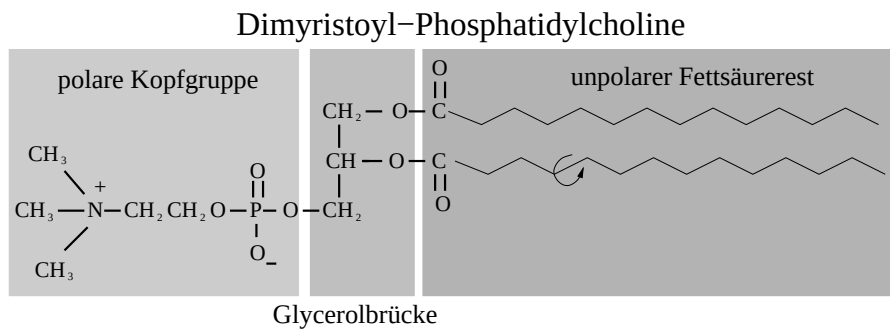


Abbildung 1.1: *Struktur eines Phospholipids (hier: DMPC = **D**imyristoyl-**p**hosphatidylcholine)* Ein typisches Phospholipid besitzt eine polare Kopfgruppe und unpolare Fettsäureketten, die durch eine Glycerolbrücke verbunden sind. Hier liegen die Fettsäureketten in einer sogenannten all-trans-Konfiguration vor. Sie sind völlig geordnet. Der Pfeil um eine der C-C-Bindungen zeigt eine mögliche Drehung an, wie sie beim Schmelzprozess der Ketten angeregt werden.

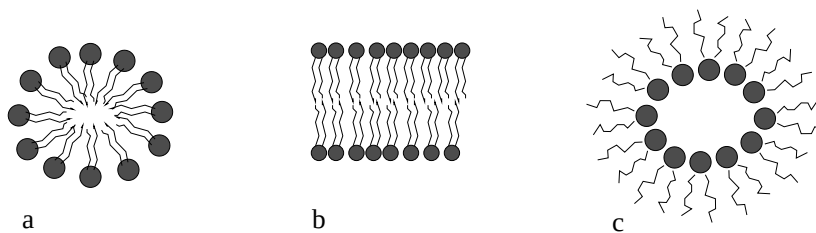


Abbildung 1.2: *Mögliche Strukturen von Lipiden in Lösungsmitteln.* a) zeigt die Mizellenstruktur, bei dem die Lipide kleine sphärische Einheiten bilden. Im Bild b) sieht man die Lipiddoppelschicht und in c) eine inverse Struktur. Letztere bilden makroskopisch eine hexagonale Struktur in der Form aus, dass die Ketten nicht mit dem Wasser wechselwirken müssen.

In all diesen Strukturen weisen die Lipid-Kopfgruppen dem Wasser zu.

Lipidmonomere sind eher selten. Man findet sie unterhalb der sog. kritischen Mizellkonzentration „CMC“, welche auch von Lipid zu Lipid variiert. Bei vielen zwitterionischen Lipiden liegt die CMC bei Konzentrationen von $c_{CMC} < 10^{-10} \text{ mol/l}$. Das heisst, es gibt nur sehr wenig Lipid-Monomere in

Lösung. Auch dies wird durch den hydrophoben Effekt bestimmt. Er besagt, dass eine Wechselwirkung der hydrophoben Kohlenwasserstoffgruppen mit dem polaren Wasser eine ungünstige freie Grenzflächen-Energie besitzt. Der entropische Anteil des hydrophoben Effekts kommt von der verringerten Zahl der Anordnungen, die das System „Lipide mit dem umgebenden Wasser“ annehmen kann. Die Wassermoleküle müssen, um ihre Wasserstoffbrückenbindungen zu erhalten, ihre relative Lage zueinander verändern. Der energetische Anteil rührt von der zu minimierenden Grenzflächen-Energie her, die durch die Wechselwirkung der hydrophoben Anteile mit dem Wasser entsteht.

Weitere Parameter, die die Natur der Lipidaggregate bestimmen, sind die Temperatur, die Lipidkonzentration, der pH-Wert und natürlich die Lipidsorte (vornehmlich die relative Grösse der hydrophoben und der hydrophilen Gruppen).

1.3 Schmelzprozesse in Membranen

In Abbildung 1.1 liegen die Fettsäureketten in einer sogenannten all-trans-Konfiguration vor. Sind alle Phospholipide in dieser Konfiguration, so bezeichnet man dies als „ L_β -Phase“ und nennt das System gelförmig. Bei Erhöhung der Temperatur werden Rotationsfreiheitsgrade um die einzelnen C-C-Bindungen angeregt und die bisher vorhandene hohe Ordnung der Moleküle geht verloren. Man spricht vom *Schmelzen* der Membran. Bei den meisten reinen Lipidsystemen gibt es eine sogenannte Vorumwandlung, bei der die Membran in die gewellte Ripple-Phase P_β übergeht. Heimburg interpretiert diese Phase mit Schmelzprozessen, wobei sich die fluiden Lipide als periodische Liniendefekte in der ansonsten noch gelförmigen Matrix anordnen [27]. Diese Zwischenphase ist allerdings kein Gegenstand dieser Arbeit.

Am Ende der Umwandlung sind sämtliche Ketten geschmolzen und bilden die ungeordnete L_α -Phase. Die Membran nennt man nun fluid. Abb. 1.3 zeigt diese Übergänge schematisch. Dieser gesamte Schmelzprozess ist verbunden mit einer Zunahme der Enthalpie und der Entropie des Systems. Die Enthalpie-Differenz ΔH kommt von der zusätzlichen Energie der Kohlenwasserstoffketten, die vergrößerte Entropie ΔS des Systems von der angewachsenen Zahl der Anordnungsmöglichkeiten des Systems.

Die Enthalpiezunahme kann durch Kalorimetrie sichtbar gemacht werden, wobei man die aufgenommene Wärme misst, die dem System bei dem Schmelz-

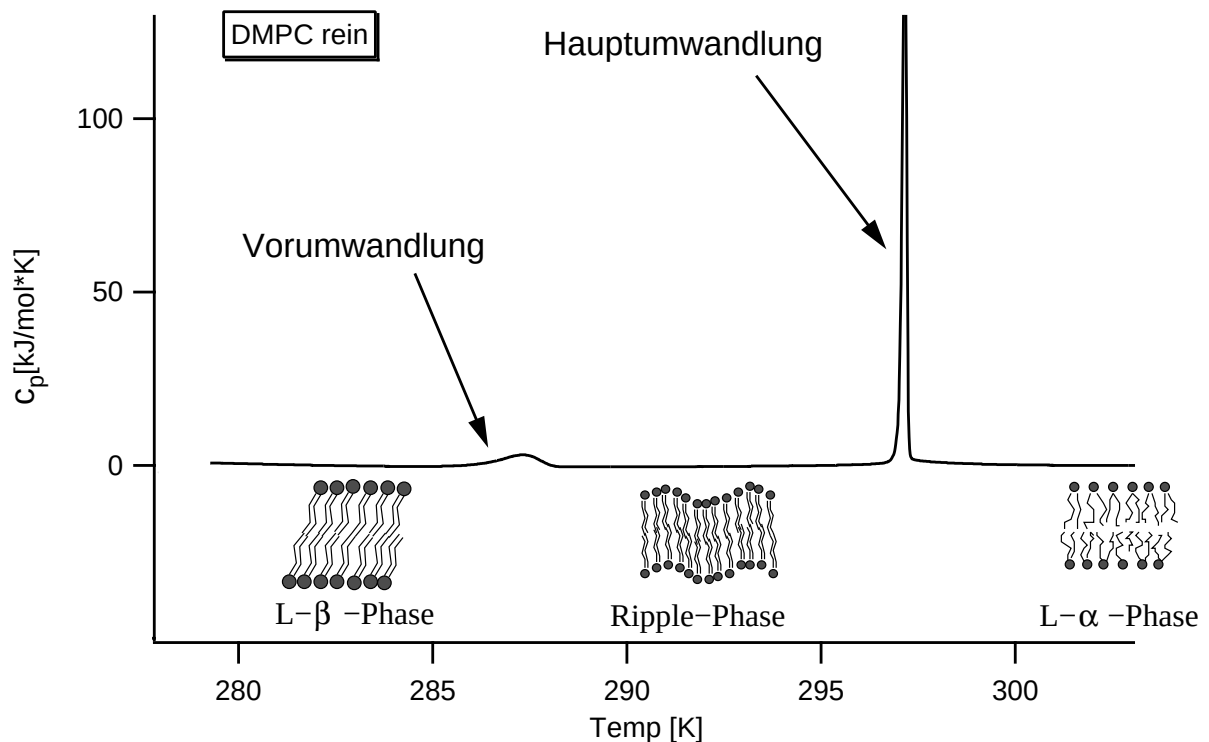


Abbildung 1.3: Schmelzprofil einer Lipid-Phasenumwandlung anhand des Beispiels einer reinen DMPC-Suspension. Die Membranen vollziehen einen Übergang von der geordneten L_β -Phase hin zur ungeordneten L_α -Phase. Die gewellte Ripple-Phase ist nur ein Zwischenzustand.

prozess zugeführt werden muss. Die Ableitung der Enthalpiekurve nach der Temperatur (siehe Kap. 3.1) ergibt die spezifische Wärmekapazität c_p . Diese Kurve besitzt Bereich der Umwandlung ein Maximum. Unter anderem verändert sich auch das Volumen der Membran sowie die Oberfläche und die elastischen Konstanten. Alles in allem kann man sagen, dass sämtliche Parameter des Systems im Bereich des Übergangs eine Änderung erfahren, welche nicht unabhängig voneinander zu betrachten sind.

Der Schmelzprozess der Ketten ist bei einkomponentigen Systemen eine Umwandlung mit einem sehr scharf ausgeprägten c_p -Profil. Multilamellare Suspensionen von Phosphatidylcholinen haben eine Umwandlungsbreite von ca. 1/10 K. Würden die einzelnen Ketten völlig unabhängig voneinander aufschmelzen, wäre die Enthalpie der Umwandlung gleich der van't Hoff'schen

Wärme und die Halbwertsbreite der Umwandlung müsste ca. 60 K betragen [22]. Das heisst, die Kohlenwasserstoffketten schmelzen nicht unabhängig voneinander, sondern beeinflussen sich gegenseitig sehr stark. Man nennt die Umwandlung kooperativ. Bei Mehrkomponenten-Systemen wird der Umwandlungspeak deutlich verbreitert und somit auch wesentlich niedriger, da die Gesamtenthalpiedifferenz der Umwandlung in etwa gleich bleibt. Vor allem die Zugabe von Cholesterin, einem kleinen Steroid, das in der Plasmamembran von Eukaryoten mit bis zu 20 % enthalten ist, verbreitert die Umwandlung schon in verhältnismässig geringer Konzentration. Ab einem Anteil von ca. 30 % in einer sonst reinen Lipidsuspension macht es die Schmelzprozesse schwer auflösbar, da Baseline und Signal kaum mehr voneinander getrennt werden können. Die Umwandlungstemperaturen der Lipide hängen

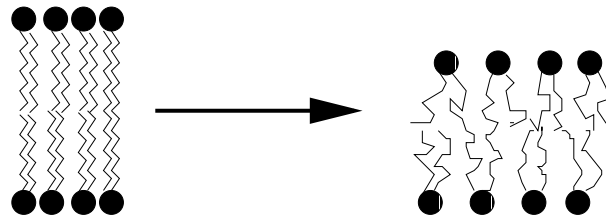


Abbildung 1.4: *Schmelzen der Membran: Aus der all-trans-Konfiguration geht die Doppelschicht in die L_α -Phase über. Hier sind sowohl die Ketten als auch die Positionen der Lipide in der Matrix nicht mehr geordnet.*

von der Kettenlänge, der Ladung und der Art der Kopfgruppe ab und befinden sich im Grossen und Ganzen im Bereich physiologischer Temperaturen (ca. -20°C bis 60°C). So schmilzt zum Beispiel das DSPC (**D**istearoyl-**P**hosphatidylcholine) mit einer Kettenlänge von 18 C-Atomen bei einer Temperatur von ca. 54°C . Allerdings wird diese Umwandlung durch das Einfügen einer einzigen Doppelbindung in jeder der beiden Kohlenstoffketten (DOPC = Dioleoyl-Phosphatidylcholin) um bis zu 70 K, je nach Lage der Doppelbindung, herabgesetzt.

Des weiteren zeigt die Membran im Bereich der Umwandlung enorme Fluktuationen¹ der Enthalpie, des Volumens und der lokalen Packungsdichte der Moleküle, welche sie extrem weich und auch permeabel für Ionen oder andere kleine Moleküle werden lässt. Diese Fluktuationen hängen linear mit der Wärmekapazität zusammen [21]. Daraus folgt, dass auch sie in der Umwandlung ihr Maximum erreichen. Die Fluktuationen führen zur Ausbildung von sogenannten Mikrodomänen, bei der sich kleine Cluster einer Phase inner-

¹Schwankungen um den Mittelwert

halb der anderen Phase ausbilden. Am Schmelzpunkt T_m oder im Regime der Umwandlung führt dies zu einer makroskopischen Entmischung der beiden Phasen.

Biologische Membranen sind extrem vielfältig zusammengesetzt und enthalten in der Regel einen grossen Anteil an Cholesterin. Dies lässt vermuten, dass sie sich bei physiologischen Temperaturen eigentlich immer sehr nah am Umwandlungspunkt befinden und durch kleine Änderungen z.B. der lokalen Zusammensetzung, in den Bereich der Umwandlung kommen und so spezifische Membranprozesse oder auch das Durchdringen kleiner Moleküle ermöglichen können.

1.4 Membranmodelle

Das wissenschaftliche Bild von Membranen ist stark geprägt durch das Fluid-Mosaik-Modell von Singer und Nicholson, welches 1972 veröffentlicht wurde [61]. Abb. 1.5 zeigt die Membran als zweidimensionale Flüssigkeit aus Phospholipiden, in der die Proteine völlig frei beweglich „herumschwimmen“. Interaktionen zwischen den Proteinen und der sie umgebenden Flüssigkeit werden nicht in Betracht gezogen und die biologischen Funktionen alleine den Proteinen zugeschrieben. Die Phospholipidmembran fungiert hier also als reine Trägermatrix ohne Auswirkungen auf Abläufe in der Membran zu haben.

Diese sehr vereinfachte Betrachtung ist in der jüngeren Vergangenheit allerdings überarbeitet worden. Zum Beispiel geht sie überhaupt nicht auf die Vielfalt der Lipide in biologischen Systemen ein. Der Grund für diese Vielfalt ist noch nicht gefunden. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass z.B. mechanische Eigenschaften der Membran, wie die Elastizität oder Kompressibilität, sehr sensitiv von der Zusammensetzung der Lipidmembran abhängig sind [55].

Der Oberflächenfilm der Lunge, der die Lungenbläschen am Kollabieren hindert, verändert z.B. sein elastisches Verhalten ganz entscheidend, wenn sich die Lipidzusammensetzung verändert [10]. Ausserdem stellte sich mit der Entdeckung der sog. „Rafts“² die Frage, ob die biologische Membran ebensolche, an Glykosphingolipiden reichen Domänen enthält. Die Raft-Hypothese

²kleine unzusammenhängende Membrandomänen, die sehr reich an Cholesterin und Sphingolipiden und speziellen Proteinen sind. Nachgewiesen wurden sie erstmals durch die Bearbeitung von Membranen mit Detergenzien. Die unlöslichen Rückstände dieser Versuche nannte man „Rafts“

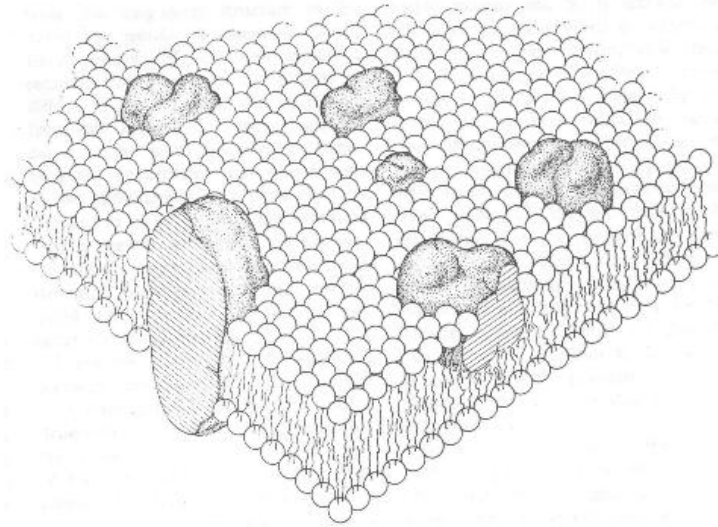


Abbildung 1.5: *Fluid-Mosaik-Modell: Die Phospholipide, alle im fluid-kristallinen Zustand, bilden in biologischen Zellen eine Doppelschicht, in der die Proteine frei beweglich sind.*

besagt, dass bestimmte, in der Natur vorkommende Lipide wegen intermolekularer Wechselwirkungen in der Membranebene aggregieren. Zu diesen Wechselwirkungen gehören die van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den langen, fast vollständig gesättigten Kohlenstoffketten des Sphingomyelin und der Glycosphingolipide. Ausserdem spielen auch die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen benachbarten Glycosyl-Einheiten eine Rolle [60].

Diese heterogene Verteilung von Membranbausteinen wurde in der physikalische Chemie schon seit längerem propagiert, da sie sich für Modellsysteme (einfache Zwei- oder Dreikomponentensysteme) aus den Phasendiagrammen ableiten lässt. Vor einigen Jahren war man auch erstmals in der Lage, diese Phasenkoexistenz mittels Untersuchungen an Monofilmen (mit atomarer Kraft-Mikroskopie AFM) und Bilayern (mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie) zu belegen [36, 19, 6, 7].

Mittlerweile sieht man die biologische Membran nicht mehr als reines Stützgerüst ohne Einfluss auf die Funktionalität, sondern als eine komplexe, heterogene Anordnung von verschiedenen Domänen aus einer Vielfalt von Phospholipiden in gelförmigem oder fluid-kristallinem Zustand, in welchen die Proteine ihre benötigte spezifische Mikroumgebung vorfinden [50]. Dies ist auch in Abb. 1.6 dargestellt. Die Membrandoppelschicht, durchsetzt von integralen Proteinen, weist in deren Umgebung eine besondere Lipidverteilung

auf.

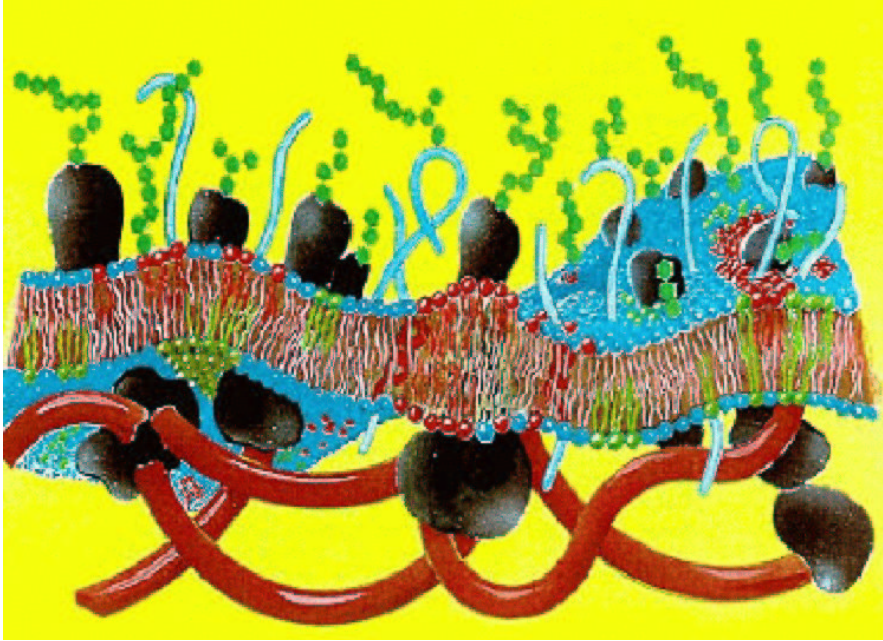


Abbildung 1.6: *Matratzenmodell: Die Phospholipide bilden unterschiedliche zusammenhängende Einheiten (Domänen), die in gelförmiger oder fluider Phase vorkommen können. Die Proteine sind in der Membran nicht immer frei beweglich, sondern meist an das zellinnere Cytoskelett gebunden. Das Bild ist geprägt von Mouritsen [50].*

In diesen Domänen ist auch die Löslichkeit der verschiedenen Proteine, die in die Membran eingebaut sind, unterschiedlich. Dies und die Tatsache, dass Membranen im Bereich ihrer Schmelzumwandlung sehr stark fluktuieren, führt dazu, dass z.B. Prozesse, die nur durch das Aufeinandertreffen von Proteinen gestartet werden können, erst in Gang gesetzt werden.

1.5 Motivation

Die erwähnte lokale Entmischung der Lipide auf mikroskopischer Ebene ist in biologischen Membranen optisch erst in jüngster Vergangenheit sichtbar gemacht worden [26]. In einfachen Modellmembranen jedoch wurden mittels Atomarer Kraft Mikroskopie oder Brewster-Winkel-Mikroskopie die Pha-

senentmischung im Koexistenzbereich an monomolekularen Schichten schon vor einigen Jahren gezeigt [28, 52].

Der Nachweis der Entmischung in binären Mischungen von gesättigten Phospholipiden in freien Doppelschichten ist erst vor kurzem gelungen [36, 19].

Ziel dieser Arbeit ist es, dieses Phasentrennungsverhalten bei einem Zweikomponentensystem von gesättigten Phospholipiden mittels Kalorimetrie zu untersuchen und anschliessend in einem für biologische Untersuchungen oft verwendeten konfokalen Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen.

Um Wechselwirkungen mit Trägermaterialien auszuschliessen, werden dafür als Modellsystem sog. Riesenvesikel verwendet (Kap. 4).

Diese experimentellen Ergebnisse werden anschliessend mit theoretischen Daten aus Monte-Carlo-Simulationen, die das gleiche System simulieren, verglichen. Diese Simulationen werden parallel in der gleichen Arbeitsgruppe von Heiko Seeger angefertigt [59].

Kapitel 2

Theorie

2.1 Phasenübergänge

Die verschiedenen Aggregatzustände eines Stoffes (fest, flüssig, gasförmig oder Plasma) nennt man Phasen. Abhängig vom Druck p und der Temperatur T der Umgebung kann ein Stoff diese verschiedenen Phasen einnehmen. Es liegt immer die Phase vor, die das geringste chemische Potential $\mu(p, T)$ besitzt.

Über die bisher erwähnten Phasen hinaus gibt es noch zahlreiche weitere Phasenübergänge wie z.B. in der Festkörperphysik die Übergänge Paramagnet-Ferromagnet, Normalleiter-Supraleiter oder, wie hier behandelt, der Übergang zwischen der geförmigen und der fluiden Phase von Phospholipiden. Anhand ihrer Eigenschaften kann man diese Übergänge in verschiedene Klassen einteilen:

Phasenübergänge heißen n -ter Ordnung, wenn die n -te Ableitung des chemischen Potentials $\mu(p, T)$ des Systems einen Sprung aufweist (Ehrenfest-Theorem) [20, 41].

Am Punkt des Phasenüberganges sind die chemischen Potentiale der beiden Phasen im thermodynamischen Gleichgewicht gleich $\mu_A(p, T) = \mu_B(p, T)$. Für Systeme aus mehreren Komponenten wie z.B. gemischte Phospholipidsysteme gilt die Phasenregel von Gibbs:

$$f = k + 2 - p \quad (2.1)$$

Hierbei ist die Anzahl der Komponenten gleich k , es sind p Phasen möglich. Dann besitzt das System noch f Freiheitsgrade. Bei konstantem Druck

(wie bei den in dieser Arbeit durchgeführten kalorimetrischen Messungen) reduziert sich die Zahl der Freiheitsgrade um 1 und es gilt:

$$f = k + 1 - p \quad (2.2)$$

Als Phase bezeichnet man allgemein homogene, makroskopische Gebiete innerhalb eines Systems, die durch Trennungsflächen gegeneinander abgegrenzt sind. Man macht aber meistens die Annahme, dass in grossen Systemen der Einfluss dieser Grenzflächen vernachlässigt werden kann.

In den letzten Jahrzehnten wurden die Eigenschaften einer Vielzahl von zwei- und mehrkomponentigen Lipidmischungen untersucht. Obwohl es sich im Vergleich zu biologischen Membranen um sehr einfache Systeme handelt, kann man doch eine Reihe von Eigenschaften daran darstellen. All diese Versuche wurden in der Anwesenheit von Wasser durchgeführt, weil dies dem Zustand in biologischen Systemen vergleichbar ist. Der Einfluss des Wassers wird in der Regel vernachlässigt, weil es sich meist um vollständig hydrierte Systeme handelt. Da hierbei Wasser als Komponente und eigene Phase betrachtet wird, ändert sich nichts an der Zahl der Freiheitsgrade.

Die Eigenschaften solcher Systeme werden in der Regel in Form von Phasendiagrammen dargestellt. Diese sind allerdings nur eindeutig, wenn die Umwandlungen der einzelnen Komponenten von erster Ordnung sind. Bei Lipiden spricht man von pseudo-kritischen Systemen. Das heisst, es handelt sich um Systeme, die vom Charakter erster Ordnung sind, sich jedoch in der Nähe eines kritischen Punktes befinden [51].

Bei der Erstellung eines experimentellen Phasendiagrammes nimmt man z.B. Daten, die kalorimetrisch bestimmt wurden. Abb. 2.1 zeigt links ein gemessenes c_p -Profil einer Lipidmischung aus DMPC und DSPC¹ im Verhältnis von 30:70 der Konzentration 10 mM. Es ist üblich, dass die Phasengrenzen bestimmt werden, indem man bei den c_p -Kurven eine Tangente an die ansteigende und an die abfallende Flanke des Profils zeichnet und die Schnittpunkte der Tangente mit der Grundlinie bestimmt. Jenseits dieser Punkte nimmt man an, dass die Mischung vollständig gelförmig respektive fluid ist und keine Phasenkoexistenz mehr vorliegt. Diese Punkte werden dann aus den Kurven der verschiedenen Zusammensetzung des Systems entnommen und über der Konzentration aufgetragen. Dies ist allerdings nur eine Hilfskonstruktion, da reale Systeme von solchen, die mit Hilfe der „Regular Solution Theory“ berechnet werden können, abweichen. Die rechte Seite von Abb. 2.1 zeigt, wie das c_p -Profil gemäss der Theorie aussieht. Dort ist der Phasenkoexistenzbereich eindeutig zu erkennen. Im Bereich **G** liegt alles im gelförmigen Zustand

¹Die Erklärung der genannten Lipide findet sich im Kapitel 3

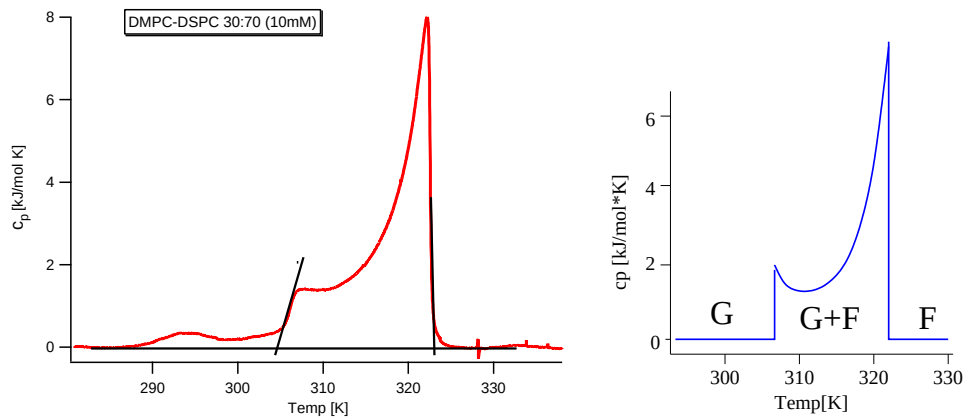


Abbildung 2.1: links: 30:70 Mischung von DMPC und DSPC. Laut Konvention werden die Phasengrenzen durch den Schnittpunkt einer Tangente an das c_p -Profil mit der Baseline bestimmt. Diese Hilfskonstruktion wird genutzt, weil die realen Messkurven von denen aus der „Regular Solution Theory“ (rechts) abweichen.

vor, im Bereich **F** alles im fluiden und im Bereich **G+F** findet man Phasenkoexistenz von fluiden und gelförmigen Bereichen, die sich makroskopisch entmischen.

2.2 Lipidmischungen

2.2.1 Ideale Mischungen von Zweikomponentensystemen

An idealen Mischungen von Lipiden kann man beispielhaft herleiten, welche Gesetzmässigkeiten bei gemischten Systemen herrschen. Ideale Mischung bedeutet, dass zwei verschiedenartige Moleküle genauso wechselwirken wie zwei gleichartige Moleküle. Abb. 2.2 zeigt ein Phasendiagramm einer idealen Mischung von zwei Komponenten in beiden Phasen. In der Region **G** liegt alles in der gelförmigen Phase vor, in der Region **F** alles in der fluiden und in der linsenförmigen Region **F+G** finden wir eine Koexistenz von gelförmiger und fluiden Phase. Die beiden Phasen entmischen sich in diesem Koexistenzbereich und bilden makroskopische Bereiche.

Folgende Herleitung findet sich ausführlich bei Lee A.G.[40]:

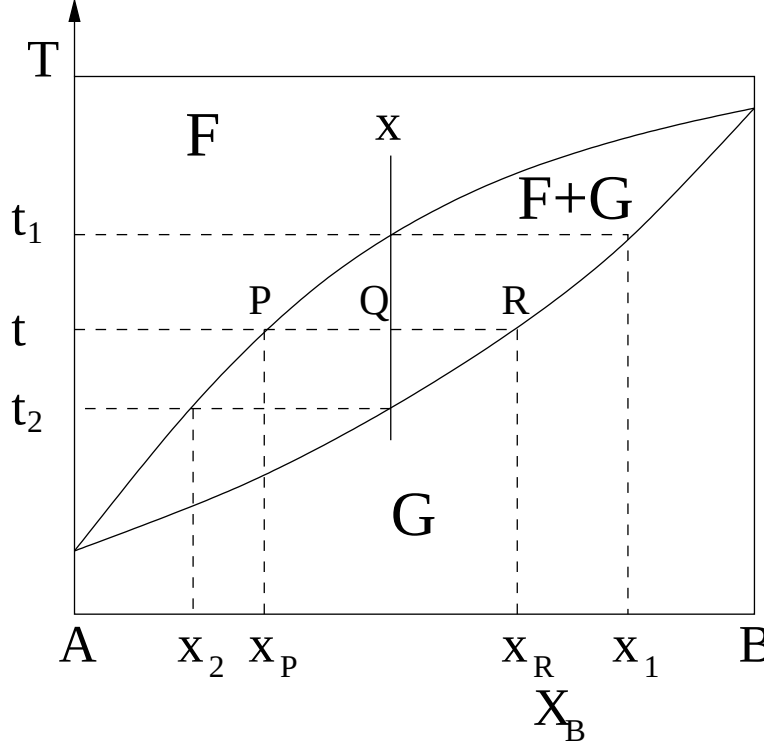


Abbildung 2.2: Phasendiagramm einer idealen Mischung zweier Komponenten **A** und **B** in der fluiden und in der gelförmigen Phase

Sei bei einer beliebigen Temperatur T das System im Gleichgewicht, dann ist das chemische Potential der Komponente **A** in beiden Zuständen gleich: $\mu_A^{(G)} = \mu_A^{(F)}$. Dies gilt natürlich auch für Komponente **B**: $\mu_B^{(G)} = \mu_B^{(F)}$. Das chemische Potential der Komponente **A** in der fluiden Phase ist gegeben durch

$$\mu_A^{(F)} = \mu_A^{(F)0} + RT \ln x_A^{(F)} \quad (2.3)$$

wobei $\mu_A^{(F)0}$ die konstante Gibbs'sche freie Enthalpie eines Mols der reinen Komponente **A** in der fluiden Phase bei Temperatur T unter Standardbedingungen ($p = 1 \text{ bar}$) darstellt. R ist die allgemeine Gaskonstante. $x_A^{(F)}$ steht für die Molfraktion der Komponente **A** im fluiden Zustand. In der gelförmigen Phase gilt:

$$\mu_A^{(G)} = \mu_A^{(G)0} + RT \ln x_A^{(G)} \quad (2.4)$$

Daraus folgt im Gleichgewicht:

$$\ln \frac{x_A^{(F)}}{x_A^{(G)}} = \frac{-\mu_A^{(F)0} + \mu_A^{(G)0}}{RT} \quad (2.5)$$

Leitet man nun $\ln \frac{x_A^{(F)}}{x_A^{(G)}}$ ab, führt dies zu:

$$\left(\frac{\partial \ln \frac{x_A^{(F)}}{x_A^{(G)}}}{\partial T} \right) = \frac{-H_A^{(G)0} + H_A^{(F)0}}{RT^2} = \frac{(\Delta H_A)_T}{RT^2} \quad (2.6)$$

wobei $(\Delta H_A)_T = H_A^{(F)0} - H_A^{(G)0}$. Wenn man davon ausgeht, dass die Differenz in der Wärmekapazität zwischen den beiden Phasen $\Delta c_p = 0$ ist, und da am Schmelzpunkt T_A gilt: $x_A^f = x_A^g$ und somit $\ln \frac{x_A^f}{x_A^g} = 0$ ergibt Gleichung 2.6 zwischen T_A und T integriert:

$$\ln \frac{x_A^{(F)}}{x_A^{(G)}} = \frac{-(\Delta H_A)_{T_A}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_A} \right) \quad (2.7)$$

Gleichung 2.7 kann umgeschrieben werden zu:

$$\frac{x_A^{(F)}}{x_A^{(G)}} = \exp \left[\frac{-(\Delta H_A)_{T_A}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_A} \right) \right] \equiv e^{-A} \quad (2.8)$$

Für Komponente B folgt analog:

$$\frac{x_B^{(F)}}{x_B^{(G)}} = \exp \left[\frac{-(\Delta H_B)_{T_B}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_B} \right) \right] \equiv e^{-B} \quad (2.9)$$

Die Gleichungen 2.8 und 2.9 enthalten die vier Unbekannten $x_A^{(F)}$, $x_A^{(G)}$, $x_B^{(F)}$ und $x_B^{(G)}$. Gebraucht man die Beziehungen:

$$x_A^{(G)} = 1 - x_B^{(G)} \quad (2.10)$$

$$x_A^{(F)} = 1 - x_B^{(F)} \quad (2.11)$$

und setzt diese in die oben erhaltenen Gleichungen 2.8 und 2.9 ein, ergeben sich:

$$x_A^{(F)} = (1 - x_B^{(G)})e^{-A} \quad (2.12)$$

$$x_B^{(G)} = \frac{x_B^{(F)}}{e^{-B}} \quad (2.13)$$

Daraus folgt für $x_A^{(F)}$:

$$x_A^{(F)} = \left[1 - \frac{(1 - x_A^{(F)})}{e^{-B}} \right] e^{-A} \quad (2.14)$$

Gleichung 2.14 nach $x_A^{(F)}$ aufgelöst ergibt:

$$x_A^{(F)} = \frac{e^{-A}(e^{-B} - 1)}{e^{-B} - e^{-A}} \quad (2.15)$$

Für $x_B^{(F)}$ folgt analog:

$$x_B^{(F)} = \frac{e^{-B}(e^{-A} - 1)}{e^{-A} - e^{-B}} \quad (2.16)$$

Für die Molfraktionen der beiden Komponenten in der gelförmigen Phase folgt gleichermassen:

$$x_A^{(G)} = \frac{e^{-B} - 1}{e^{-B} - e^{-A}} \quad (2.17)$$

und

$$x_B^{(G)} = \frac{e^{-A} - 1}{e^{-A} - e^{-B}} \quad (2.18)$$

Die Gleichungen 2.15, 2.16, 2.17 und 2.18 legen das theoretische Phasendiagramm fest. Die Zahlen $x_A^{(F)}$, $x_B^{(F)}$, $x_A^{(G)}$ und $x_B^{(G)}$ sind Funktionen der Temperatur. Diese Gleichungen sind allerdings nur im Koexistenzbereich gültig, da sonst eine der Zahlen $x_A^{(F)}$, $x_B^{(F)}$, $x_A^{(G)}$ oder $x_B^{(G)}$ negativ oder grösser als 1 werden würde.

Ausgehend vom Phasendiagramm einer idealen Mischung von zwei Komponenten (Abb. 2.2) kann man beschreiben, was passiert, wenn man sich bei einer willkürlichen Zusammensetzung x während des Abkühlens durch das Phasendiagramm bewegt. Oberhalb der Temperatur t_1 ist nur die perfekt gemischte fluide Phase vorhanden. Ab der Temperatur t_1 treten nun erstmals Bereiche auf, die gelförmige Phase der Zusammensetzung x_1 enthalten. Die Gelphase enthält also einen grösseren Anteil am höher schmelzenden Lipid als die fluide Phase. Bei weiterem Abkühlen auf die Temperatur t erhält man mehr Anteile der gelförmigen Phase mit der Zusammensetzung x_R und der fluiden Phase mit Komposition x_P . Die Mengenverhältnisse der beiden Phasen im Koexistenzbereich lassen sich mit dem Hebelgesetz ausrechnen:

$$\frac{n_f}{n_f + n_g} = \frac{R - Q}{R - P} \quad (2.19)$$

Hier entspricht n_f der Anzahl der Moleküle im fluiden Zustand und n_g der Anzahl der Moleküle im gelförmigen Zustand und R , Q und P den Punkten im Phasendiagramm (Abb. 2.2). Bei weiterem Abkühlen kommt man zur Temperatur t_2 wo ein letzter Anteil der fluiden Phase mit einer Zusammensetzung von x_2 vorhanden ist. Die Gelphase besitzt nun die ursprüngliche Zusammensetzung x .

Dieses linsenförmige Phasendiagramm hat allerdings nur Gültigkeit, für den Fall einer idealen Mischung der beiden Komponenten in beiden Phasen.

2.2.2 Reale Mischungen

Generell kann man sagen, dass bei Lipidmischungen meistens nicht von einer idealen Mischung auszugehen ist. Daher wird bei realen Mischungen („regular solutions“) eine Wechselwirkung zwischen ungleichen Molekülen in Betracht gezogen. Für das chemische Potential der Komponente A in einer regulären Lösung gilt:

$$\mu_A = \mu_A^0 + RT \ln (x_A \cdot j_A) \quad (2.20)$$

wobei j_A den sog. Aktivitätskoeffizient darstellt, der die Nicht-Idealität beschreibt. Die Nicht-Idealität trägt zum chemischen Potential der Komponente A mit μ_A^R (R für regulär) bei:

$$\mu_A^R = RT \ln j_A \quad (2.21)$$

und dem freien Energiebetrag:

$$G^R = x_A \cdot \mu_A^R + x_B \cdot \mu_B^R \quad (2.22)$$

Näherungsweise sollen sich die Komponenten noch ideal mischen ($\rightarrow \Delta S^R \equiv 0$), dann tragen die Nächst-Nachbar-Wechselwirkungen zur Enthalpie bei:

$$\Delta H^R \equiv \rho_0 \cdot x_A \cdot x_B \quad (2.23)$$

wobei $\rho = Z \cdot (2E_{AB} - E_{AA} - E_{BB})$ die Energie beschreibt, die bei Umwandlung von Z AA - und BB -Paaren in $2Z$ AB -Paare aufgewendet werden muss. Z ist dabei die Koordinationszahl der Lipide. Somit gilt bei dieser vereinfachten Betrachtung:

$$\mu_A^R = \rho_0 \cdot x_B^2 \quad (2.24)$$

$$\mu_B^R = \rho_0 \cdot x_A^2 \quad (2.25)$$

und man erhält:

$$\mu_A^f = \mu_A^{f,0} + RT \ln x_A^f + \rho_0^f \cdot (1 - x_A^f)^2 \quad (2.26)$$

$$\mu_B^f = \mu_B^{f,0} + RT \ln 1 - x_A^f + \rho_0^f \cdot (x_A^f)^2 \quad (2.27)$$

und

$$\mu_A^g = \mu_A^{g,0} + RT \ln x_A^g + \rho_0^g \cdot (1 - x_A^g)^2 \quad (2.28)$$

$$\mu_B^g = \mu_B^{g,0} + RT \ln 1 - x_A^g + \rho_0^g \cdot (x_A^g)^2 \quad (2.29)$$

Weil im thermodynamischen Gleichgewicht $\mu_A^g = \mu_A^f$ und $\mu_B^g = \mu_B^f$ gelten muss, folgt:

$$\ln \left(\frac{x_A^f}{x_A^g} \right) + \frac{\rho_0^f (1 - x_A^f)^2 - \rho_0^g \cdot (1 - x_A^g)^2}{RT} = -\frac{\mu_A^{f,0} - \mu_A^{g,0}}{RT} = -\frac{\Delta H_A^0}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_A} \right) \quad (2.30)$$

und

$$\ln \left(\frac{1 - x_A^f}{1 - x_A^g} \right) + \frac{\rho_0^f (x_A^f)^2 - \rho_0^g \cdot (x_A^g)^2}{RT} = -\frac{\mu_B^{f,0} - \mu_B^{g,0}}{RT} = -\frac{\Delta H_B^0}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_B} \right) \quad (2.31)$$

Wegen ihrer transzendenten Natur können diese Gleichungen nur iterativ mit dem Computer gelöst werden und man erhält Zahlenwerte für x_A^f , x_A^g , x_B^g und x_B^f als Funktionen von x_A und T .

2.3 Monte-Carlo-Simulationen von Lipidsystemen

2.3.1 Simulation von Einkomponentensystemen

Da die in dieser Arbeit erworbenen Ergebnisse mit denen aus den Monte-Carlo-Simulationen verglichen werden sollen, wird das Prinzip der Simulationen hier kurz dargestellt.

Mean-Field Modelle nehmen an, dass die Umgebung jedes Moleküls gleich ist. Dies ist im allgemeinen allerdings nicht richtig. Um ein Problem mit vielen Teilchen, wie einer Membran zu lösen, müsste man sämtliche Konfigurationen des Systems erzeugen, ihre Energie berechnen und die Zustandsfunktion bestimmen. Bei den vielen Konfigurationen, die es gibt (für ein System mit N Lipiden ist die Zahl der möglichen Konfigurationen von der Grössenordnung 2^N , wenn man nur zwei verschiedenen Zustände pro Lipid annimmt), ist dies allerdings nahezu unmöglich. Ausserdem sind die Zustände nicht alle gleich wahrscheinlich, denn diejenigen mit einer hohen potentiellen Energie kommen fast nicht vor. Andere Zustände haben die gleiche Energie und sind somit entartet. Um die Zustandsfunktion näherungsweise zu bestimmen, nutzt man das Metropolis-Verfahren [49]:

Dies ist ein Verfahren, bei dem nur diejenigen Zustände, die ab einer definierten Wahrscheinlichkeit auftreten, gezählt werden.

Bei einer beliebigen Startkonfiguration des Systems werden die Konfigurationen aller Lipide gespeichert. Damit kennt man die innere Energie des Systems E_i . Nun lässt man ein Lipid seinen Zustand ändern (z.B. gel-fluid). Es verändert damit seine Energie und somit die Energie des Systems und geht vom Ausgangszustand A in den Zustand B über. Die Energiedifferenz beträgt $\Delta E = E_B - E_A$. Mit der Wahrscheinlichkeit

$$P_B = \frac{\exp(-\Delta E/RT)}{1 + \exp(-\Delta E/RT)} \equiv \frac{K}{1 + K} \quad (2.32)$$

lässt man die Umwandlung zu und mit der Wahrscheinlichkeit

$$P_A = \frac{1}{1 + \exp(-\Delta E/kT)} = \frac{1}{1 + K} \quad (2.33)$$

lässt man sie nicht zu. So ist das Gleichgewicht der beiden Konfigurationen durch

$$\frac{P_B}{P_A} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{RT}\right) \quad (2.34)$$

bestimmt. Dies erwartet man auch nach der Boltzmann-Verteilung. Jetzt kann man ein weiteres Lipid auswählen und den nächsten Monte-Carlo-Schritt durchführen. So durchläuft man mit der Zeit den kompletten Konfigurationsraum des Systems.

Die Energie des Systems bleibt allerdings während der Dauer der Simulation nicht konstant, sondern sie schwankt um einen Mittelwert. Dieser Mittelwert berechnet sich folgendermassen:

$$\overline{E} = \frac{\sum_i E_i \exp(-F_i/RT)}{\sum_i \exp(-F_i/RT)} = \frac{1}{Q} \sum_i E_i \exp(-F_i/RT) \quad (2.35)$$

wobei $F_i = E_i - TS_i$.

Die Enthalpie des Systems berechnet sich analog:

$$\overline{H} = \frac{\sum_i H_i \exp(-G_i/RT)}{\sum_i \exp(-G_i/RT)} = \frac{1}{Q} \sum_i H_i \exp(-G_i/RT) \quad (2.36)$$

hier ist $G_i = E_i + pV_i + \Pi a_i - TS_i$. Hier ist V_i das Volumen mit dem Druck p , a_i die Fläche mit dem lateralen Druck Π und S_i die Entropie des Zustandes mit der Temperatur T . Q ist jeweils die Zustandsfunktion des Systems:

$$Q = \sum_i \Omega_i \exp\left(\frac{-H_i}{RT}\right) \quad (2.37)$$

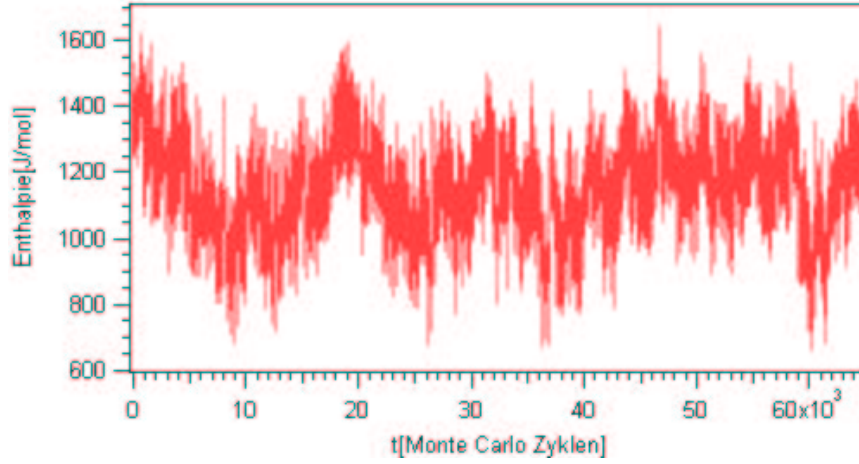


Abbildung 2.3: *Fluktuationen der Enthalpie einer äquimolaren Mischung von DMPC und DSPC bei einer Temperatur von 304 K im Gleichgewicht. Deutlich zu sehen, die Enthalpie ist nicht konstant, sondern sie schwankt um einen Mittelwert.*

wobei Ω_i die Entartung des Systems darstellt.

Da $c_p = \left(\frac{d\bar{H}}{dT} \right)_p$, kann man durch Ableitung der Gleichung 2.36 die Wärmekapazität bestimmen:

$$c_p = \left(\frac{d\bar{H}}{dT} \right)_p = \frac{\overline{H^2} - \bar{H}^2}{RT^2} \quad (2.38)$$

Dies ist in der statistischen Physik auch als Fluktuations-Dissipations-Theorem bekannt [21]. Somit lassen sich allein aus den Abweichungen des Systems vom Mittelwert spezifische Parameter des Systems wie die Wärmekapazität bei konstantem Druck bestimmen. Ähnliches gilt für die Wärmekapazität bei konstantem Volumen oder elastische Konstanten wie die Volumen- oder Flächenkompressibilität.

Bei den Monte-Carlo-Simulationen wurde ein sog. „Ising-Modell“ angewandt[32]. Hierbei geht man davon aus, dass jedes Lipid nur in zwei Zuständen existieren kann:

- ein gelförmiger Zustand mit der Enthalpie H_g und der Entropie S_g
- ein fluider Zustand mit Enthalpie H_f und Entropie S_f

Darüberhinaus werden nun Wechselwirkungsparameter der Lipide untereinander berücksichtigt, was bisher noch nicht geschah. Es werden jedoch nur

Wechselwirkungen mit den allernächsten Nachbarn in Betracht gezogen. Die Matrix hat hexagonale Struktur und die Koordinationszahl 6. Jedes Lipid hat also 6 nächste Nachbarn.

Somit gibt es drei unterschiedliche Wechselwirkungsparameter zwischen benachbarten Lipiden:

- gel-gel-WW $\longrightarrow \epsilon_{gg}$
- gel-fluid-WW $\longrightarrow \epsilon_{gf}$
- fluid-fluid-WW $\longrightarrow \epsilon_{ff}$

Hieraus ergeben sich die Gibbs'schen freien Enthalpien in der Gelphase:

$$G_g = N \cdot (H_g - T \cdot S_g) + Z/2 \cdot \epsilon_{gg} \quad (2.39)$$

und in der fluiden Phase:

$$G_f = N \cdot (H_f - T \cdot S_f) + Z/2 \cdot \epsilon_{ff} \quad (2.40)$$

Bei einer allgemeinen Verteilung mit N_f fluiden und N_g gelförmigen Lipiden gibt es:

- N_{gg} Kontakte zwischen zwei gelförmigen Lipiden
- N_{ff} Kontakte zwischen zwei fluiden Lipiden
- N_{gf} Kontakte zwischen gelförmigen und fluiden Lipiden.

Die gesamte Gibbs'sche freie Energie G kann man nun durch Kombination von 2.39 und 2.40 erhalten:

$$G = N_g \cdot (H_g - T \cdot S_g) + N_f \cdot (H_f - T \cdot S_f) + N_{gg} \cdot \epsilon_{gg} + N_{ff} \cdot \epsilon_{ff} + N_{gf} \cdot \epsilon_{gf} \quad (2.41)$$

Durch umsordieren von 2.41 erhält man:

$$G = G_g + N_f \cdot (\Delta H - T \Delta S) + N_{gf} \cdot \left(\epsilon_{gf} - \frac{\epsilon_{gg} + \epsilon_{ff}}{2} \right) \quad (2.42)$$

$$\equiv G_g + N_f \cdot (\Delta H - T \Delta S) + N_{gf} \cdot \omega_{gf} \quad (2.43)$$

wobei ω_{gf} ein Kooperativitätsparameter ist. Er bestimmt die Energie, welche das System durch ungleiche Nächstnachbarkontakte gewinnt.

Für die Simulationen wurde ein Glauber-Algorithmus [23] angewandt:

- man wählt eine beliebige Startkonfiguration des Systems
- man nimmt ein willkürliches Lipid im System

- man ändert dessen Zustand
- man berechnet die Gibbs'sche Energie-Differenz zwischen der alten und der neuen Konfiguration

$$\delta G = \pm(\Delta H - T \cdot \Delta S) + \Delta n_{gf} \cdot \omega_{gf} \quad (2.44)$$

wobei +/- für den Übergang gelförmig-fluid/fluid-gelförmig und Δn_{gf} für die Veränderung an ungleichen Nächstnachbarkontakten steht.

- man berechnet die Wahrscheinlichkeit der Änderung
 $P = \frac{K(T)}{1+K(T)}$ mit der Gewichtung $K(T) = \exp\left(-\frac{\delta G}{RT}\right)$
- man generiert eine Zufallszahl RAN und vergleicht sie mit der berechneten Wahrscheinlichkeit.
- man entscheidet, ob der Zustand geändert wird:

$$RAN \leq P \longrightarrow Ja$$

$$RAN > P \longrightarrow Nein$$

- man nimmt das nächste Lipid und wiederholt beschriebenen Ablauf. Wurden alle Lipide in der Matrix einmal „besucht“, so ist ein Zyklus abgeschlossen.

2.3.2 Simulation von Mehrkomponentensystemen

Die Vorgehensweise bei zweikomponentigen Systemen bleibt im wesentlichen gleich, aber es gibt noch zusätzliche Beiträge in den Gleichungen. Man hat insgesamt 10 Wechselwirkungsparameter bei den Komponenten A und B:

- A-A gel-gel-WW $\longrightarrow \epsilon_{gg}^{AA}$
- A-A gel-fluid-WW $\longrightarrow \epsilon_{gf}^{AA}$
- A-A fluid-fluid-WW $\longrightarrow \epsilon_{ff}^{AA}$
- B-B gel-gel-WW $\longrightarrow \epsilon_{gg}^{BB}$
- B-B gel-fluid-WW $\longrightarrow \epsilon_{gf}^{BB}$
- B-B fluid-fluid-WW $\longrightarrow \epsilon_{ff}^{BB}$

- A-B gel-gel-WW $\longrightarrow \epsilon_{gg}^{AB}$
- A-B gel-fluid-WW $\longrightarrow \epsilon_{gf}^{AB}$
- A-B fluid-gel-WW $\longrightarrow \epsilon_{fg}^{AB}$
- A-B fluid-fluid-WW $\longrightarrow \epsilon_{ff}^{AB}$

und den Zahlen der jeweiligen Kontakte N_{ij} . Dies führt zur gesamten Gibbs'schen freien Energie:

$$\begin{aligned}
G_{ges} = & N_g^A(H_g^A - TS_g^A) + N_g^B(H_g^B - TS_g^B) + N_f^A(H_f^A - TS_f^A) + N_f^B(H_f^B - TS_f^B) \\
& + N_{gg}^{AA} \cdot \epsilon_{gg}^{AA} + N_{ff}^{AA} \cdot \epsilon_{ff}^{AA} + N_{fg}^{AA} \cdot \epsilon_{fg}^{AA} \\
& + N_{gg}^{BB} \cdot \epsilon_{gg}^{BB} + N_{ff}^{BB} \cdot \epsilon_{ff}^{BB} + N_{fg}^{BB} \cdot \epsilon_{fg}^{BB} \\
& + N_{gg}^{AB} \cdot \epsilon_{gg}^{AB} + N_{gf}^{AB} \cdot \epsilon_{gf}^{AB} + N_{fg}^{AB} \cdot \epsilon_{fg}^{AB} + N_{ff}^{AB} \cdot \epsilon_{ff}^{AB}
\end{aligned} \tag{2.45}$$

Durch Umsortieren wie beim Einkomponentensystem und der Einführung der Wechselwirkungsparameter ω_{ij}^{mn} reduziert sich Gleichung 2.45 zu:

$$\begin{aligned}
\Delta G = & N_f^A(\Delta E_A - T \cdot \Delta S_A) + N_f^B(\Delta E_B - T \cdot \Delta S_B) \\
& + \omega_{gf}^{AA} \cdot N_{gf}^{AA} + \omega_{gf}^{BB} \cdot N_{gf}^{BB} + \omega_{gg}^{AB} \cdot N_{gg}^{AB} \\
& + \omega_{ff}^{AB} \cdot N_{ff}^{AB} + \omega_{gf}^{AB} \cdot N_{gf}^{AB} + \omega_{fg}^{AB} \cdot N_{fg}^{AB}
\end{aligned} \tag{2.46}$$

Nun wird wieder der schon oben beschriebene Glauber-Algorithmus angewandt.

Die Parameter aus Gleichung 2.46 werden aus den kalorimetrischen Experimenten näherungsweise bestimmt.

ΔE_A und ΔE_B entsprechen den Umwandlungsenthalpien der reinen Komponenten A und B . ΔS_A und ΔS_B bestimmt man durch

$$\Delta S_A \approx \Delta E_A / T_m(A) \tag{2.47}$$

und

$$\Delta S_B \approx \Delta E_B / T_m(B) \tag{2.48}$$

Die Werte der ω_{ij}^{mn} werden ebenfalls aus den Kurven der einkomponentigen Systeme abgeschätzt und nach Testläufen den experimentellen Kurven angenähert.

Eine ausführliche Beschreibung der Monte-Carlo-Simulation des Mischsystems DMPC-DSPC findet man in der Diplomarbeit von Heiko Seeger [59] oder bei Sugar et. al. [63].

2.3.3 Fremdmoleküle in Einkomponentensystemen

Bei der Betrachtung von Lipidsystemen mit Zugabe von kleinen Mengen an Proteinen oder Fluoreszenzfarbstoffen vereinfacht sich die Gleichung 2.46 weiter, da man folgende Annahmen macht [33]:

- Das Protein oder Label existiert nur in einem Zustand (es besitzt keine Schmelzumwandlung)
- Es wird nur in sehr geringen Mengen zugegeben, so dass es keine Label-Label-Wechselwirkungen gibt

Dies führt dann zu einer Gleichung:

$$\Delta G = N(\Delta E - T \cdot \Delta S) + N_{gf} \cdot \omega_{gf} + N_{gl} \cdot \omega_{gl} + N_{fl} \cdot \omega_{fl} \quad (2.49)$$

wobei die ω_{gl} bzw. ω_{fl} für die Wechselwirkungen der gelförmigen bzw. fluiden Lipide mit den Labeln stehen. Auch hier kann man aus dem Vergleich von Simulationen mit den Experimenten die Zahlenwerte der ω_{ij} näherungsweise bestimmen.

2.4 Zusammensetzung der Domänen

Aus den konfokalen Bildern, welche im Laufe dieser Arbeit angefertigt werden (siehe Kap. 5.4), kann man nicht sofort auf die Zusammensetzung der einzelnen Phasen schliessen. Allerdings ist es mit einem kleinen Umweg möglich, näherungsweise auch eine quantitative Aussage darüber zu treffen.

Man nimmt die Molfraktion des einen Lipids (z.B. DLPC, welches bei Raumtemperatur in der fluiden Phase angereichert sein sollte) als x und die Molfraktion des anderen Lipids (z.B. DPPC) als y . Dann gilt:

$$x_f + y_f = 1 \quad (2.50)$$

und

$$x_g + y_g = 1 \quad (2.51)$$

wobei x_f und y_f die Anteile von x und y in der fluiden Phase und x_g , y_g die der Gelphase darstellen. Abb. 2.4 zeigt das Phasendiagramm des Mischsys-

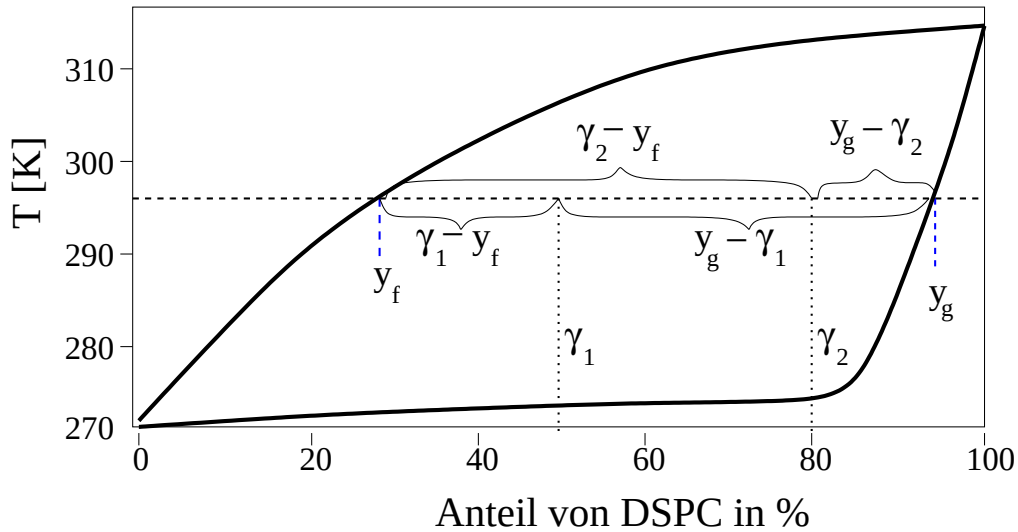


Abbildung 2.4: Phasendiagramm des Mischsystems DLPC und DPPC. Eingezeichnet sind auch die Fraktionen und Konzentrationen, die verwendet wurden um die Zusammensetzung der Phasen des Systems aus den konfokal hergestellten Bildern zu bestimmen.

stems DLPC und DPPC und die dort verwendeten Konzentrationen, die zur Bestimmung der Phasenzusammensetzung herangezogen wurden. Wenn nun

f den Anteil der fluiden Phase und $1 - f$ den der Gelphase und γ den Anteil von DPPC beziehungsweise $1 - \gamma$ den Anteil von DLPC darstellt, so führt dies zu den Gleichungen:

$$f \cdot x_f + (1 - f) \cdot x_g = 1 - \gamma \quad (2.52)$$

und

$$f \cdot y_f + (1 - f) \cdot y_g = \gamma \quad (2.53)$$

Die Unbekannten sind hier nur x_f und x_g .

Aus Gl. 2.52 ergibt sich:

$$y_g = \frac{\gamma - f \cdot y_f}{1 - f} \quad (2.54)$$

Dies ist erst einmal unbestimmt. Wenn man allerdings f für zwei verschiedene Zusammensetzungen γ kennt, kann man deren Anteile bestimmen.

Bei Zusammensetzung γ_1 gilt:

$$y_g = \frac{\gamma_1 - f_1 y_f}{1 - f_1} \quad (2.55)$$

Für γ_2 gilt analog:

$$y_g = \frac{\gamma_2 - f_2 y_f}{1 - f_2} \quad (2.56)$$

Gleichsetzen der beiden Gleichungen ergibt:

$$y_f = \frac{\frac{\gamma_1}{1-f_1} - \frac{\gamma_2}{1-f_2}}{\frac{f_1}{1-f_1} - \frac{f_2}{1-f_2}} \quad (2.57)$$

Die Anteile f der fluiden Phase kann man näherungsweise aus den Projektionen der konfokalen Bilder bestimmen.

Abb. 2.5 zeigt ein mit diesem Verfahren hergestelltes Bild. Nacheinander werden Schichtbilder aufgenommen, die anschliessend mit der Computersoftware zu einer Projektionsdarstellung (quasi-3D-Bild) zusammengefügt werden. Man nimmt an, dass man es bei dieser Darstellung mit einer tatsächlichen makroskopischen Phasentrennung zu tun hat. Macht man nun diese Projektion wieder rückgängig, kann man auf die reale Grösse der einzelnen Domänen zurückschliessen und somit auch deren Zusammensetzung näherungsweise bestimmen.

Abb. 2.6 zeigt einen Schnitt durch ein Vesikel mit Radius R . Die tatsächliche Oberfläche $A_{real}(r)$ wird auf $A_{proj}(r)$ abgebildet. Als r wird der mittlere

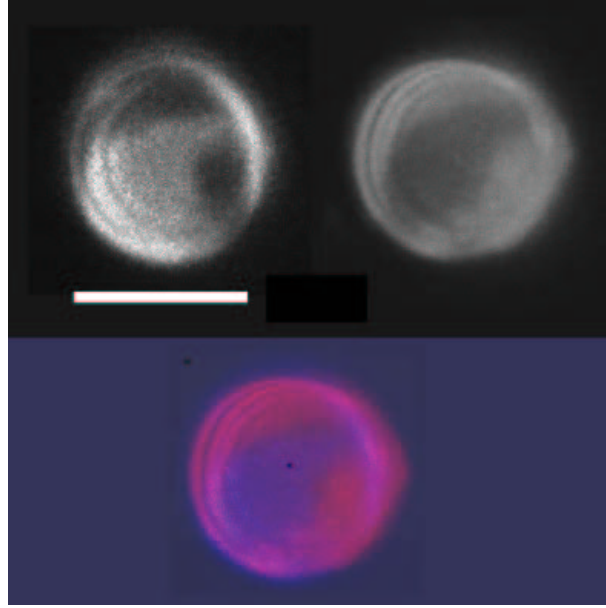


Abbildung 2.5: Konfokales Bild eines Vesikels mit dem Durchmesser $11\ \mu\text{m}$ einer Mischung von 20% DLPC und 80% DPPC. Die Intensitäten der beiden Kanäle werden farblich übereinandergelegt. Der blaue Kanal entspricht dem Farbstoff D-3803 und der rote dem Farbstoff D-307. Die makroskopische Phasentrennung ist gut zu erkennen. Der Balken entspricht einer Länge von $10\ \mu\text{m}$

Radius eines Kreisringes angenommen. Im rechtwinkligen Dreieck gilt die Beziehung:

$$\cos \beta = \sin \alpha = \sqrt{1 - \cos^2 \alpha} = \sqrt{1 - \left(\frac{r}{R}\right)^2} \quad (2.58)$$

Deswegen ergibt sich für die reale Oberfläche $A_{real}(r)$:

$$A_{real}(r) = A_{proj}(r) \frac{1}{\sqrt{1 - \left(\frac{r}{R}\right)^2}} \quad (2.59)$$

So ist es möglich, wenn man für zwei verschiedene Mischungsverhältnisse des Lipidsystems die relative Zusammensetzung (fluid-gelförmig) der Kreisringe in der Projektionsdarstellung kennt, die Anteile der Lipide in den fluiden oder gelförmigen Phasen zu bestimmen.

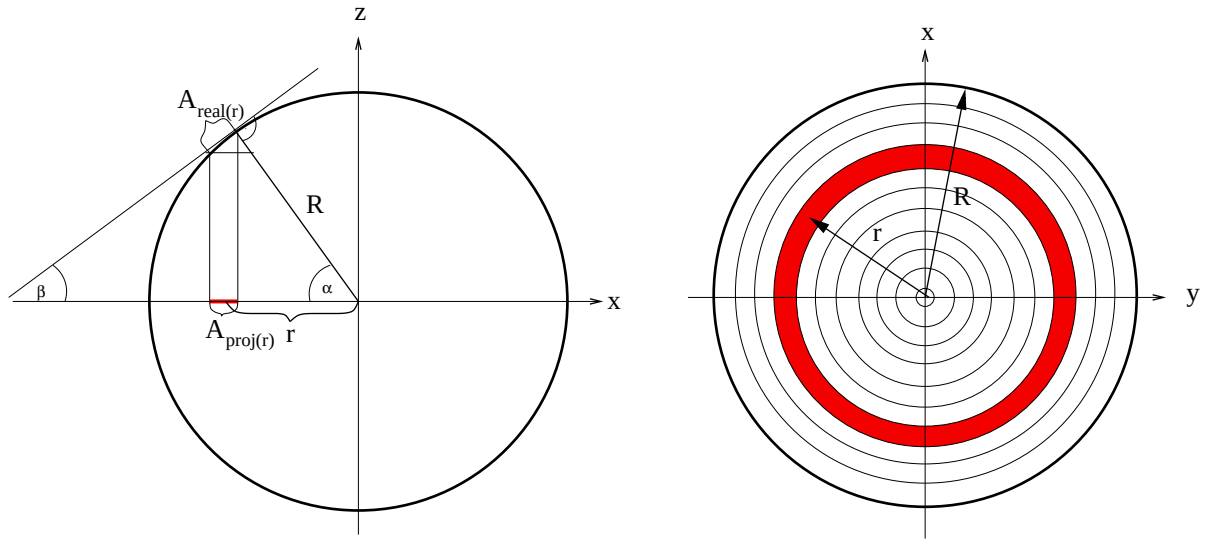


Abbildung 2.6: *Schnittbild (links) und Draufsicht einer schematischen Darstellung eines abgebildeten Vesikels. Die reale Oberfläche $A_{\text{real}}(r)$ des Vesikels wird auf $A_{\text{proj}}(r)$ abgebildet.*

Kapitel 3

Materialien und Methoden

3.1 Kalorimetrie

Kalorimetrie spielt eine wichtige Rolle bei der Untersuchung von Umwandlungen in biologischen oder Modellsystemen. In dem erhaltenen Wärmekapazitätsprofil sind sämtliche thermodynamischen Informationen der Umwandlung enthalten. Die Zustandsfunktionen des Systems und Grössen wie die Umwandlungsenthalpie und die Entropie des Systems können bestimmt werden.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde ein Differentialkalorimeter VP-DSC (DSC: **D**ifferential **S**canning **C**alorimeter) der Firma MicroCal, Inc. (Northhampton/MA, USA) verwendet (Abb. 3.1).

Seine wesentlichen Elemente sind die münzenförmigen Proben- und Referenzzellen aus Tantal, die vom sogenannten „adiabatischen Schild“ umgeben sind. Diese beiden Zellen werden simultan mit konstanter Rate erwärmt oder abgekühlt. Dabei wird über einen Kristallsensor die Temperaturdifferenz ΔT zwischen den beiden Zellen bestimmt. Über einen elektronischen Regelkreis werden nun die Heizspulen so angesteuert, dass diese Temperaturdifferenz ausgeglichen wird. Die dazu benötigte Leistungsdifferenz ΔP wird aufgezeichnet. Da die Heizrate $\frac{\Delta T}{\Delta t}$ bekannt ist, kann man nun verhältnismässig einfach den Unterschied in der Wärmekapazität Δc_p bestimmen.

Es gilt :

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

Für die Wärmekapazität gilt:

$$\Delta c_p := \left(\frac{\partial Q}{\partial T} \right)_p \simeq \frac{\Delta Q}{\Delta T} \simeq \frac{\Delta P}{\frac{\Delta T}{\Delta t}} \quad (3.2)$$

Die Steuerung des Geräts und das Auslesen der Messwerte erfolgt mittels eines Personal Computers mit der von MicroCal speziell entwickelten Software VP-Viewer. Damit kann man unter anderem einstellen, über wie viele Messwerte gemittelt werden soll („Filter“) und wie schnell das Gerät durch Wärmeausgleich auf irgendwelche Veränderungen in der Probe reagiert („Feedback“). Die Filterfunktion führt zu einer Glättung der Meßkurve, welches bei sehr schmalen Umwandlungen zu deutlichen Rundungsfehlern und somit zu Informationsverlusten führen kann. Das Feedback (none, low, mid, high) bestimmt, wie schnell das Gerät auf Veränderungen reagieren soll.

Die Messungen, welche in dieser Arbeit gezeigt werden, wurden alle mit „High-Feedback“ durchgeführt. Zusätzlich wurden die Proben unter einen definierten Druck von ca. 50 psi (pounds per square inch) gebracht, was etwa 3,5 bar entspricht.

Das verwendete Kalorimeter gilt derzeit als eines der sensitivsten auf dem Markt. Darüberhinaus verfügt es über ein ausgezeichnetes Signal-Rausch-Verhältnis und eine hohe Stabilität der Baseline. Man benötigt wegen des geringen Meßvolumens von 0,5152 ml nur sehr geringe Probenmengen.

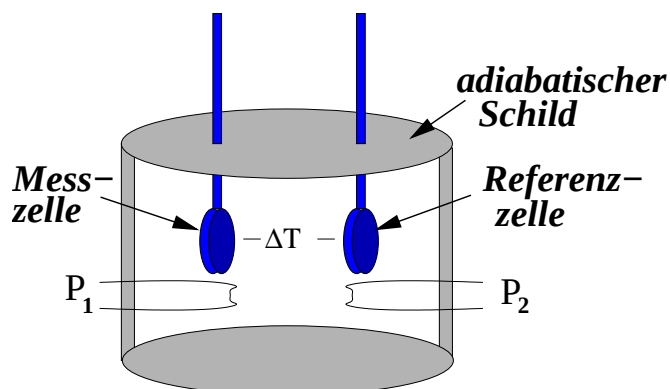


Abbildung 3.1: Aufbau des DSC (*Differential Scanning Calorimeter*). Die Zellen werden von oben mit einer Mess- bzw. einer Referenzsubstanz befüllt. Die Temperatur wird während der Messung mit einer eingestellten Rate verändert. Die Temperatur zwischen den beiden Zellen wird laufend ausgeglichen. Aus der Differenz der den Zellen zugeführten Leistung ergibt sich die Wärmekapazität.

3.2 Fluoreszenz

Mikroskopie mittels Fluoreszenz hat vor allem bei Untersuchungen biologischer Substanzen oder Strukturen einen sehr grossen Einsatzbereich. Bei biologischen Materialien können ganze Zellen oder Organellen „angefärbt“ (mit Fluoreszenzfarbstoffen versehen) werden. Hierbei werden fluoreszierende Moleküle in die Struktur eingebracht oder Molekülgruppen an das zu untersuchende Molekül (z.B. DNA-Strang) angehängt.

Das Prinzip der Fluoreszenz ist schnell erklärt:

Ein Elektron befindet sich in einem Molekül im Grundzustand E_0 . Durch die Absorption eines Lichtquants mit der Energie $h \cdot \nu_1$ wird es in einen angeregten Zustand E_1 überführt. Durch Energieverluste, z.B. Anregung von Vibrationsschwingungen (Stokes-Verschiebung) erreicht es dann den Zustand E_2 von dem es durch die Emission eines Photons mit der Energie $h \cdot \nu_2$ wieder in den Grundzustand zurückfällt. Wenn der angeregte Zustand ein sogenannter Singulettzustand ist, der eine Lebensdauer von $\tau \approx 10^{-9} - 10^{-7}$ Sekunden besitzt, dann bezeichnet man den Vorgang als Fluoreszenz. Wird allerdings ein sogenannter Triplettzustand angeregt, der eine wesentlich verlängerte Lebensdauer besitzt (Sekunden oder Minuten, manchmal sogar Tage), so spricht man von Phosphoreszenz.

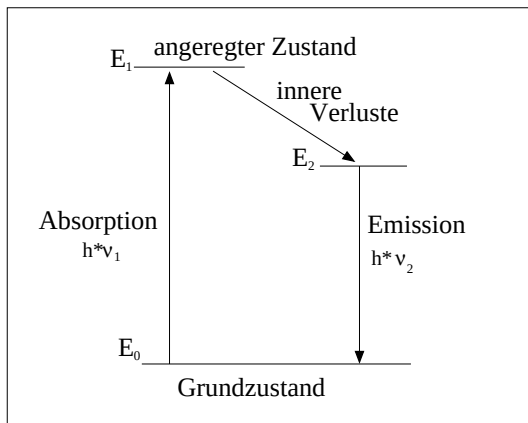


Abbildung 3.2: *Prinzip der Fluoreszenz: Aus dem Grundzustand E_0 wird durch Absorption eines Photons der Energie $h \cdot \nu_1$ ein angeregter Zustand E_1 im Molekül erreicht. Energieverluste führen zum Zwischenzustand E_2 , von dem aus durch die Aussendung eines Photons der Energie $h \cdot \nu_2$ der Grundzustand wieder eingenommen wird.*

Die für diese Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe haben als Grundstruktur ein Phospholipid, das den in dieser Arbeit untersuchten Phospholi-

piden sehr ähnelt. Daran wird dann eine fluoreszierende Moleküleinheit angehängt. Die beiden Farbstoffe die bei der Fluoreszenzmikroskopie zum Einsatz kamen wurden dem Lipidsystem im Verhältnis 1/1000 zugesetzt. Verwendet wurde ein Farbstoff aus der BODIPY-Serie mit der Bezeichnung D-3803 (Abb.3.3). Bei diesem Molekül wurde die fluoreszierende Einheit an das Ende einer verkürzten Fettsäurekette eines normalen Phosphatidylcholines angehängt. Der Farbstoff besitzt sein Anregungsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda_{abs} = 503 \text{ nm}$ und das Emissionsmaximum liegt bei $\lambda_{em} = 512 \text{ nm}$.

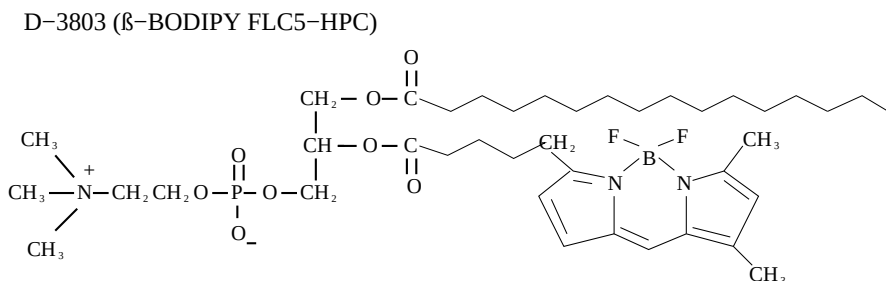


Abbildung 3.3: *Struktur des Fluoreszenzlabels BODIPY*

Der zweite verwendete Farbstoff ist ein sogenanntes DiI-Label D-307 (Abb.3.4). Hierbei wurde kein komplettes Phospholipid verwendet, sondern nur zwei Fettsäureketten mit 18 C-Atomen Kettenlänge an eine fluoreszierende Molekülgruppe angehängt. Bei diesem Farbstoff liegt das Anregungsmaximum bei der Wellenlänge von $\lambda_{abs} = 644 \text{ nm}$ und das Emissionsmaximum liegt bei $\lambda_{em} = 665 \text{ nm}$.

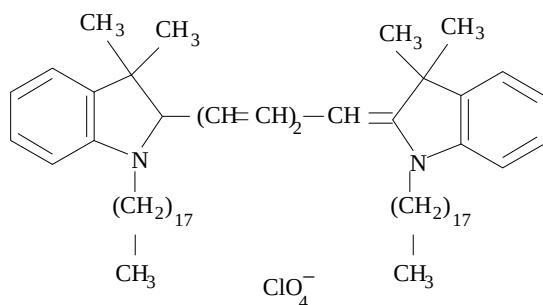


Abbildung 3.4: *Struktur des DiI Fluoreszenzlabels*

3.3 Mikroskopie

3.3.1 Konventionelle Mikroskopie

Die Mikroskopie wird in der Wissenschaft seit rund einem Jahrhundert verwendet um kleine Strukturen mit optischen Mitteln zu untersuchen, ohne die Probe dabei zerstören zu müssen. Der Hauptnachteil der konventionellen Mikroskopie ist die wegen der Beugung des Lichtes begrenzte Auflösung. Diese liegt in etwa im Bereich der Wellenlänge des Lichtes, mit dem man die Probe beleuchtet. Für die maximale Auflösung x_{min} zweier getrennter Punkte gilt [14]:

$$\Delta x_{min} = 1.22 \cdot \frac{\lambda}{NA} \quad (3.3)$$

wobei λ die Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes und NA die numerische Apertur sind. Diese ist ein Maß für die Abmessungen des Mikroskopobjektivs. Der maximale Öffnungswinkel α des Objektivs ist durch

$$2 \sin \frac{\alpha}{2} = \frac{D}{f} = NA \quad (3.4)$$

bestimmt (D = Linsendurchmesser, f = Brennweite des Objektivs).

Durch die Verwendung von Immersionsobjektiven (Wasser oder Öl) lässt sich ein Faktor in der Auflösung gewinnen der dem Brechungsindex n der Immersionsflüssigkeit entspricht. Dieser ist für Öl etwa 1.50 und für Wasser etwa 1.33.

Somit gilt:

$$\Delta x_{min} = 1.22 \cdot \frac{\lambda}{n \cdot NA} \quad (3.5)$$

Da die numerische Apertur je nach Objektiv bis zu 1.4 beträgt, können Strukturen, die kleiner als die halbe Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes sind, deswegen nicht aufgelöst werden.

Ein weiterer Nachteil ist der in der Tiefe begrenzte Focus, welcher es schwierig gestaltet, ein Bild von einem, in Richtung der optischen Achse ausgedehnten Objektes, zu erlangen.

3.3.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie verbindet die Auflösung eines konventionellen Lichtmikroskops senkrecht zur optischen Achse (d.h. in der x-y-Ebene) mit einer vergleichbar hohen Auflösung in der z-Richtung (d.h. in

Richtung der optischen Achse). Es ist ein Instrument mit einer extrem kleinen Schärfentiefe, das das Streulicht aus den nicht-Fokus-Ebenen sehr gut unterdrückt.

Abb. 3.5 stellt die Funktionsweise des konfokalen Mikroskops schematisch dar. Als Lichtquelle fungiert wegen der notwendigen höheren Feldstärkeintensitäten ein Laser. Der Laserstrahl wird über eine Lochblende 1 (Pinhole) und einen dichroitischen¹ Spiegel durch die Objektivlinse auf die Probe fokussiert und ein Teil der Photonen von dem Fluoreszenzfarbstoff absorbiert. Das emittierte Fluoreszenzlicht, welches eine längere Wellenlänge besitzt, wird durch den Spiegel transmittiert und durch die Lochblende 2 in den Detektor geleitet. Dieses zweite, variable Pinhole wirkt als „Raumfilter“ und lässt nur Licht aus der fokalen Ebene in den Detektor. Licht aus den Ebenen über oder unter der fokalen Ebene wird fast vollständig ausgeblendet und gibt somit keinen Beitrag zu der von dem Photomultiplier aufgezeichneten Intensität.

In einem Computer werden die ortsabhängig gemessenen Intensitäten zu einem Bild zusammengefügt. Die Auflösung in z-Richtung, die hierbei möglich wird, beträgt 600 nm und ist abhängig vom eingestellten Pinholedurchmesser. Je kleiner der Durchmesser desto höher die Auflösung. Jedoch wird die Lichtintensität bei zu klein gewähltem Durchmesser sehr gering. Die Pinholeeinstellung muss ein Kompromiss zwischen Auflösung und Lichtstärke sein, da die Kontraste auch durch die Software nicht uneingeschränkt nachgebessert werden können. Die konfokalen Aufnahmen dieser Arbeit wurden meist mit einem Blendendurchmesser von 20 µm durchgeführt.

3.3.3 Laserscanningmikroskopie und Schichtbilder

Die gute Auflösung der konfokalen Mikroskopie wird allerdings durch den Nachteil des extrem eingeschränkten Gesichtsfeldes erkaufte. Dieser Nachteil muss um ausgedehnte Objekte zu beobachten durch eine Abtastvorrichtung kompensiert werden. Hierbei wird der zur Beleuchtung eingesetzte Laser durch einen Mechanismus Punkt für Punkt über die Probe gerastert.

Das hier verwendete konfokale Mikroskop ist ein **Laser-Scan-Mikroskop LSM 410 invert** der Firma Carl Zeiss GmbH (Jena, Deutschland) basierend auf der Mikroskopfamilie Axiovert 135 TV. Die Fluoreszenzen in den Proben werden durch eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 50 angeregt. Für die konfokale Mikroskopie wurden die Proben entweder durch einen Argon-Laser der Wellenlänge 488 nm (blau) oder durch einen Helium-Neon-Laser mit der Wellenlänge 633 nm (rot) angeregt. Das emittierte Licht wird im

¹dichroitischer Kristall: Licht mit Wellenlängen bis zu λ_{Grenz} wird reflektiert. Wellenlängen $\lambda > \lambda_{Grenz}$ werden transmittiert.

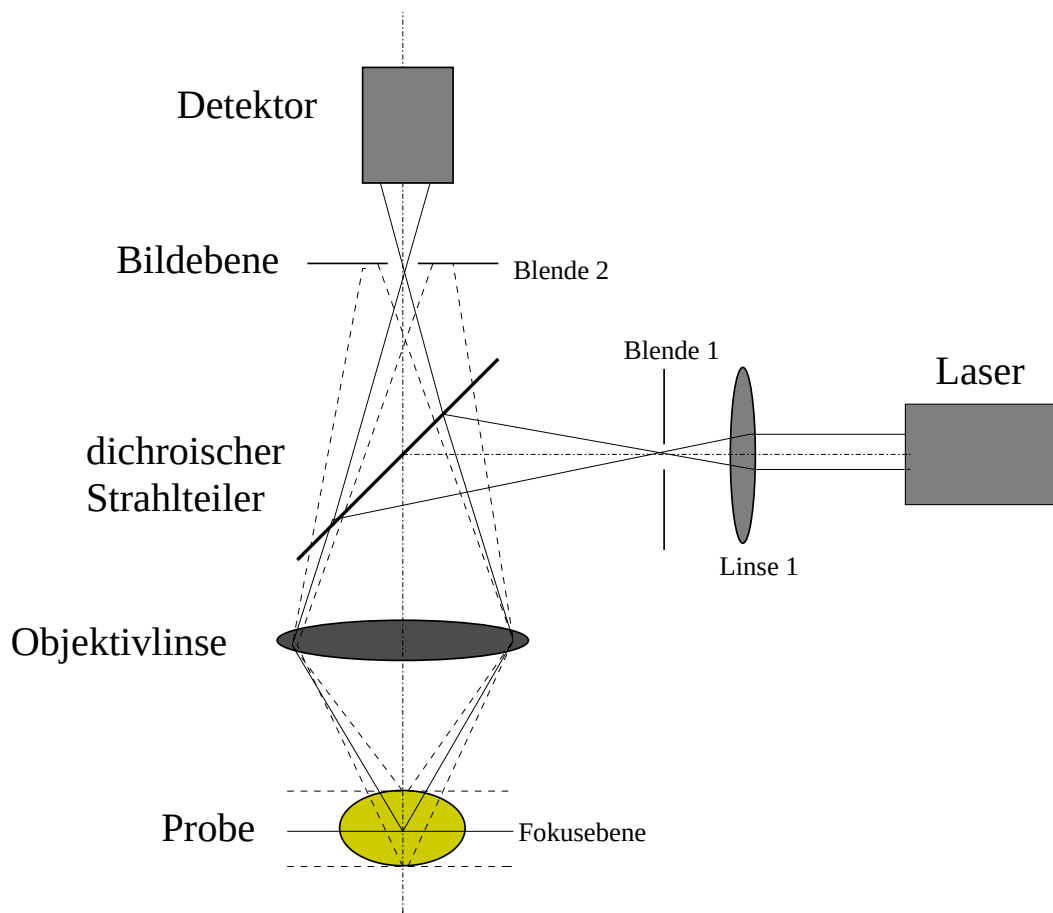


Abbildung 3.5: *Konfokales Prinzip: der Laser wird durch eine Blende über einen Strahlteiler auf die Probe focussiert. Nur das Fluoreszenzlicht aus der Fokusebene wird nun durch eine zweite Blende in den Detektor gelangen. Licht aus Ebenen über oder unter der Fokusebene werden ausgeblendet. So erreicht das konfokale Mikroskop eine definierte Auflösung in z-Richtung von ca. 600 nm.*

ersten Fall durch einen Bandpass-Filter 510 - 525 nm und im zweiten Fall durch einen Langpass-Filter RG 665 nm in die Detektoren geleitet. So wird sichergestellt, dass kein gestreutes Anregungslicht zum aufgezeichneten Bild beiträgt.

Die Auflösung bei den Aufnahmen beträgt, falls nicht anders erwähnt 1024 · 1024 Pixel. Um quasi-drei-dimensionale Bilder der Riesenvesikel zu erlangen, wurden der sogenannte Sectioning-Mode benutzt. Hierbei werden nacheinander konfokale Bilder mit einem Abstand in z-Richtung von jeweils 1 μm gemacht. Damit wird das ganze Vesikel in z-Richtung gescannt. Im Anschluss

daran werden durch ein weiteres Anwenderprogramm (3-D-Projektion) die Bilder der unteren oder oberen Halbschale (je nachdem, wo die Bildqualität besser ist), überlagert. Diese überlagerten Bilder der einzelnen Kanäle werden nun in einer Farbdarstellung zu einem einzigen „Quasi-3-D-Bild“ zusammengefügt.

3.4 Materialien und Probenpräparation

Sämtliche Lipide (DLPC, DMPC, DPPC und DSPC) welche für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen verwendet wurden, stammen von der Firma Avanti Polar Lipids (Alabaster/AL, USA). Die beiden Ketten jedes Lipids sind gleich lang und vollständig gesättigt. Die Lipide besitzen alle die gleiche Kopfgruppe und unterscheiden sich nur in der Länge der Kohlenwasserstoffketten. DLPC besitzt je Kette 12 C-Atome, welche nach obiger Reihenfolge bis DSPC jeweils um 2 pro Kette zunehmen.

Alle Lipide wurden tiefgekühlt als Pulver geliefert. Die Fluoreszenzfarbstoffe D-307, D-3803, TRITC und die anderen getesteten stammen von der Firma Molecular Probes Europe BV (Leiden, Niederlande). Diese lagen ebenfalls in getrockneter, tiefgekühlter Form vor.

Für die kalorimetrischen Messungen wurden die Lipide jeweils in einer Mischung aus Dichlormethan und Methanol (beides von der Firma Baker, Deventer, Niederlande) im Verhältnis 2:1 gelöst und dann im gewünschten Massenverhältnis zusammentitriert. Diese Lösungen wurden dann unter einer Stickstoffatmosphäre getrocknet und einige Stunden (meist über Nacht) im Exikator unter Vakuum ($p < 0,1$ mbar) gehalten, um auch die letzten Reste des organischen Lösungsmittels zu entfernen. Sogar kleinste Reste des Lösungsmittels würden Messungen völlig unbrauchbar machen.

Die getrockneten Proben wurden dann in einem pH-Puffer aus 5mM HEPES der Firma Sigma Aldrich (St. Louis/MO, USA) und 1mM des Kalzium-Puffers EDTA der Firma Fluka (Buchs, Schweiz) gelöst. HEPES wurde aufgrund seiner guten Puffereigenschaften über einen weiten Temperaturbereich ausgewählt. Da er einen pK_S -Wert von 7,5 besitzt, puffert er besonders gut im physiologischen Bereich (pH-Wert des Blutes beträgt 7,35 bis 7,45). EDTA ist ein Chelatkomplex für zweiwertige Ionen und bindet somit sehr gut an Kalzium wodurch Verunreinigungen mit Kalzium verhindert werden. Darüberhinaus werden diese Proben weniger leicht von Mikroorganismen befallen.

Die zur Pufferherstellung verwendeten Chemikalien hatten Analysereinheitsgrad. Verwendet wurde weiterhin hochreines Wasser, welches durch ein mehrstufiges chemisch aktives Filtersystem Milli-Q UF Plus der Firma Millipo-

re (Eschborn, Deutschland) gelaufen war und einen Widerstand von ca. 18 M Ω /cm besitzt.

Der pH-Wert wurde, soweit nicht anders angegeben durch Zugabe von 1-molarer HCl (Baker, Deventer, Niederlande) oder NaOH (Merck, Deutschland) auf den Wert von 7,4 eingestellt. Dies geschah mit Hilfe des elektronischen pH-Meters der Firma WTW (Wien, Österreich). Die so erhaltenen Suspensionen der Lipide wurden dann bei einer Temperatur über der Phasenumwandlung der beteiligten Lipide ca. 30 Minuten gerührt und nach dem Abkühlen ca 10 Minuten entgast.

Für das Phasendiagramm des Mischsystems aus DMPC und DSPC wurden bei allen Zusammensetzungen eine Konzentration von 10 mM verwendet. Für die Messungen bei denen der Einfluss der Fluoreszenzfarbstoffe auf die Umwandlungstemperatur gemessen wurde, wurden die Farbstoffe schon zu Beginn der Präparation beim Mischen im Anteil von 1% oder respektive 5% im organischen Lösungsmittel zugegeben.

Bei den kalorimetrischen Messungen wurden allerdings um dem angestrebten System GUV (= Giant Unilamellar Vesicle) möglichst nahe zu kommen mit extrudierten unilamellaren Vesikeln gearbeitet. Hierbei wurden die erhaltene Suspension oberhalb der Schmelztemperatur 15 mal durch einen Filter mit Porendurchmesser von 100 nm gepresst. Der verwendete Extruder LipoFast Basic stammt von der Firma Avestin (Ottawa, Kanada), die verwendeten Filter der Firma sind aus einer perforierten Polycarbonatfolie gefertigt. Es wurde mittels elektromikroskopischen Aufnahmen gezeigt, dass die erhaltenen Vesikel der Porengröße des Filters entsprechen [45]. Diese Suspensionen wurden dann in Spezialkapillaren gefüllt, welche ein wesentlich kleineres Volumen besitzen als die eigentliche Messzelle, so dass hier niedrigere Signale gemessen wurden und das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich schlechter war. Diese Kurven wurden dann durch ein Computerprogramm auf vergleichbare Werte normiert.

Für die konfokale Fluoreszenzmikroskopie wurden die Lipide im jeweils benötigten Verhältnis in organischem Lösungsmittel (Dichlormethan:Methanol 2:1) gemischt und die Fluoreszenzmarker mit einem Anteil von 1:1000 beigegeben. Die Proben wurden wie oben getrocknet und dann nach den verschiedenen Präparationen Riesenvesikel hergestellt (siehe Kap. 4).

Kapitel 4

Giant Unilamellar Vesicles

4.1 GUV's als Modellsystem

Liposomen, auch Vesikel genannt, sind schon seit langem Gegenstand intensiver Untersuchungen. Als sie Anfang des 20. Jahrhunderts das erste Mal in einem Mikroskop sichtbar wurden (man untersuchte Lipidextrakte aus Gehirnen), nannte man sie „künstliche Zellen“ [42]. Mikroskopische Bilder zeigen multilamellare Vesikel. Allerdings wurde erst durch elektronenmikroskopische Aufnahmen sichtbar, dass es sich hier um geschlossene Strukturen handelt, die das flüssige Medium, in dem sie frei diffundieren, auch in ihrem Inneren aufweisen [9].

Gibt man Lipide in Wasser, bilden sich spontan meist multilamellare Vesikel mit einer Grössenverteilung von 50 bis etwa 1000 nm. Es stellte sich heraus, dass durch Beschallung mit Ultraschall diese grossen Gebilde zerschlagen werden und sich kleine Strukturen, sog. **Small Unilamellar Vesicles** ausbilden [54], mit denen man meist besser reproduzierbare Ergebnisse bekam. **Giant Unilamellar Vesicles** (GUV) erleben eine Renaissance seit Helfrich das Schwellverhalten von Lecithinen und Vesikelformen untersuchte [30, 31] und den Arbeiten von Evans, der die mechanischen Eigenschaften verschiedenster Lipid Bilayer bestimmte [17]. Es folgten weitere theoretische Vorhersagen von verschiedenen Strukturen und morphologischen Änderungen von Vesikeln durch Helfrich, Lipowsky, Seifert et al. [44]. Erst durch die gezielte Herstellung von Riesenvesikeln liessen sich diese Ergebnisse an einzelnen Objekten untersuchen und in Echtzeit beobachten.

Giant Unilamellar Vesicles sind sphärische Gebilde, die aus einer einzigen Lipiddoppelschicht bestehen. Je nach ihrer Grösse, die von 5 μm bis zu einigen hundert μm reicht, bestehen sie aus etwa $5 \cdot 10^8$ bis $5 \cdot 10^{10}$ Phospholipid-

molekülen¹.

Im Gegensatz zu den kleineren Verwandten, den 30-50 nm **Small Unilamellar Vesicles** und den 100-200 nm **Large Unilamellar Vesicles** sind die **GUV's** im Lichtmikroskop sichtbar und darin liegt ihr grösster Vorteil. Da man sie sehen kann, können morphologische Veränderungen wie z.B. Budding (das Abspalten von sog. Tochtervesikeln von einem Muttergebilde), Healing (das Schliessen von Löchern in der Membran) oder auch Fusionen (das Verschmelzen zweier Vesikel zu einem einzigen Gebilde) aufgenommen und ausgewertet werden [16]. Darüberhinaus erweisen sich die einzelnen Gebilde nach ihrer Herstellung als mechanisch erstaunlich beständig, denn sie sind über Tage hinweg stabil oder lassen sich zum Beispiel mit Micropipetten ansaugen und zum Teil sogar punktieren, um ins Innere chemisch oder biochemisch aktive Substanzen zu injizieren.

Im Vergleich zu biologischen Zellen mit ihrer ausserordentlichen Komplexität (sie bestehen aus hunderten verschiedenen Phospholipiden und Proteinen) kann man bei den **GUV's** die Zusammensetzung der Membran sehr gut kontrollieren und somit natürlich auch die Abhängigkeiten von katalytischen Prozessen, die in oder an der Membran ablaufen, von der Zusammensetzung des Systems untersuchen. So kann man z.B. von einfachen Einkomponentensystemen ausgehen und Schritt für Schritt die Komplexität der Zusammensetzung erhöhen und dabei die Veränderungen der Eigenschaften des Systemes aufzeichnen und auswerten. Die mechanische Stabilität der **GUV's** lassen unter anderem zu, sie als eine Art Mikroreaktor zu nutzen, in dem man gezielt enzymatische Prozesse in Gang setzt. Mittlerweile ist es sogar möglich, Riesenvesikel aus POPC (Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholine) mehrfach zu punktieren und so nacheinander verschiedene Reagenzien zu injizieren. Ein aktuelles Beispiel dafür ist die Injektion von DNA und pankreatischer DNase I, welche dann die DNA aufspaltet. Dies konnte so *in situ* aufgenommen und dokumentiert werden [53].

4.2 Herstellung der Vesikel

Zur Herstellung von **Giant Unilamellar Vesicles** gibt es mehrere Methoden, die auch mit verschiedenen Lipiden getestet wurden. Alle haben jedoch gemeinsam, dass das Entstehungsprinzip weitestgehend unverstanden ist und

¹Die Fläche eines einzelnen Lipidmoleküls ist etwa $0,5 \text{ nm}^2$.

noch der Aufklärung bedarf. Angelova et al. versuchen, dazu Modellvorstellungen zu entwickeln [4]. Initiiert wird die Entstehung durch Hydratation der Lipidschichten. Man hält für besonders wichtig, dass eine Separation der Schichten stattfindet und diese hydrierten Schichten danach eine Krümmung erfahren. Zu Beginn des Prozesses spielen die Normalkräfte, die zur Abstossung zwischen den Schichten führen, und die tangentialen Kräfte, welche die Krümmung verursachen, die entscheidende Rolle. Angelova et al. kommen zum Schluss, dass zum Beispiel ein äusseres, elektrisches Feld, speziell ein alternierendes, beiden Kräften Vorschub leisten kann.

Zwei wichtige Bedingungen haben alle Herstellungsprozeduren gemeinsam:

- die Temperatur während des Entstehungsprozesses muss bei allen beteiligten Substanzen höher als die der Phasenumwandlung sein (dies gilt auch für die Herstellung kleiner, grosser oder multilamellarer Vesikel)
- um Riesenvesikel zu erhalten, muss eine Erschütterung der Proben während der Entstehung unter allen Umständen vermieden werden.

Die zwei wichtigsten Produktionsmethoden, die im Rahmen dieser Arbeit Verwendung finden, um Domänen in unilamellaren Lipidschichten zu visualisieren, werden hier beschrieben.

4.2.1 Sanfte Hydratation

Bei der Methode der sanften Hydratation ist es laut Akashi et al. unbedingt notwendig, geladenes Lipid in geringen Mengen beizusetzen [1]. In der Regel wird es dem ungeladenen Lipid im Verhältnis 1:9 zugefügt. Die verwendeten Lipide werden in einer Mischung aus Chloroform und Methanol (2:1 im Volumenverhältnis) in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Von dieser Lösung werden nun 40 μ l auf einer aufgerauhten Teflonscheibe unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Um auch die geringsten Rückstände des Lösungsmittels noch zu entfernen, wird die Probe für mehrere Stunden (meist über Nacht) unter Vakuum gehalten ($p < 0,1$ mbar). Die Teflonscheibe wird dann mit der benetzten Fläche nach oben in ein ihrer Grösse entsprechendes Glasgefäss gegeben. Anschliessend werden die getrockneten Lipidschichten durch, mit Wasser gesättigtem Stickstoff, bei einer Temperatur von ca. 10 K über der Phasenumwandlungstemperatur der Lipide vorhydriert². Danach

²In der Literatur werden oft Temperaturen von 37° C angegeben. Dies hat historische Gründe. Weil die verwendeten Lipide meist eine oder mehrere Doppelbindungen hatten, sind sie bei 37° C ohnehin im fluiden Zustand.

gibt man sehr vorsichtig das, auf die gleiche Temperatur vorgewärmte, sog. „interne Medium“³ hinzu, welches aus der schon erwähnten Pufferlösung von 1mM EDTA und 5 mM HEPES mit einem Zusatz von 100 mM Succrose versehen ist. Diese Probe wird nun wieder bei der Temperatur von ca. 10 K über der Phasenumwandlung mehrere Stunden inkubiert.

Dabei wird der Lipidfilm Stück für Stück vom Substrat abgelöst und formt am Ende eine nahezu transparente, kleine weisse Wolke in der Lösung. Von dieser Wolke werden nun wenige μl (5 bis 10) abgezogen und in einer transparenten Nunc-Kammer⁴ (von der Firma Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA) zum „externen Medium“ zugefügt. Das externe Medium enthält im Unterschied zum internen 100 mM Glucose anstatt Succrose. Dies führt:

- durch den Unterschied in der Dichte der beiden Medien dazu, dass die Vesikel auf den Boden sinken und dort eher sitzen bleiben.
- zu einer Differenz im Brechungsindex, so dass die Vesikel bei der Betrachtung unter dem Phasenkontrastmikroskop wesentlich besser auffindbar sind.

Die Probe ist nun bereit zur Untersuchung unter dem Mikroskop.

Diese Art der Präparation wird oft auch mit einem Rotationsevaporator durchgeführt. Der Unterschied ist nur, dass die Lösung nicht auf ein Substrat aufgebracht wird, sondern bei geringerer Konzentration im Lösungsmittel (400 μl einer Konzentration von 0,1 mg/ml) in einen kleinen Glaskolben gegeben wird. Dieser wird dann schräg gestellt. Während er rotiert wird das Vakuum angelegt und so das Lösungsmittel abgedampft. Auch beim späteren Hydrieren wird der Kolben rotiert, so dass der gesamte Lipidfilm von der Glasoberfläche wieder abgelöst wird. Der weitere Verfahrensweg folgt wieder der obigen Beschreibung.

4.2.2 Elektroformation

Auch zur Herstellung der GUV's mit Hilfe der Elektroformationsmethode muss man das System jenseits der Umwandlungstemperaturen halten. Dafür

³Die Bezeichnung internes Medium rührt von der Tatsache her, dass dieses dann später in den Vesikeln eingeschlossen ist.

⁴Die Kammern bestehen aus acht abgetrennten kleinen Kammern aus PE, die nach unten mit einem Coverslip abgeschlossen sind, und nach oben hin werden sie nach dem Befüllen mit einem PE-Deckel abgeschlossen. Sie eignen sich sehr gut zur simultanen Untersuchung mehrerer Proben.

benötigt man in der Regel eine thermostatisierbare Zelle, in welcher die Präparation durchgeführt werden kann. Folgende Schritte werden durchgeführt:

- 1 bis 2 μl einer sehr niedrig konzentrierten Lösung von Lipid in organischem Lösungsmittel (ca 0,1 mg/ml Lipid) werden auf zwei parallele Platindrähte aufgebracht und unter einem Stickstoffstrom langsam getrocknet. Um das Lösungsmittel vollständig zu entfernen, wird die Probe wieder für mehrere Stunden unter Vakuum gehalten.
- Millipore Wasser ($R = 17,5 \text{ M}\Omega/\text{cm}$), welches je nach Substanz über die Schmelztemperatur vorgewärmt ist, wird der Kammer zugegeben.
- Nun wird mittels eines Funktionsgenerators, der an beiden Drähten angeschlossen ist, ein niederfrequentes Wechselfeld angelegt. Verwendung fand ein Funktionsgenerator FG 200 der Firma H-Tronic. Damit wird eine sinusförmige Spannung von 3 V mit einer Frequenz von 10 Hz angelegt. Damit wurden die besten Erfahrungen gemacht. Diese angelegte Spannung wurde mit einem Oszilloskop überprüft.
- Man kann unter dem Fluoreszenzmikroskop schon Minuten nach Anlegen der Spannung das Entstehen von Vesikeln in der Grösse mehrerer μm beobachten. Auch sieht man, dass die Lipidschichten mit der angelegten Frequenz oszillieren.
- Nach ca. 60 bis 90 Minuten wird die Spannung abgeschaltet. Man bringt das System auf die gewünschte Temperatur und kann mit den Experimenten beginnen.

Abb. 4.1 zeigt die Vorrichtung mit Platindrähten, die in eine der Nunc-Kammern eingelassen wird, um darin bei Raumtemperatur die Elektroformation anzuwenden. Sie ist so gefertigt, dass sie die einzelnen Kammern nach oben hin abschliesst. Damit werden Einflüsse durch Konvektion minimiert. Die Platindrähte werden so eingestellt, dass sie sich so nah wie möglich am unteren Coverslip befinden, damit man sich innerhalb des Arbeitsabstands des Mikroskopobjektivs befindet.

Ausführlichere Anleitungen zur Herstellung von GUV's mit Elektroformation werden in der Originalliteratur von Angelova et al. gegeben [3, 4, 5].

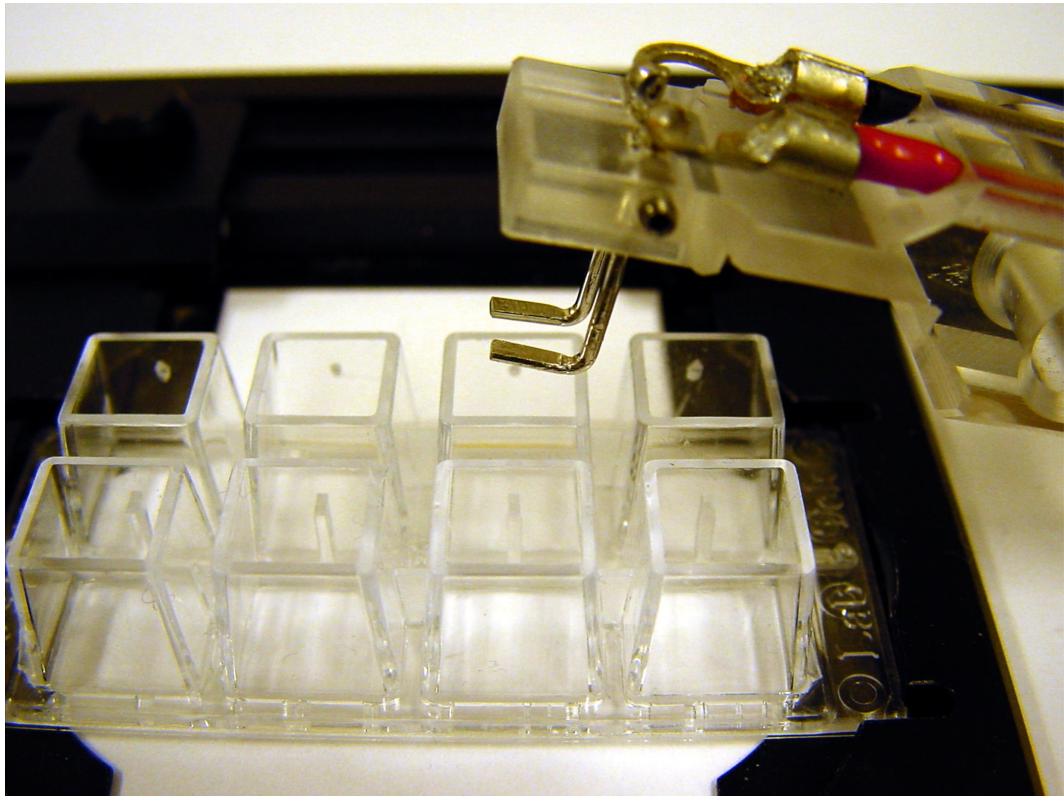


Abbildung 4.1: Versuchsanordnung mit Platindrähten, die in eine Nunc-Kammer eingelassen werden, um damit Elektroformation durchzuführen. Die Kantenlänge der Kammern sind ca. 8 mm

4.3 Beobachtungen und Erkenntnisse

Nachdem wir mit den beiden Methoden der *sanften Hydratation* und der *Elektroformation* GUV's herstellen konnten, sind folgende Erfahrungen festzuhalten.

Da sich für das eigentlich untersuchte Modellsystem DMPC-DSPC der vorausgesagte Phasenkoexistenzbereich im Temperaturregime zwischen 24°C und 54°C befindet, wurden einleitende Untersuchungen am System DLPC-DPPC durchgeführt. Dieses unterscheidet sich vom DMPC-DSPC-System jeweils nur durch um zwei CH_2 -Einheiten verkürzte Kohlenwasserstoffketten. Die Phasenübergangstemperatur für DLPC liegt bei -2°C und die von DPPC bei 41°C , so dass Phasenkoexistenz bei dieser Mischung gemäss dem Phasendiagramm auf jeden Fall bei Raumtemperatur zu finden ist.

Beginnend mit der *sanften Hydratation* stellen wir fest, dass es entgegen der herrschenden Meinung, auch ohne den Zusatz von geladenen Lipiden, mög-

lich ist, GUV's zu erhalten.

Bei den Versuchen mit geladenen Lipiden ⁵ ist es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen, Vesikel zu erzeugen, bei denen man davon ausgehen kann, dass sie unilamellar sind. Des weiteren fand sich auch keines, bei dem man mit konfokaler Mikroskopie eine makroskopische Phasentrennung auflösen kann. Deswegen wurde von einer weiteren Verwendung der geladenen Lipide abgesehen.

Es gelang jedoch mit einfachen Mischungen von DLPC und DPPC (ohne weitere Zusätze) mit Mischungsverhältnissen von 50:50 oder 20:80 in den angesetzten Lösungen derartige Aufnahmen zu machen. Ob sich diese Mischungsverhältnisse exakt in den beobachteten Vesikeln wiederfinden, ist unklar. Alles in allem war festzustellen, dass die Ausbeute an unilamellaren Vesikeln bei dieser Herstellungsmethode äusserst gering ist. Zusätzlich war die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei dieser Methode als dürftig zu bezeichnen. Giant Unilamellar Vesicles wurden in Grössen von 5 bis ca. 50 μm gefunden, allerdings nur in sehr geringer Anzahl und nach langem Suchen.

Übereinstimmend mit veröffentlichten Ergebnissen [8] fanden wir allerdings eine grosse Anzahl von multilamellaren Strukturen, die eine beträchtliche Grösse erreichen. Abb. 4.2 zeigt links eines dieser multilamellaren Vesikel in einer Grösse von 60 μm . Deutlich zu erkennen ist die Anordnung in Schichten. Ob dies allerdings einzelne Membranen sind, ist zu bezweifeln. Einzelne Membranen haben eine Dicke von ca. 5 nm und dies ist mit einem konfokalen Mikroskop nicht aufzulösen. Daher liegt die Annahme nahe, dass diese Schichten selbst schon von Multischichten gebildet werden, die sich dann in der gezeigten Anordnung aneinanderschmiegen.

Auf der rechten Seite der Abb. 4.2 sieht man ein ähnlich grosses Vesikel, das ein kleineres einschliesst. Auch dies ist eine Konstellation, die man bei der Herstellung mit der sanften Hydratation häufig findet. Meist sind die inneren Vesikel auch nicht statisch, sondern diffundieren in ihrem Muttervesikel hin und her.

Zusätzlich zu diesen Multistrukturen wurden auch immer wieder grosse zusammenhängende Cluster von GUV's gefunden, bei denen es nicht möglich war, auf ein einzelnes in diesem Verbund zu fokussieren. Hiervon Schichtbildaufnahmen zu machen, ohne durch die eng benachbarten Vesikel grosse Störungen zu verursachen, ist nicht realisierbar, da diese oft aneinander adhäriert waren. Auch war festzustellen, dass zusätzlich in der Lösung viele

⁵(Dem Lipidgemisch wurde jeweils ein Anteil von 5 bis 10 % DLPG, respektive DPPG beigelegt. Der Unterschied zwischen Phosphoglycerol und Phosphocholine besteht in der einfach negativen Ladung des Phosphoglycerols im Vergleich zum zwitterionischen Phosphocholine. Die Kettenbeschaffenheit der Lipide ist ansonsten gleich und die Umwandlungstemperaturen sind auch jeweils nahezu unverändert.)

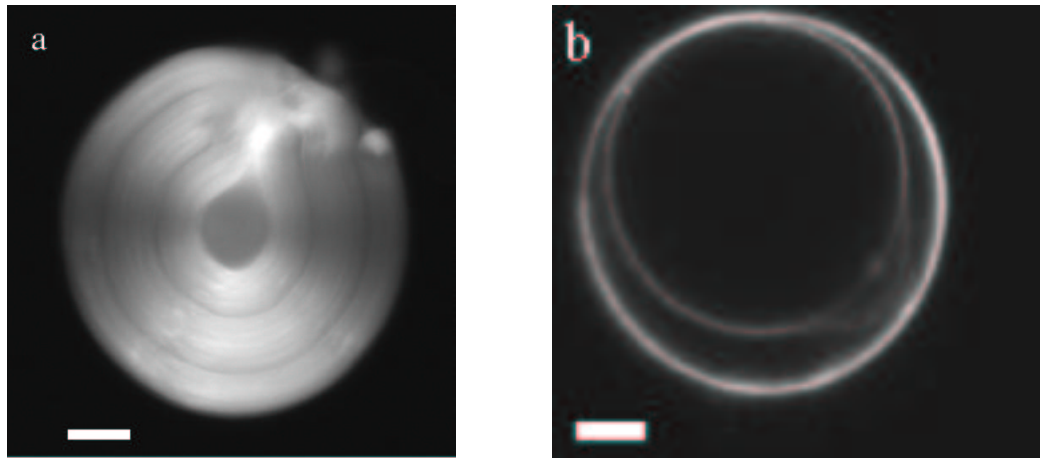


Abbildung 4.2: a) zeigt ein, mit der gentle-hydration-Methode hergestelltes Vesikel. Oftmals bilden sich multilamellare Vesikel aus, bei denen man die Multischichten gut unterscheiden kann. b) zeigt ein GUV, das ein kleineres umschliesst. Der Balken hat jeweils eine Länge von 10 μm .

myelin-artige Lipidstrukturen gebildet wurden [43, 56]. Abb. 4.3 zeigt eine Phasenkontrastaufnahme eines solchen Verbundes. Dies ist wahrscheinlich ein Teil der bei der Herstellung entstehenden Lipidwolke, die sich auch durch das nachträgliche Verdünnen nicht aufgelöst hat. Deutlich zu erkennen sind die zusammenhängenden Vesikel und am Rande des Gebildes die tubus-artigen Myelin-Strukturen. Die Tatsache, dass diese Vielzahl an Strukturen nebeneinander zu finden sind, legt die Annahme nahe, dass sie alle eine ähnliche Stabilität aufweisen.

Bei der Methode der Elektroformation stellten wir fest, dass schon nach wenigen Minuten die Bildung von eindeutig unilamellaren Vesikeln einsetzt. Diese haben Größenordnungen von mehreren μm . Auch kann man beobachten, dass die Vesikel eine Oszillation aufweisen, die einer Funktion der angelegten Frequenz und Spannung entspricht. Abb. 4.4 zeigt einen Ausschnitt eines konfokal aufgenommenen Bildes einer Vielzahl von Vesikeln, die sich am Platindraht gebildet haben. Was man allerdings auch berichten muss, ist, dass vor allem bei den Versuchen mit DMPC-DSPC Mischungen, bei denen mit der thermostatierbaren Zelle gearbeitet wurde, bei höheren Temperaturen Strömungen in der Flüssigkeit entstehen. Dies äussert sich auch dadurch, dass sich grosse Cluster von Lipidvesikeln vom Platindraht ablösen und sich vom Draht entfernen. Diese Cluster scheinen darüberhinaus durch spinnenwebartige kleine Gebilde von Lipiden zusammenzuhängen. Abb. 4.5 zeigt eine solche, sich ablösende Menge von Vesikeln.

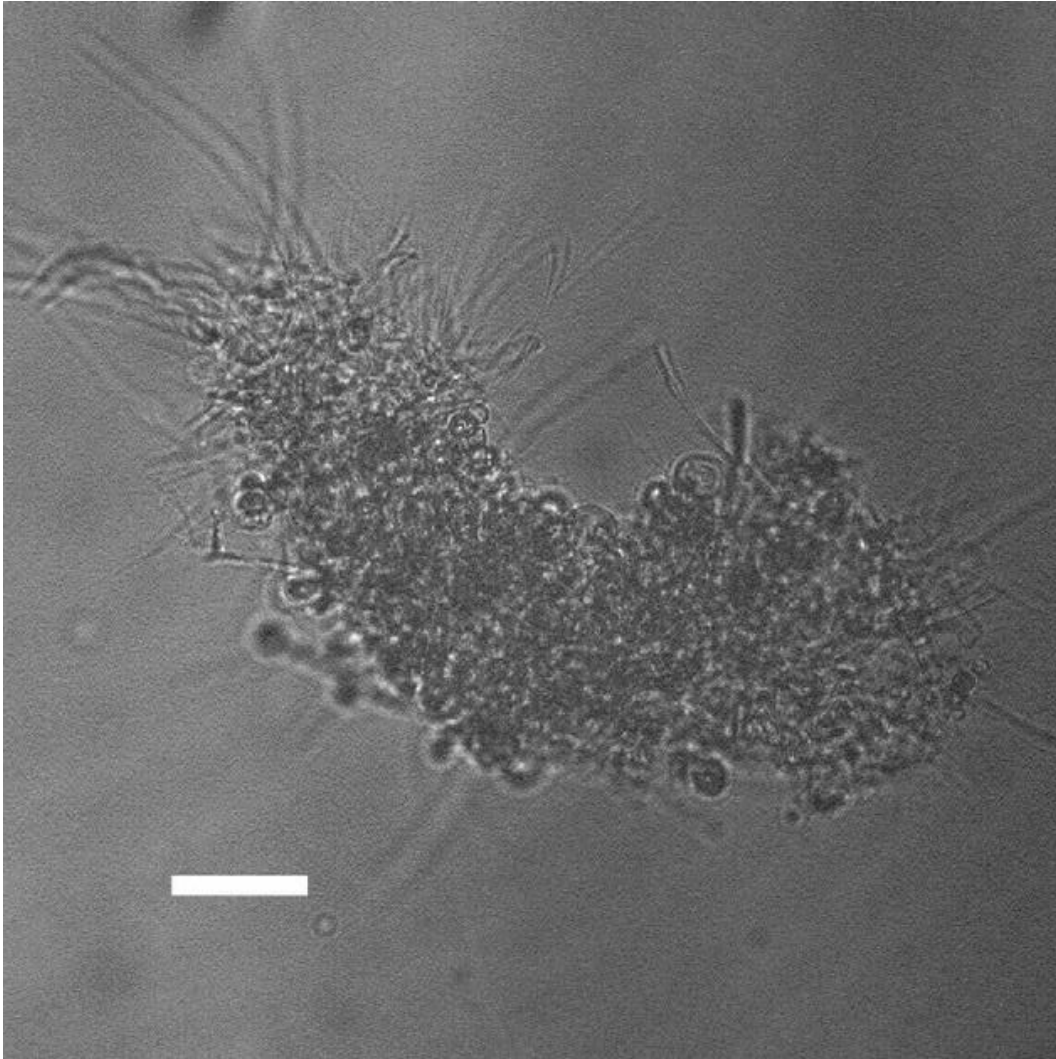


Abbildung 4.3: Phasenkontrastaufnahme von GUV's hergestellt mit der gentle-hydration-Methode. Es bilden sich grosse zusammenhängende Strukturen aus Vesikeln und schlauchartigen Fortsätzen. Der Balken hat eine Länge von $100\ \mu\text{m}$

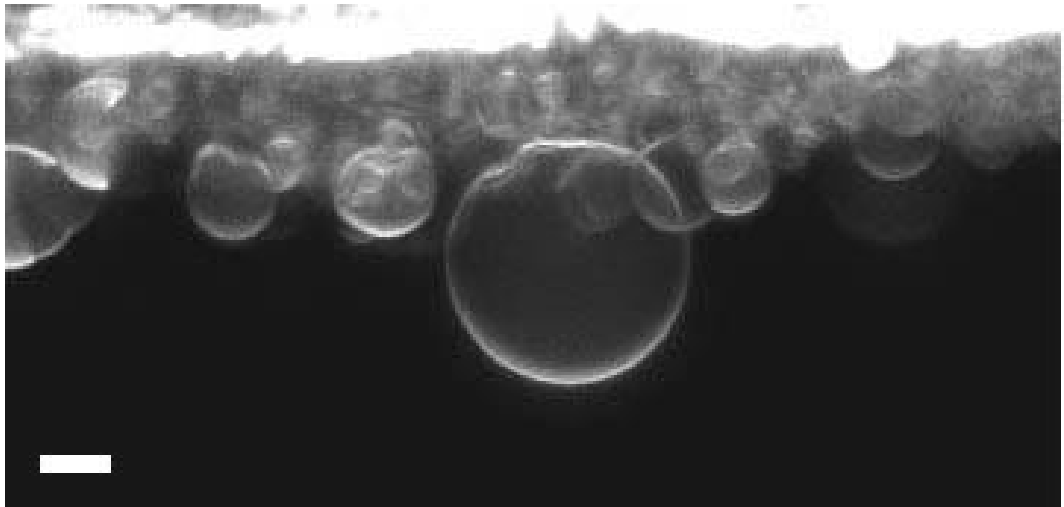


Abbildung 4.4: *GUV's einer Mischung von DMPC und DSPC, hergestellt mit der Elektroformationsmethode. Das grösste, zentrale Vesikel hat einen Durchmesser von ca. 40 μm. Der Balken entspricht einer Länge von 10 μm.*

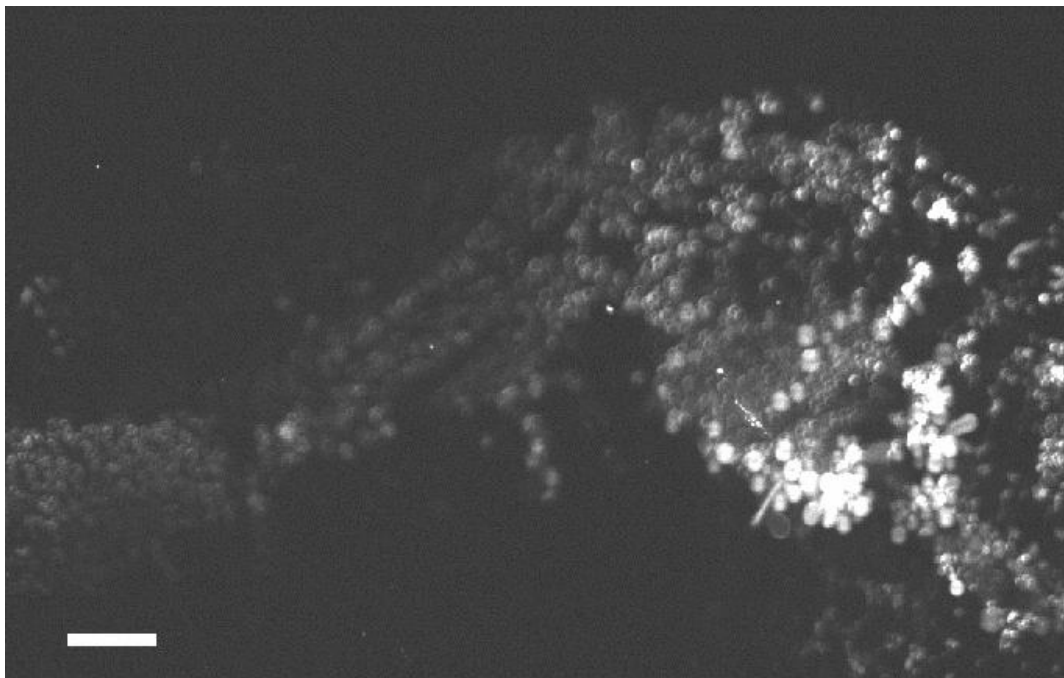


Abbildung 4.5: *GUV's, die sich in grossen zusammenhängenden Clustern vom Platindraht ablösen. Der Balken entspricht einer Länge von 20 μm.*

Kapitel 5

Resultate

In diesem Kapitel erfolgt eine Zusammenstellung der gewonnenen Ergebnisse aus den kalorimetrischen Messungen des gemischten Lipidsystems von DMPC und DSPC und ein Vergleich dieser Messungen mit Ergebnissen der Monte-Carlo-Simulationen aus der Arbeit von H. Seeger [59].

Anschliessend wird bewertet, wie sich der Zusatz der für die konfokalen Messungen verwendeten Fluoreszenzlabel auf die c_p -Profile auswirkt. Zum Schluss folgt eine Präsentation der konfokalen Aufnahmen an Giant Unilamellaren Vesikeln. Bei diesen Aufnahmen wurde die makroskopische Phasenseparation auch experimentell nachgewiesen.

5.1 Phasendiagramm

Die verwendeten Phospholipide DMPC (**D**imyristoyl-**P**hosphatidylcholin) und DSPC (**D**istearoyl-**P**hosphatidylcholin) differieren nur in der Kettenlänge ihrer Kohlenwasserstoffketten. DMPC besitzt 14 CH_2 -Gruppen in den beiden Ketten und DSPC jeweils 18. Die Kopfgruppe ist bei beiden gleich. Die Umwandlungstemperatur des reinen Lipids in wässriger Lösung liegt bei DMPC bei 297,5 K und bei DSPC bei 327,8 K und sie besitzen jeweils eine Umwandlungshalbwertsbreite im Bereich von etwa 0,1 K für multilamellare Vesikel.

Abb. 5.1 zeigt die in dieser Arbeit gemessenen c_p -Kurven des gemischten Lipidsystems DMPC-DSPC ausgehend von reinem DMPC (links unten) mit zunehmendem Anteil an DSPC bis hin zu der reinen DSPC-Umwandlung (rechts unten).

Im Falle von Mischungen bildet sich eine Phasenkoexistenzregion aus, in der sowohl die fluide als auch die gelförmige Phase vorliegen. Die c_p -Kurve enthält bei einer äquimolaren Mischung (50:50) zwei Peaks. Der Peak bei der

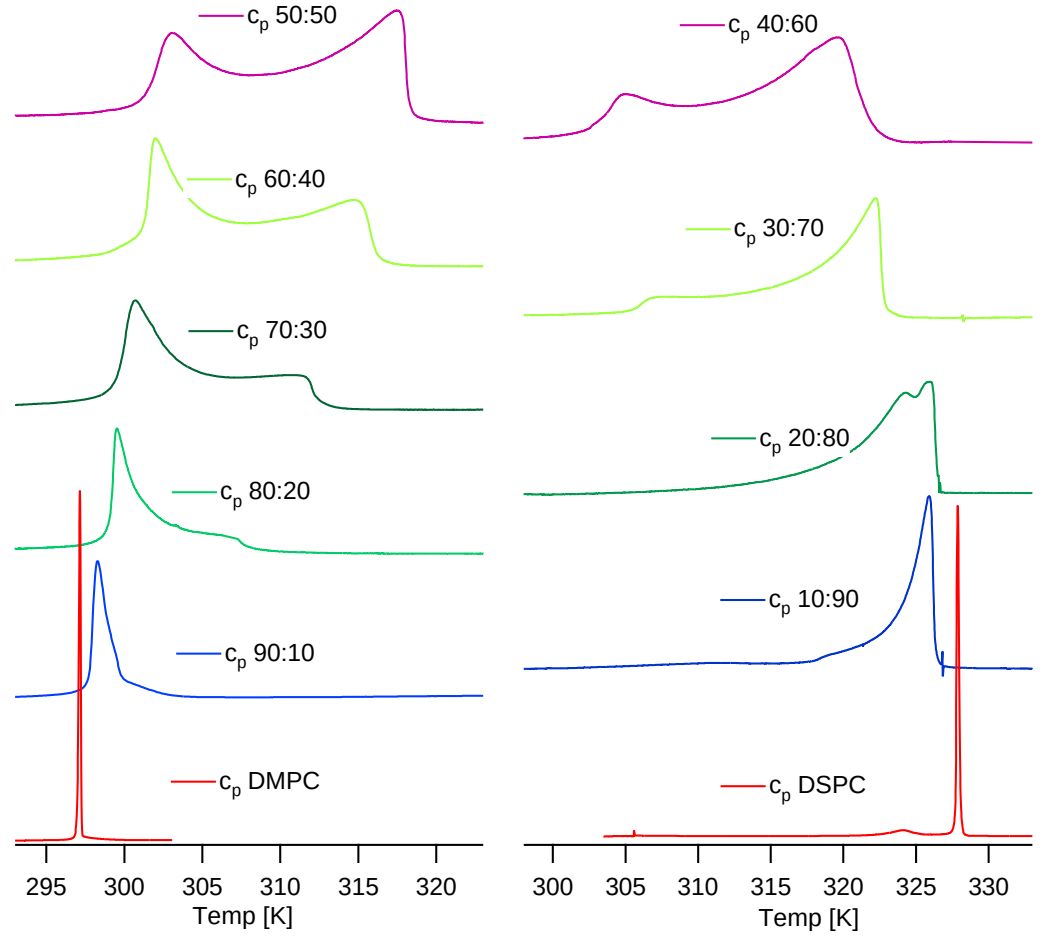


Abbildung 5.1: c_p -Kurven der gemessenen verschiedenen Mischungen von DMPC und DSPC.

niedrigen Temperatur ist hauptsächlich den Schmelzereignissen des DMPC zuzuordnen und der Peak bei höheren Temperaturen den Umwandlungen des DSPC. Dies wird auch ersichtlich, wenn man die Enthalpie-Fluktuationen in den Monte-Carlo-Simulationen betrachtet. Seeger hat diese Enthalpie-Fluktuationen über einen ganzen Temperatur-Scan verfolgt und kommt zu dem Ergebnis, dass bei den Temperaturen des unteren Schmelzpeaks hauptsächlich die DMPC-Moleküle stark fluktuieren (und somit schmelzen) und bei den Temperaturen des oberen Peaks die DSPC-Moleküle [59].

Aus den c_p -Kurven wurde nun mit dem beschriebenen Tangentenverfahren (Kap. 2.1) die Grenztemperaturen bestimmt und diese über der Konzentration als Phasendiagramm aufgetragen (Abb. 5.2). Die obere Kante

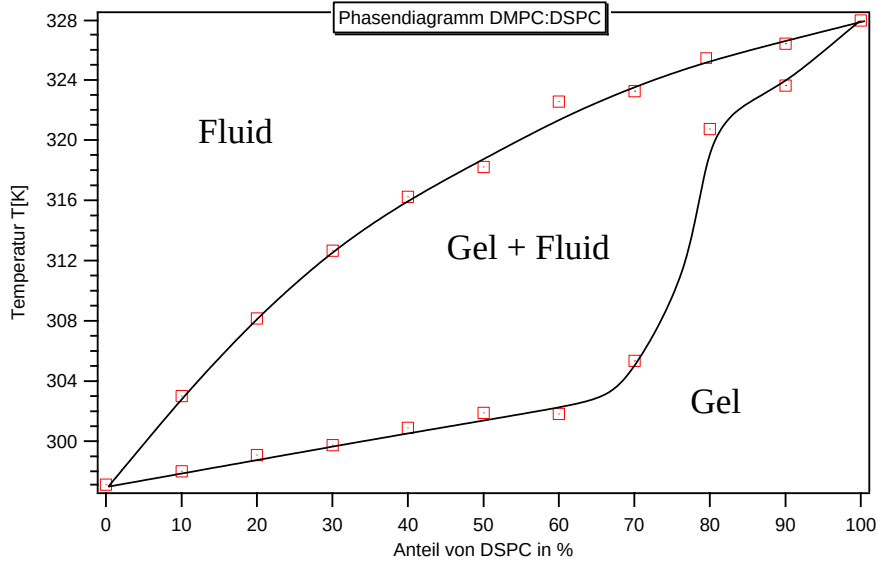


Abbildung 5.2: Experimentell aus kalorimetrischen Experimenten gewonnenes Phasendiagramm des Zweikomponentensystems aus DMPC und DSPC.

des so gewonnenen Phasendiagramms ähnelt dem einer idealen Mischung sehr. Dies lässt darauf schließen, dass sich DMPC und DSPC im fluiden Zustand nahezu ideal mischen und keine grossen Wechselwirkungsenergien auftreten. Die Wechselwirkungsparameter ω_{nm}^{ij} werden aus den Monte-Carlo-Simulationen bestimmt, indem versucht wird, die simulierten Kurven möglichst gut an die experimentellen Kurven anzufitten. Sugar et al. [64] und Seeger [59] bestimmten aus den Monte-Carlo-Simulationen einen Wechselwirkungsparameter ω_{ff}^{AB} zwischen den fluiden Molekülen der verschiedenen Komponenten von ca. $70 \text{ cal/mol} \cdot \text{Kette}$. Für den Fall einer idealen Mischung müsste dieser Parameter $\omega_{ff}^{AB} = 0$ sein. Die untere Kante des Diagramms zeigt jedoch eine starke Abweichung von der idealen Form. Bis zu einem Anteil von 60% DSPC steigt die Kurve langsam aber stetig an, um dann nach oben hin abzuknicken. Dies führt zu der Annahme, dass die Mischbarkeit der beiden Lipide im gelförmigen Zustand wesentlich schlechter ist als im fluiden. Aus den Monte-Carlo-Simulationen bestimmt man wieder die Wechselwirkungsparameter. Diese liegen für ω_{gg}^{AB} wesentlich höher als für die fluid-fluid-Wechselwirkungen und liegen bei $\omega_{ff}^{AB} = 155 \text{ cal/mol} \cdot \text{Kette}$. Abb. 5.3 zeigt die, mittels verschiedener Verfahren gewonnenen, Phasendiagramme. Das nach der ideal-solution-Theorie berechnete Phasendiagramm für ideales Mischverhalten beider Komponenten ist in grün dargestellt und hat die charakteristische Linsenform. Das kalorimetrisch bestimmte (blaue

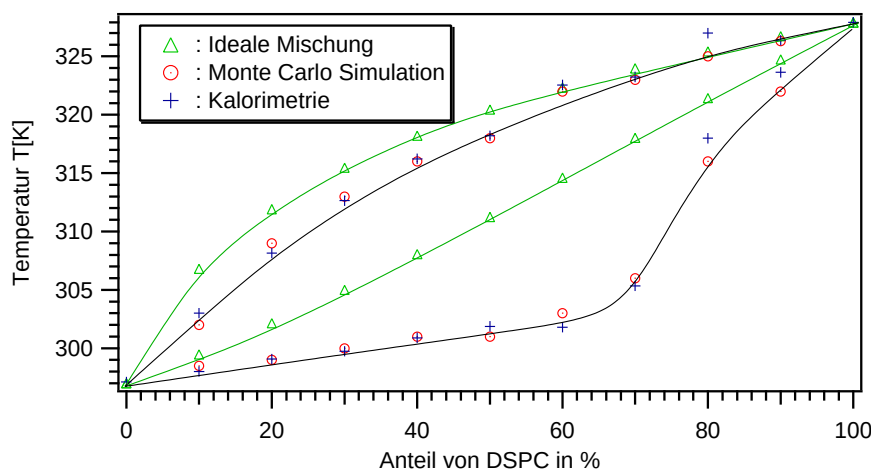


Abbildung 5.3: Vergleich der Phasendiagramme. Die grünen Marker stellen das Phasendiagramm einer idealen Mischung dar. Das aus Simulationen gewonnene (rot) stimmt gut mit dem kalorimetrisch bestimmten (blau) überein. Beide zeigen eine deutliche Abweichung von der idealen Form, da eine nichtideale Wechselwirkung zwischen den verschiedenen Komponenten angenommen wird.

Marker) und das daran angefüttete, aus Simulationen gewonnene (rote Marker) Phasendiagramm weichen deutlich von der idealen Form ab. Die grössten Wechselwirkungsparameter erhält man für $\omega_{fg}^{AB} = 410 \text{ cal/mol} \cdot \text{Kette}$, der die Wechselwirkung zwischen einem fluiden Molekül DMPC und einem gelförmigen Molekül DSPC beschreibt. Die Wechselwirkungen beruhen hauptsächlich auf dem Längenunterschied der Moleküle und dem damit verbundenen Angriffspunkt für Moleküle des Lösungsmittels (= „hydrophobic mismatch“). Sie sind für das kurze fluide DMPC und das längere gelförmige DSPC am grössten. Die restlichen Wechselwirkungsparameter ω_{fg}^{AA} , ω_{fg}^{BB} und ω_{gf}^{AB} liegen dazwischen.

5.2 Farbstoffe in der Membran

Um eine makroskopische Phasentrennung unter dem Fluoreszenzmikroskop auflösen zu können, muss man dem Lipidsystem fluoreszierende Farbstoffe in geringer Konzentration zugeben. Gemessen wurde mit Farbstoffkonzentrationen von 0,1% Farbstoff im System. In dieser Arbeit wurden die Farbstoffe

D-3803 und D-307¹ benutzt, die in Kap. 3.2 in ihrer Struktur beschrieben sind. Ausgewählt wurden sie, weil sie in ihrer Struktur Lipiden ähneln und nur zusätzlich eine Farbstoffgruppe tragen. Kalorimetrische Untersuchungen hatten das Ziel, über das Lösungsverhalten der Farbstoffe in den einzelnen Lipidphasen Aufschluss zu geben. Bei der Auswahl der Farbstoffe wurde vorausgesetzt, dass sie unterschiedliches Lösungsverhalten in der fluiden und in der gelförmigen Phase besitzen und sich deshalb in der einen oder anderen Phase anreichern. Ist dies der Fall, kann eine makroskopische Phasentrennung unter dem Fluoreszenzmikroskop aufgelöst werden. Bei den Messungen im Kalorimeter wurden den Lipiden die Farbstoffe im Verhältnis 1:100 bzw. im Fall von D-307 auch im Verhältnis 5:100 zugesetzt.

5.2.1 Interpretationsmodell

Die Farbstoffe sind Fremdmoleküle, die in die Lipidmembran eingebaut werden und durch ihre andere Struktur nichtideale Wechselwirkungen mit den, sie umgebenden Lipiden hervorrufen. Um ihren Einfluss auf die Schmelzwandlung der Lipide einordnen zu können muss ein Interpretationsmodell zu Hilfe genommen werden, das für andere, frühere Untersuchungen, erstellt worden ist. Die Abbildungen 5.4 und 5.5 zeigen Snapshots² aus Monte-Carlo-Simulationen an Phospholipidmembranen (DPPC). Ivanova et al. [29] untersuchten die Veränderung des kalorimetrischen Profils durch die Zugabe von Peptiden (kleine Proteine), die mit den verschiedenen Phasen unterschiedlich gut wechselwirken. Dabei wird angenommen, dass die Peptide selbst keinerlei Umwandlung erfahren. Abb. 5.4 a) zeigt, dass sich das c_p -Profil zu höheren Temperaturen hin verschiebt, wenn sich das Peptid besser in der gelförmigen Phase löst. In b) wurde die Wechselwirkung zwischen Peptid und den fluiden Lipiden als ideal angenommen. Das Peptid reichert sich in der fluiden Phase an und das c_p -Profil verschiebt sich zu tieferen Temperaturen.

In Abb. 5.5 c) und d) ist die Wechselwirkung zwischen Peptiden und den beiden Lipidphasen jeweils gleich gut. Das kalorimetrische Profil wird nicht verschoben, sondern flacher und breiter als im reinen Lipidsystem. Allerdings ist die Verteilung der Peptide in den Snapshots unterschiedlich. Ist die Wechselwirkung zu beiden Phasen ideal ($\omega_{gp} = \omega_{fp} = 0$), dann sind die Peptide statistisch verteilt ohne Präferenz für irgendeine Phase. Ist die Wechselwirkung zu beiden Phasen ungünstig ($\omega_{gp} = \omega_{fp} > \omega_{gf}$), dann neigen die Peptide zur Clusterbildung in beiden Phasen.

¹Dies sind die Typenbezeichnungen des Herstellers *Molecular Probes*

²Schnappschüsse, die die Lipidzustände der Simulation zu einer bestimmten Zeit wiedergeben

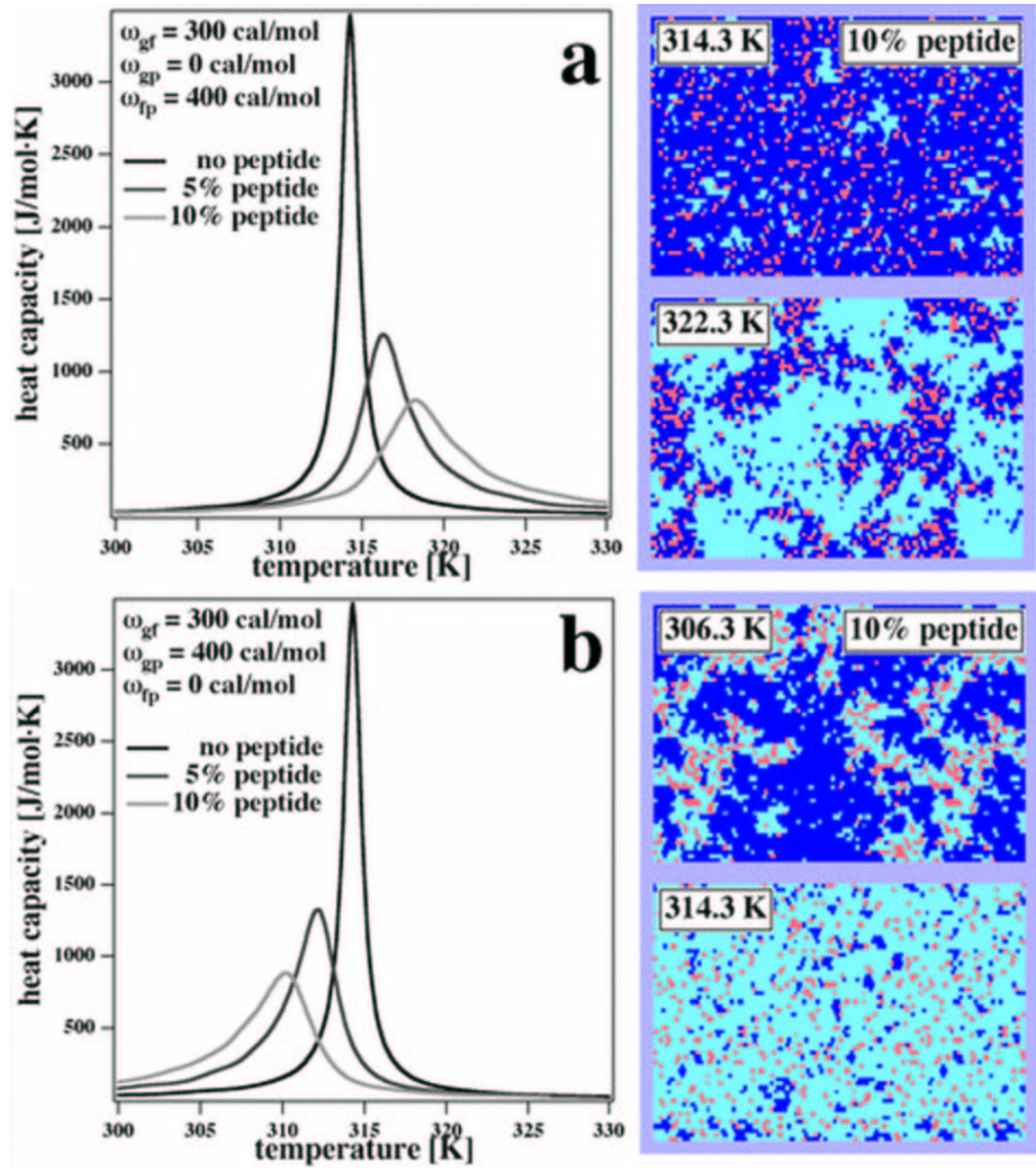


Abbildung 5.4: Snapshots von Simulationen zu den Veränderungen des kalorimetrischen Profils der Schmelzumwandlung von DPPC durch die Zugabe von Peptiden (rote Marker), die unterschiedliches Lösungsverhalten in den Phasen zeigen (aus [29]).

5.2.2 Mischsystem aus DLPC und DPPC

Bei der Interpretation der kalorimetrischen Daten wird davon ausgegangen, dass sich die Fluoreszenzlabel näherungsweise verhalten wie die Peptide in

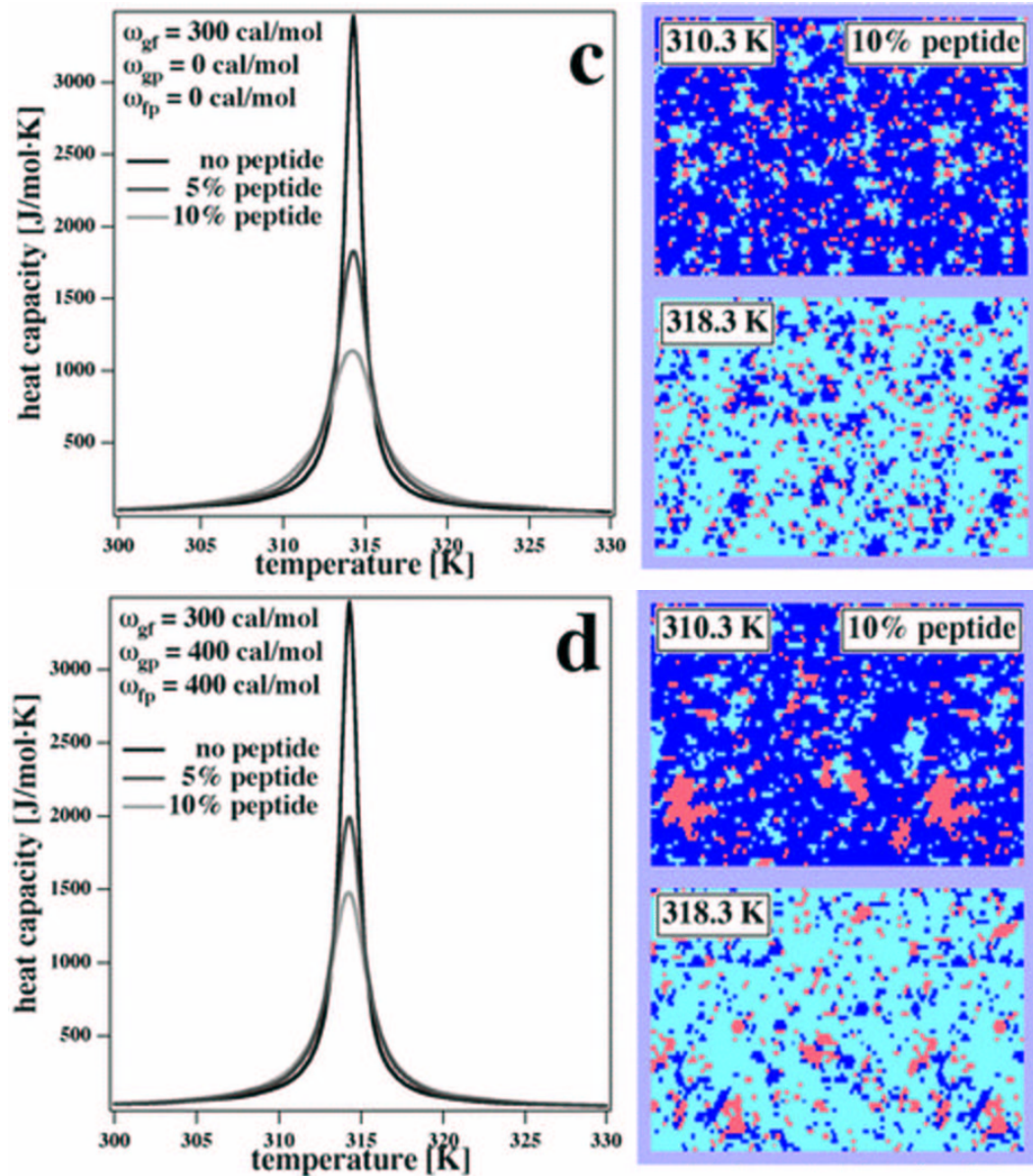


Abbildung 5.5: Die Peptide (rote Marker) zeigen gleiches Lösungsverhalten in beiden Phasen. Sie sind entweder statistisch verteilt oder neigen zum Clustern, je nachdem ob die Wechselwirkungen mit den Lipiden niedriger oder höher sind als die WW zwischen fluiden und gelförmigen Lipiden (aus [29]).

den Membranen. Ohne diese Annahme ist es kaum möglich eine Aussage über das Verhalten der Label in den Membranen zu treffen. Abb. 5.6 und

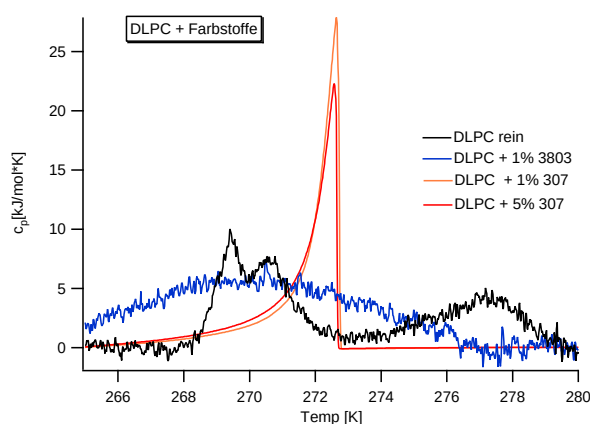


Abbildung 5.6: Messungen von DLPC mit den verwendeten Farbstoffen D-3803 und D-307.

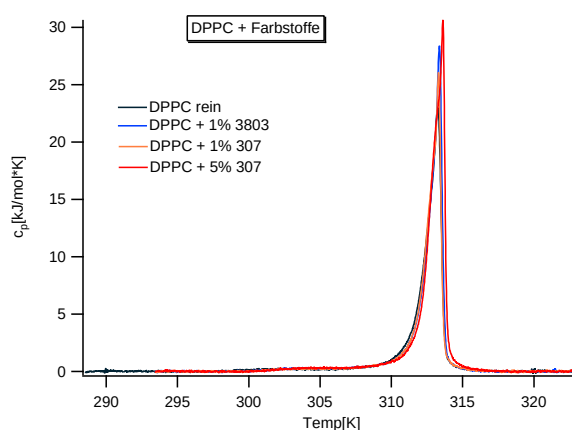


Abbildung 5.7: Messungen von DPPC mit den verwendeten Farbstoffen D-3803 und D-307.

5.7 zeigen die kalorimetrischen Profile von DLPC und DPPC mit den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen. Im Falle von DLPC ist das Signal zum Teil sehr stark verrauscht, da aufgrund des niedrigen Schmelzpunktes des Lipids nicht wie gewohnt in der Messzelle gemessen werden kann. In diesem Fall wird eine Mischung aus Glycerin und Wasser (40:60) eingefüllt, was zu einer Gefrierpunktabenkung des Wassers um ca. 16 K führt. Dies verhindert, dass die Messzelle bei Temperaturen unter 0° C Schaden nimmt. Anschliessend wurden die extrudierten Vesikel 30 Minuten bei 20000 U^{-1} zentrifugiert und 90 % des Überstandes abgezogen, so dass man auf eine reale Konzentration

von 100 mM kommt. Diese Suspension wurde dann in eine Spezialkapillare gefüllt und diese in die Messzelle gegeben.

Reines DLPC (Abb. 5.6) besitzt eine breit aufgefächerte Umwandlung, die aus drei unterschiedlichen Peaks besteht. Im Falle der Zugabe von 1% des kurzkettigen Farbstoffes D-3803 verändert sich die c_p -Kurve dahingehend, dass diese Aufspaltung gänzlich verschwindet. Es ist nur noch eine ziemlich breite, flache Kurve zu sehen. Dies lässt nach der oben angeführten Interpretation darauf schliessen, dass sich das Label in beiden Lipidphasen ähnlich gut löst und keine der Phasen bevorzugt.

Bei dem langkettigen Label D-307 ist die c_p -Kurve deutlich zu höheren Temperaturen verschoben und auch hier ist von der Aufspaltung in mehrere Peaks nichts mehr zu sehen. Die Verschiebung ist hier ein deutliches Indiz, dass sich dieses Label stärker in der gelförmigen Phase des DLPC anreichert.

Bei den Kurven des DPPC-Systems stellt sich die Lage anders dar. Hier ist auffällig, dass die Kurven mit den beiden Labeln und das reine Lipidschmelzprofil nahezu exakt übereinander liegen. Eine Verschiebung oder Verbreiterung des Profils ist nicht zu erkennen. Dies lässt darauf schliessen, dass sich die beiden Label (D-307 in den angewandten Beimischungen konzentrationsunabhängig) mit dem Lipid DPPC in beiden Phasen gar nicht mischen.

5.2.3 Mischsystem von DMPC und DSPC

Bei den Messungen von DMPC mit den Farbstoffen ist zu erkennen, dass hier die Umwandlungstemperaturen in allen Fällen zu tieferen Temperaturen verschoben sind. Hier sind allerdings konzentrationsabhängige Unterschiede auszumachen. Bei der Zugabe von D-3803 verschiebt sich der Punkt der Phasenumwandlung um ca. 4 K zu tieferen Temperaturen und die Umwandlungsbreite der Kurve verändert sich von ca. 1,0 K auf 1,8 K. Durch Zugabe von D-307 verschiebt sich die Kurve erst bei einer Konzentration von 5 % um etwa 4,0 K, dort ist jedoch eine noch stärkere Verbreiterung (auf etwa 5,0 K Umwandlungsbreite) und Abflachung zu erkennen. Dies lässt darauf schliessen, dass die Präferenz des kurzkettigen Labels für die fluide Phase um einiges höher ist, als die des langkettigen.

Im Falle des DSPC gestalten sich die Ergebnisse derart, dass hier die Kurven mit den beiden Labeln wieder konzentrationsunabhängig nahezu deckungsgleich übereinander liegen. Diesmal sind die Kurven im Vergleich zum DPPC jedoch um 3,0 K zu tieferen Temperaturen verschoben. Darüberhinaus weisen sie eine breite Schulter nach unten hin auf, deren Ausläufer etwa 10 K niedriger liegen, als die Umwandlungstemperatur des reinen Lipidsystems. Diese Ergebnisse lassen darauf schliessen, dass die beiden Label, der Lipid-

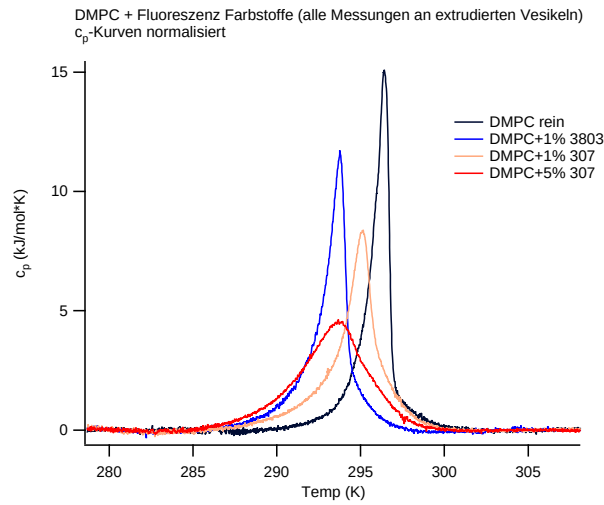


Abbildung 5.8: Messungen von DMPC mit den verwendeten Farbstoffen D-3803 und D-307.

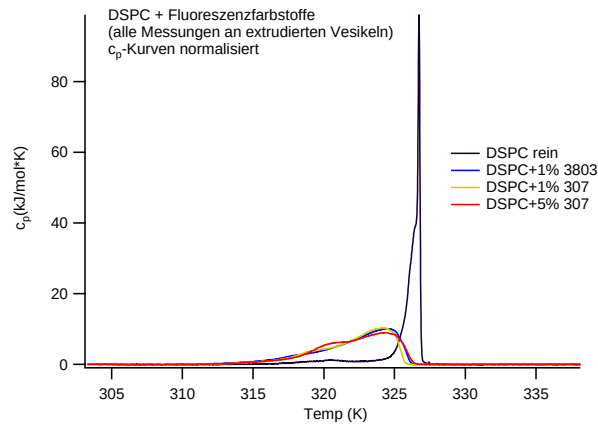


Abbildung 5.9: Messungen von DSPC mit den verwendeten Farbstoffen D-3803 und D-307.

membran zugesetzt, sich in der fluiden Phase gut lösen, in der gelförmigen allerdings eher zu einer Clusterbildung neigen könnten.

5.3 Konfokale Bilder von Riesenvesikeln

Alle Aufnahmen, bei denen es möglich war, eine makroskopische Phasentrennung zu dokumentieren wurden an Vesikeln durchgeführt, die mit der

Methode der sanften Hydratation hergestellt wurden. Sie wurden alle am gemischten Lipidsystem DLPC und DPPC bei zwei verschiedenen Zusammensetzungen gewonnen, entweder einer äquimolaren Mischung (50:50) oder bei Mischungen von 20 % DLPC und 80 % DPPC. Bei anderen Mischungsverhältnissen ist es im Laufe dieser Arbeit nicht gelungen, die Phasentrennung aufzunehmen. Auch beim System DMPC-DSPC ist es nicht gelungen, diese Phasenentmischung nachzuweisen.

Abb. 5.12 zeigt Bilder der Mischungen 20 % DLPC und 80 % DPPC. Die Farbstoffe, die den Lipiden zugegeben wurden, werden bei verschiedenen Wellenlängen angeregt und ihre Emission auch bei verschiedenen Wellenlängen aufgenommen (siehe Kap. 3.2) Diese Bilder werden nun jeweils einem Farbkanal zugeordnet und im nächsten Schritt zu einem Farbbild zusammengefügt. Das Ergebnis sieht man jeweils in der unteren Gesamtdarstellung. Der Balken entspricht bei allen Bildern einer Länge von 10 μm .

Die Abbildungen 5.11 bis 5.14 stammen von äquimolaren Mischungen von DLPC und DPPC. Der Aufbau der Bilder ist wie oben beschrieben.

Die verschiedenen Zusammensetzungen unterscheiden sich deutlich in der Struktur der abgebildeten Phasen. Bei den 20:80 Mischungen sieht man eine nahezu totale Entmischung in verschiedene Bereiche, wogegen in den äquimolaren Mischungen eher von einer perkolierenden Struktur die Rede ist [13]. So bezeichnet man eine Struktur, bei der es möglich ist, sich von einer Seite eines Gebietes bis zur anderen zu bewegen, ohne die Cluster verlassen zu müssen. Es bildet sich auf den Vesikeln ein Netzwerk von gelförmigen Phasen aus, das fluide Bereiche umspannt. Man findet in den Intensitätsverteilungen auch Bereiche, in denen beide Farbstoffe vorhanden sind. Ausserdem wurde festgestellt, dass vor allem der blaue Farbstoff (D-3803) oftmals in allen Bereichen verteilt war und es in dessen Intensitätsprofil zum Teil nicht möglich war, eine Entmischung zu beobachten. Dies führt dazu dass in den zusammengeführten Bildern der Einfluss des roten Farbstoffs (D-307) deutlich überwog.

5.4 Bestimmung der Domänengrößen

Bei der Bestimmung der Anteile der Lipide in den jeweiligen Phasen wurden folgende Annahmen gemacht: Es wurde davon ausgegangen, dass tatsächlich eine rein makroskopische Phasentrennung stattfindet und die Existenz von sogenannten Mikrodomänen³ wurde vernachlässigt.

³kleine Domänen der fluiden Phase, die sich in gelförmigen Bereichen ausbilden oder umgekehrt.

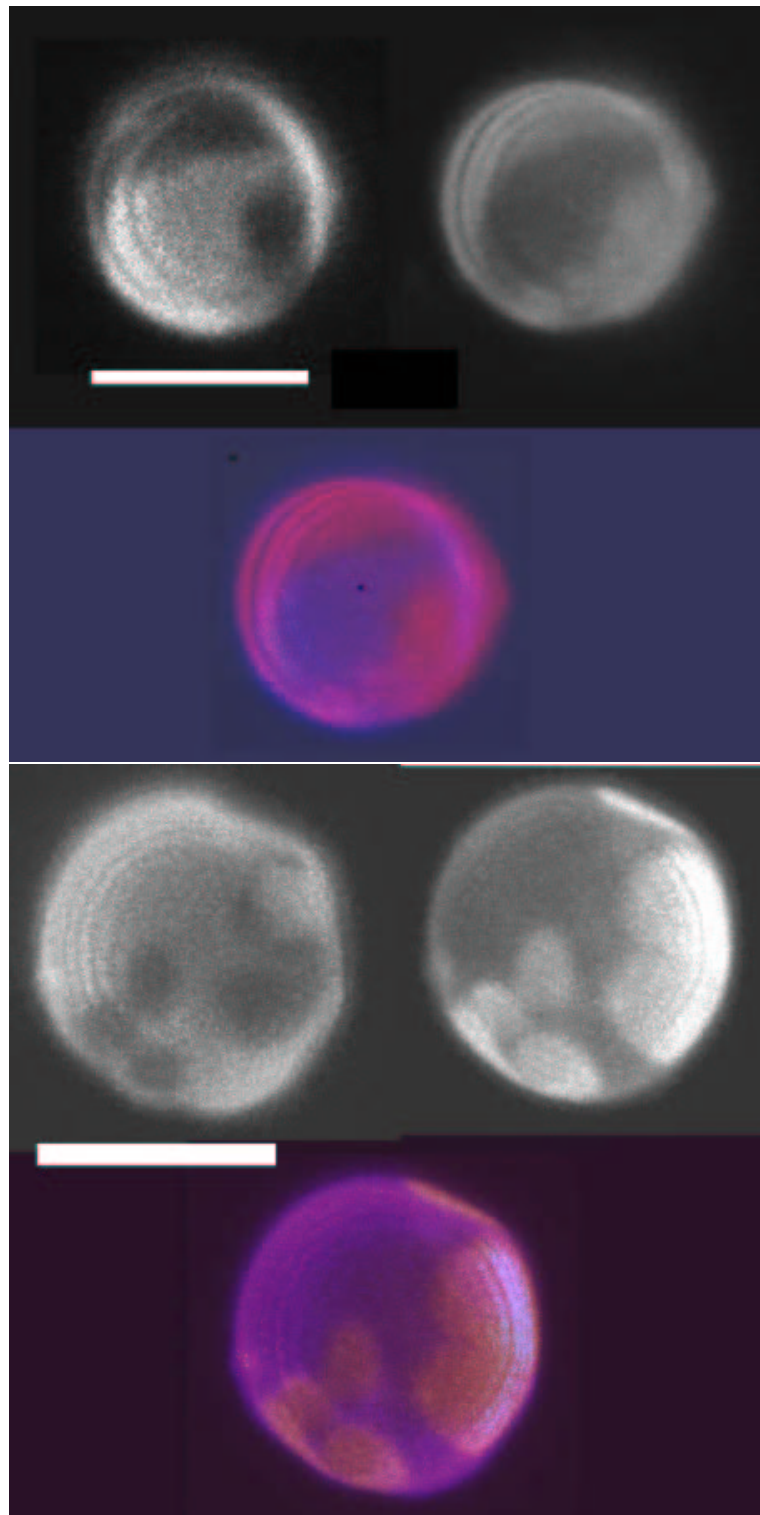


Abbildung 5.10: 20:80-Mischungen von DLPC und DPPC. Die Phasentrennung ist grossflächig zu sehen. Die Label entmischen sich jedoch nicht vollständig aus den Phasen der ungünstigeren Wechselwirkungen. Die roten Bereiche entsprechen den gelförmigen Domänen und die blauen den fluiden Domänen.

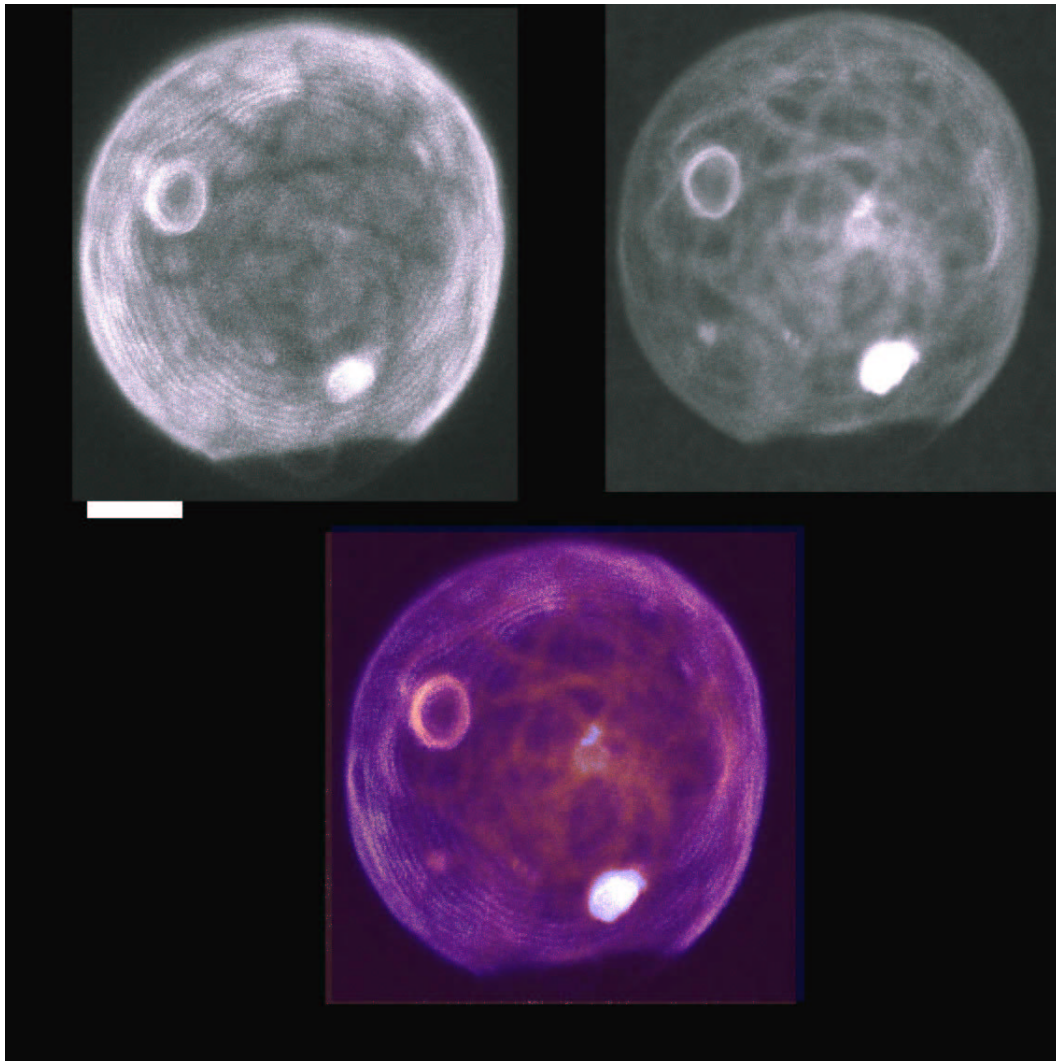


Abbildung 5.11: 50:50-Mischung von DLPC und DPPC. Die gelförmige Phase bildet eine perkolierende Struktur aus, in der fluide Domänen eingebettet sind. Die Entmischung ist hier jedoch undeutlicher zu sehen als bei den 20:80-Mischungen (gel = rot, fluid = blau).

Es wurde folgende Vorgehensweise für die Auswertung angewandt (zur Illustration siehe Abb. 5.15):

- die zusammengeführten Bilder werden im Kontrast verstärkt und somit werden die Phasengrenzen deutlicher sichtbar gemacht (links).
- die so entstandenen Bereiche werden je mit rot oder blau (nach Farb-

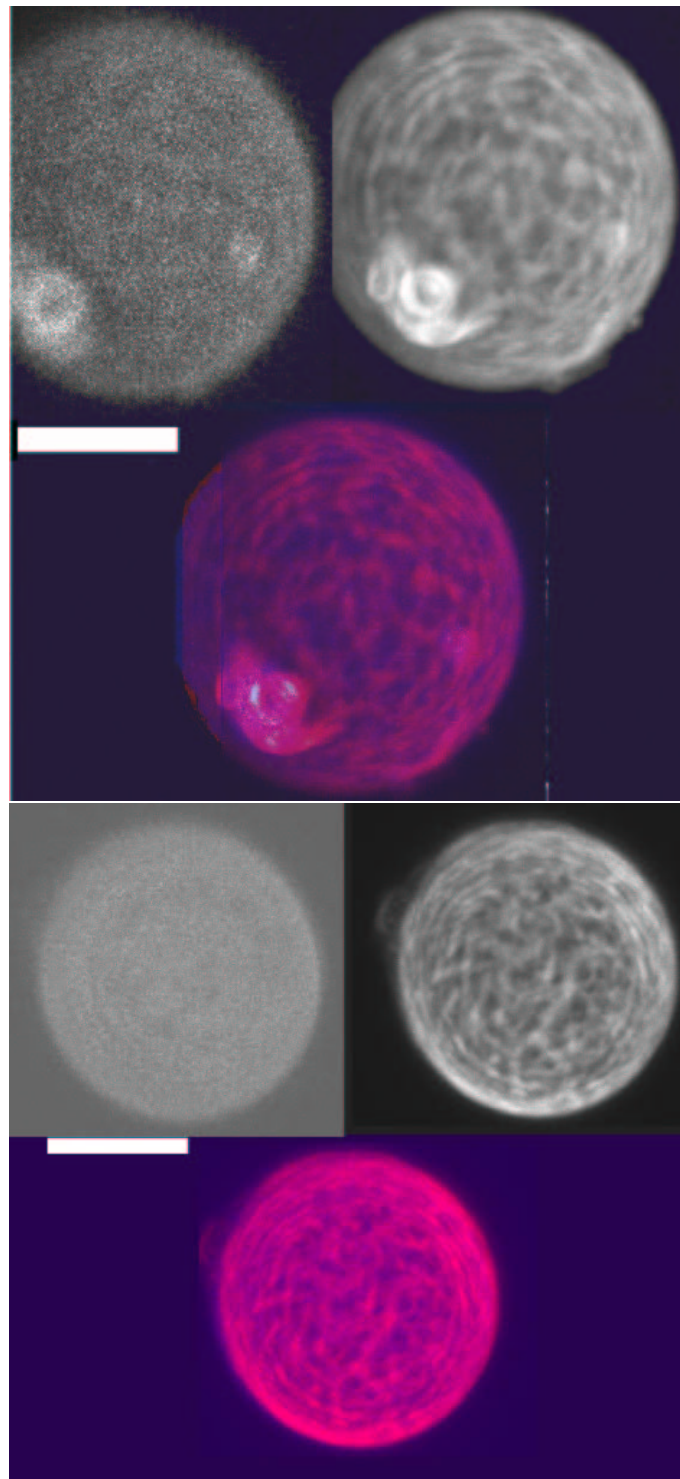


Abbildung 5.12: 50:50-Mischungen von DLPC und DPPC. Perkolierende Strukturen der gelförmigen Phase. Das kurzkettige Label D-3803 ist jedoch annähernd homogen über die Vesikel verteilt. Die Entmischung ist nur durch das langkettige Label D-307 festzustellen (gel = rot, fluid = blau).

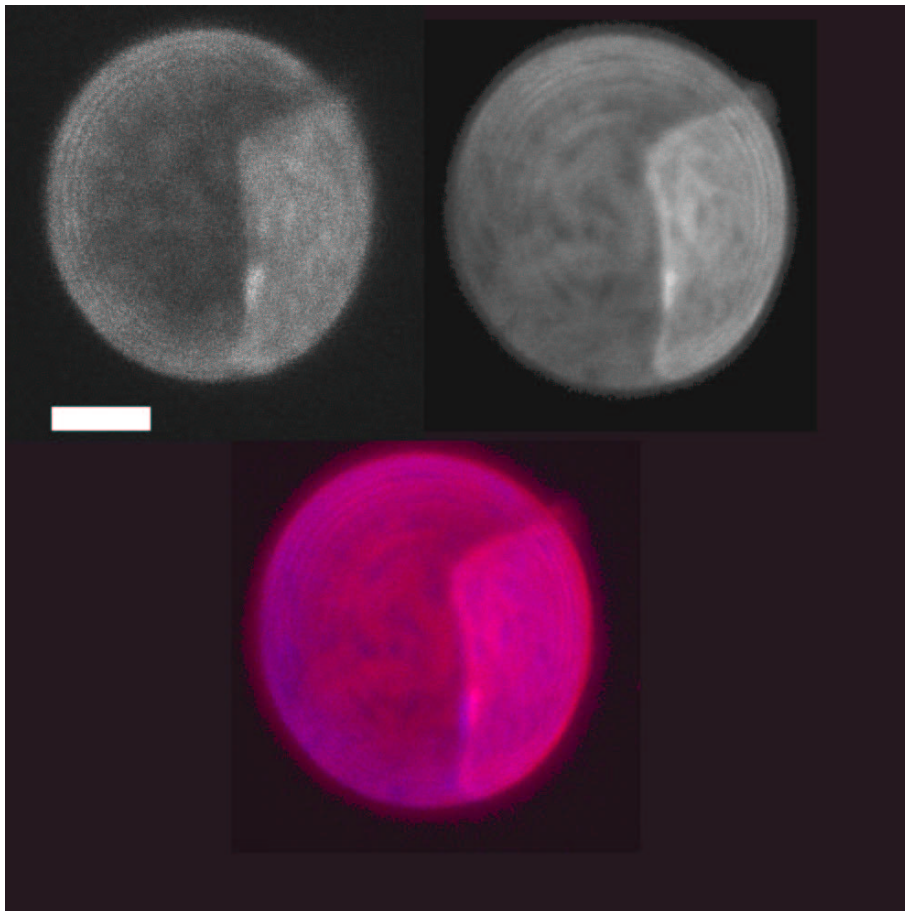


Abbildung 5.13: 50:50-Mischung von DLPC und DPPC. Bei diesem Vesikel ist die Entmischung schwer zu erkennen. Auch hier ist sie nur im roten Kanal (rechts oben) zu identifizieren. Der helle Bereich in der rechten Hälfte des Vesikels entspricht zusätzlichen Membranschichten (gel = rot, fluid = blau).

kanal) unterlegt (mitte).

- es werden konzentrische Kreise eingezeichnet, die die Projektionsflächen darstellen, aus denen auf die ursprünglichen Kreissegmentfläche zurückgerechnet wird.
- durch Ausschneiden der Bereiche in den Ringen und abwiegen lässt sich der relative Anteil der Phasen in den Projektionsringen bestimmen
- mit dem Wissen der Fraktionsgrößen lässt sich durch die rückwirken-

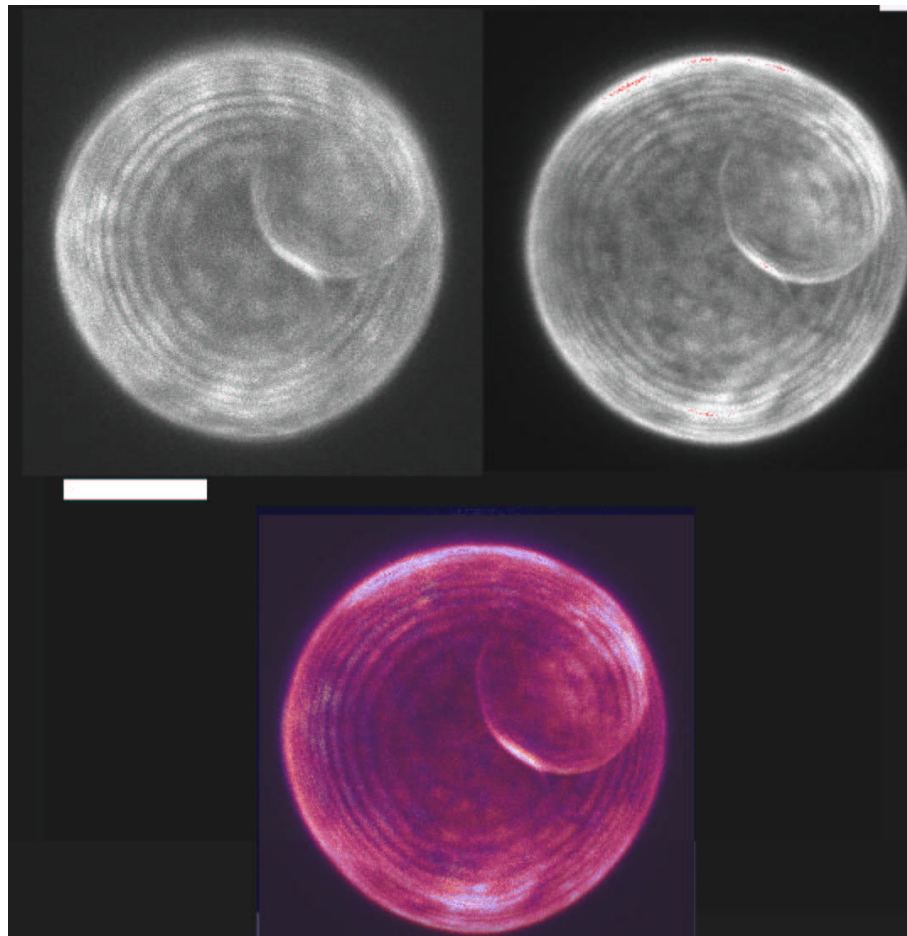


Abbildung 5.14: 50:50-Mischung von DLPC und DPPC. Im Muttervesikel ist ein kleineres eingeschlossen (gel = rot, fluid = blau).

de Anwendung der Projektion die reale Fläche der fluiden (blau) und gelförmigen (rot) Phasen bestimmen.

- anschliessend wird mit dem in Kapitel 2.4 vorgestellten Verfahren der Anteil der Lipide in den fluiden und gelförmigen Phasen berechnet.

Die theoretische Auswertung (Kap. 2.4) sagt bei Raumtemperatur (296 K) den 20:80-Mischungen ($\gamma_1 = 0,8$) einen Anteil der fluiden Phase von $f = 0,12$ und der gelförmigen Phase von $1 - f = 0,88$ voraus (Hebelgesetz). Mit dem beschriebenen Auswerteverfahren findet sich bei den GUV's der 20:80-Mischungen jedoch ein fluider Anteil von $f = 0,6$ und ein Gelanteil von $1 - f = 0,4$.



Abbildung 5.15: *Das konfokale Bild eines Vesikels einer Mischung von 20 % DLPC und 80 % DPPC. Es wird im Kontrast verstärkt und Mikrodomänen werden als nicht vorhanden angenommen. Anschliessend werden die Projektionsflächen als Kreisringe eingezeichnet und deren Zusammensetzung ausgewertet (siehe Kap. 2.4).*

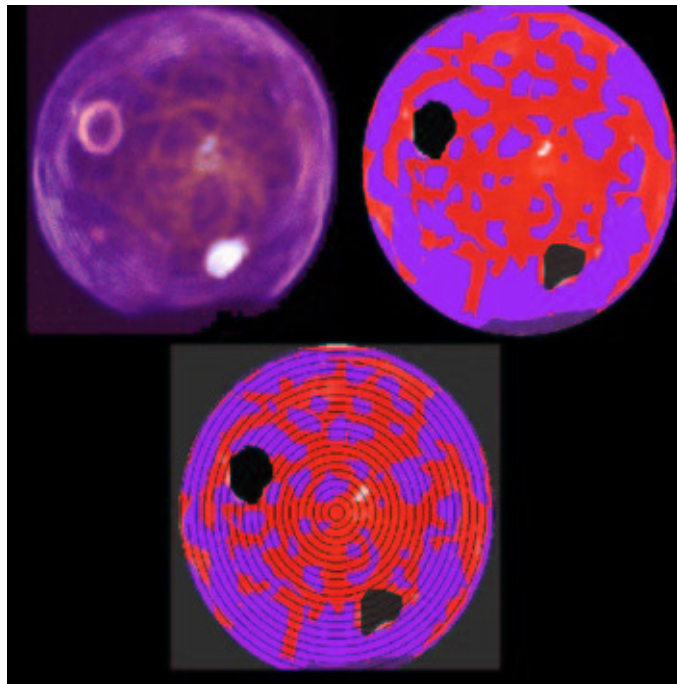


Abbildung 5.16: *Das konfokale Bild eines Vesikels einer Mischung von 50 % DLPC und 50 % DPPC. Es wird wie Abb. 5.15 bearbeitet. Die schwarzen Bereiche wurden nicht berücksichtigt. Im Ursprungsbild sind sie als eingeschlossene Vesikel zu erkennen.*

Für die 50:50-Mischungen ($\gamma_2 = 0,5$) berechnet man einen fluiden Anteil von $f = 0,68$ und einen Gelanteil von $1 - f = 0,32$. In der praktischen Auswertung allerdings findet sich ein Wert für die fluide Phase von $f = 0,57$ und $1 - f = 0,43$. Daraus folgend ergeben sich bei der Berechnung der Anteile der Lipide in den fluiden bzw. gelförmigen Phase unrealistische Werte, die grösser sind als 1 oder auch negativ.

Folgende Faktoren sind dafür wohl mitverantwortlich:

- Aufgrund der Schwierigkeiten und der geringen Reproduzierbarkeit der Präparation wurde nur bei wenigen Vesikeln die Phasentrennung dokumentiert, so dass keine statistische Auswertung der Ergebnisse möglich war.
- Bei den 50:50-Mischungen war es extrem schwierig, die einzelnen, sehr kleinen Bereiche der verschiedenen Phasen zu trennen. Durch die verschwommenen Übergänge wurde dies zusätzlich erschwert.
- Die unvollständige Zuordnung der Farbstoffe in die einzelnen Phasen (auch in der jeweils ungünstigeren Phase wird noch ein Signal detektiert).
- Die makroskopischen Phasen besitzen möglicherweise eine innere Struktur. Es bilden sich wahrscheinlich Mikro- bzw. Nanodomänen der jeweils anderen Phase aus.

Ohne eine weitere Untersuchung solcher zweikomponentigen Vesikelsysteme und der daraus resultierenden Möglichkeit der statistischen Auswertung von konfokalen Bildern, die an GUV's angefertigt werden, kann das vorgeschlagene Modell der Bestimmung der Anteile in den Phasen nicht verifiziert werden. Dies war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

5.5 Vergleich mit MC-Simulationen

Die experimentellen Ergebnisse sollen auch mit Monte-Carlo-Simulationen von H. Seeger verglichen werden [59], der parallel in der gleichen Arbeitsgruppe eine theoretische Arbeit angefertigt hat. Die Simulationen werden auf einer Matrix von 100 x 100 Lipidenketten durchgeführt. Die Wechselwirkungsparameter, die bei den dortigen Rechnungen eingesetzt werden, werden gewonnen, indem man die berechneten Kurven der Simulationen an das experimentell bestimmte c_p -Profil anfitet. Führt man die Simulation mit den so bestimmten Parametern durch, kann man davon ausgehen, dass die

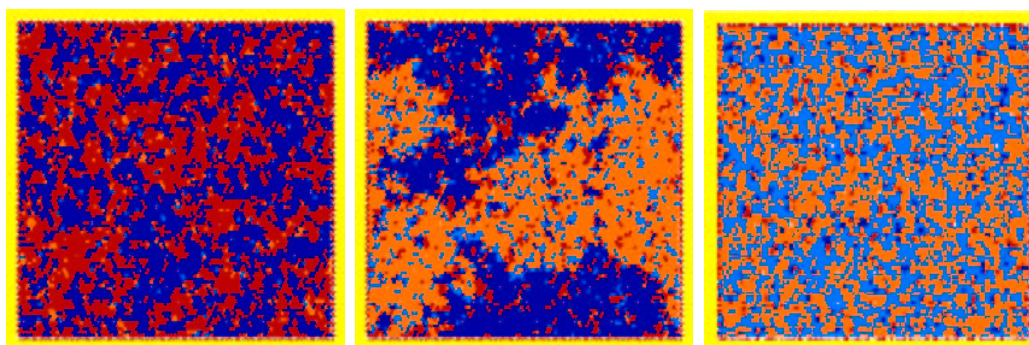


Abbildung 5.17: Die Schnappschüsse stammen von Monte-Carlo-Simulationen einer äquimolaren Mischung von DMPC und DSPC angefertigt von Seeger [59]. Die blauen Punkte entsprechen DSPC-Molekülen und die roten DMPC-Molekülen. Ist ein Molekül im gelförmigen Zustand, so wird ihm eine dunkle Farbe zugeordnet. Befindet es sich im fluiden Zustand, eine hellere Farbe. Links) Das System ist bei einer Temperatur von 290 K: es sind fast nur gelförmige Lipide vorhanden. Mitte) Das System befindet sich in der Phasenumwandlung (310 K): es bilden sich fluide und gelförmige Domänen aus, die kleine sog. Mikrodomänen der anderen Phase einschliessen. Rechts) Die Phasenumwandlung ist abgeschlossen (330 K): Die Lipide liegen im fluiden Zustand gut gemischt vor.

daraus gewonnenen Erkenntnisse Aufschluss auch über das reale, experimentelle Modellsystem geben. Abb. 5.17 zeigt drei Schnappschüsse einer Monte-Carlo-Simulation, die bei einer äquimolaren Mischung von DMPC und DSPC durchgeführt wurde. Die Bilder zeigen das System bei Temperaturen von 290 K (links), 310 K (mitte) und 330 K (rechts). Die roten Punkte entsprechen DMPC-Molekülen und die blauen den DSPC-Molekülen. Ein dunkler Farbton bedeutet, das Lipid befindet sich im gelförmigen Zustand und ein heller zeigt es im fluiden Zustand.

Im linken Bild befindet sich das gesamte System im gelförmigen Zustand, nur ein paar wenige Moleküle sind fluid. Im mittleren Bild befindet sich das System im Temperaturregime der Phasenumwandlung (302 K bis 318 K). Es bildet sich eine makroskopische Phasentrennung aus. Innerhalb dieser gelförmigen und fluiden Phasen befinden sich jedoch kleine Cluster der jeweils anderen Phase, sog. Mikrodomänen, die aus beiden Molekülsorten bestehen. Befindet man sich jenseits der Phasenumwandlungstemperaturen (rechtes Bild) so findet man das System wieder gut gemischt vorliegen. Nur noch wenige Moleküle befinden sich im gelförmigen Zustand.

Bei den experimentellen Aufnahmen wurde festgestellt, dass trotz einer ma-

makroskopischen Phasentrennung in den jeweils energetisch ungünstigeren Phasen immer noch genügend Farbstoffmoleküle vorhanden waren, so dass das Fluoreszenzsignal nicht auf Null absank. Der Nachweis der Mikrodomänen in den Simulationen könnte vielleicht diese experimentellen Beobachtungen erklären. Diese Mikrodomänen wurden auch in experimentellen Untersuchungen an Monofilmen mit Hilfe von AFM und Neutronenstreuung nachgewiesen [52, 24]. Auch die makroskopischen Phasen, die im Koexistenzregime vorliegen, bilden keine grossen, zusammenhängende Struktur, sondern zeigen bei der 50:50-Mischung auch eine perkolierende Struktur. Hier findet sich also auch eine Übereinstimmung von Experiment und Simulation. Ähnliche Ergebnisse gewannen Korlach et al. und Feigensohn et al. [36, 19]. Auch sie fanden bei ihren Untersuchungen an GUV's von der Zusammensetzung abhängige Strukturbildung. Um die Strukturen aus den Simulationen mit denen aus den Fluoreszenzbildern quantitativ vergleichen zu können, muss man allerdings dazu übergehen, an grösseren Systemen zu simulieren. Derzeit ist die Systemgrösse noch durch die Rechnerleistung begrenzt und deshalb ist man auf rein qualitativ geartete Aussagen begrenzt.

Kapitel 6

Ausblick

Die laterale Organisation von Membranen stellt seit langem eines der Hauptuntersuchungsgebiete in der Biophysik von Membranen dar [55, 34, 50]. Besondere Fragestellung ist dabei die Existenz von Lipiddomänen in allen möglichen Grössenordnungen (von nm bis zu mm) und der Beziehung zwischen Lipid-Domänenausbildung und der Konformation und den funktionalen Eigenschaften der eingebetteten Membranproteinen. Im thermodynamischen Gleichgewicht führt die Phasenseparation zur Ausbildung von makroskopischen Domänen, die in Grösse und Zusammensetzung fluktuieren können. Die Domänenbildung wurde mit AFM-Messungen und mit Hilfe von konfokaler Mikroskopie schon nachgewiesen [52, 24, 36, 19, 7].

Bei den AFM-Messungen wurde jedoch an Monofilmen gearbeitet, was nicht den biologischen Gegebenheiten entspricht. Darüberhinaus muss man bei Monofilmen immer in Betracht ziehen, dass Wechselwirkungen mit dem Substrat einen Einfluss auf die laterale Struktur des Films eine Rolle spielen können. Die Vorgehensweise, an freien Doppelschichten in Form von Giant Unilamellar Vesicles zu arbeiten ist dem vorzuziehen, da dies den natürlichen Systemen näher kommt.

Bei den Herstellungsweisen der GUV's ist im Rahmen dieser Arbeit festgestellt worden, dass sowohl die sanfte Hydratation als auch die Elektroformation an Platindrähten ihre Schwächen haben. Eine Möglichkeit der Verbesserung wäre, die Elektroformation zwischen leitend beschichteten Coverslips durchzuführen [5, 35]. Dies würde die Vorteile beider Methoden vereinen. Bei der Elektroformation bekommt man mit grosser Ausbeute unilamellare Vesikel und mit der sanften Hydratation sitzen die Vesikel in der Regel nach einer gewissen Wartezeit auf dem Coverslip, so dass man sie mit kurzreichweitigen Immersionsobjektiven untersuchen kann [8, 5].

Literaturverzeichnis

- [1] Akashi Ken-ichirou, Miyata, Itoh und Kinosita (1996). Preparation of Giant Liposomes in Physiological Conditions and Their Characterization under an Optical Microscope. *Biophysical Journal* **71** 3242-3250
- [2] Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1983) Molecular Biology of the Cell *Garland Publishing Inc.*
- [3] Angelova Miglena I., Dimitrov D. (1986). Liposome Electroformation *Faraday Discuss. Chem. Soc* **81** 303-311
- [4] Dimitrov D.S., Angelova M.I.(1987). Lipid Swelling and Liposome Formation on Solid Surfaces in External Electric Fields. *Progress in Colloid & Polymer Science* **73** 48-56
- [5] Angelova M.I., Soléau S., Méléard P., Faucon J.F., Bothorel P. (1992), Preparation of Giant Vesicles by External AC Electric Fields. Kinetics and Applications. *Progress in Colloid & Polymer Science* **89** 127-131
- [6] Bagatolli L. A., Gratton E.(1999). Two Photon Fluorescence Microscopy Observaton of Shape Changes at the Phase Transition in Phospholipid Giant Unilamellar Vesicles. *Biophysical Journal* **77** 2090-2101
- [7] Bagatolli L. A., Gratton E.(2000). Two Photon Microscopy of Coexisting Lipid Domains in Giant Unilamellar Vesicles of Binary Phospholipid Mixtures. *Biophysical Journal* **78** 290-305
- [8] Bagatolli L. A., Parasassi T., Gratton E.(2001), Giant Phospolipid Vesicles: Comparison among the whole Lipid Sample Characteristics using different Preparation Methods. A Two-Photon Fluorescence Microscopy Study.
- [9] Bangham A.D., Standish M. M., Watkins J.C.(1965) *Journal of Molekular Biology* **13** 238
- [10] Bangham A.D.(1986) Breathing Made Easy. *New Scientist* **85** 408-410

- [11] Brown D.A., London E.(1997) Structure of detergent-resistant membrane domains: Does phase separation occur in biological membranes? *Biochem. Biophys. Res. Commun* **240** 1-7
- [12] Brown D.A., Rose J.(1992) Sorting of GPI-anchored Proteins to glycolipid enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68** 533-544
- [13] Bunde A., Havlin S. (1996) Fractals and Disordered Systems *Springer Verlag* Second Edition **2,3**
- [14] Demtröder W. (1995) Experimentalphysik 2: Elektrizität und Optik *Springer-Lehrbuch* **11** 326
- [15] Dietrich C., Bagatolli L.A., Volovyk, Thompson, Levi, Jacobson, Gratton (2001) Lipid Rafts Reconstituted in Model Membranes. *Biophysical Journal* **80** 1417-1428
- [16] Döbereiner H.G. (2000). Properties of Giant Vesicles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **5** 256-263
- [17] Evans E.A. (1974) *Biophysical Journal* **14** 923
- [18] Fahsel S., Pospiech E.-M., Zein M., Hazlet T.L., Gratton E., Winter R. (2002). Modulation of Concentration Fluctuations in Phase-Separated Lipid Membranes by Polypeptide Insertion. *eingereicht*
- [19] Feigenson Gerald W., Jeffrey T. Buboltz(2001). Ternary Phase Diagram of Dipalmitoyl-PC/Dilauroyl-PC/Cholesterol: Nanoscopic Domain Formation Driven by Cholesterol. *Biophysical Journal* **80** 2775-2788
- [20] Fließbach T., (1995) Statistische Physik *Spektrum Verlag* **35**
- [21] Fließbach T., (1995) Statistische Physik *Spektrum Verlag* **39**
- [22] Gennis R.B., (1989) Biomembranes. Molecular Structure and Function *Springer Verlag* New York
- [23] Glauber R.J. (1963) Time-Dependent Statistics of the Ising Model *Journal of Mathematical Physics* **4** 294-307
- [24] Gliss C., Clausen-Schaumann H., Günther R., Odenbach S., Randl O., Bayerl T.M. (1998) Direct Detection of Domains in Phospholipid Bilayers by Grazing Incidence Diffraction of Neutrons and Atomic Force Microscopy *Biophysical Journal* **74** 2443-2450

- [25] Grabitz P.(2001) Dynamische Vorgänge in Phospholipidmembranen: Relaxationsprozesse und Viskoelastizität in der Nähe der Schmelzumwandlung. *Diplomarbeit*, Georg-August-Universität Göttingen
- [26] Harder T., Scheiffele P., Verkade P., Simons K. (1998) Lipid Domain Structure of the Plasma Membrane Revealed by Patching of Membrane Components *Journal of Cell Biology* **141** 929-942
- [27] Heimburg T.(2000) A Model for the Lipid Pretransition: Coupling of Ripple Formation with the Chain-Melting Transition. *Biophysical Journal* **78** 1154-1165
- [28] Hönig D. (1994) Molekular organisierte Filme: Laterale Struktur und optische Eigenschaften *Dissertation*
- [29] Ivanova V., Makarov I., Schäffer T.E., Heimburg T.
The clustering of Gramicidin A in lipid membranes close to the chain melting transition: How to analyze heat capacity profiles in the presence of peptides.
eingereicht
- [30] Helfrich W., Deuling H.J. (1976) *Journal Physique* **37** 1335
- [31] Helfrich W., Boroske M., Elwenspoek M.(1981) *Biophysical Journal* **34** 95
- [32] Ising, (1925) Anwendung für Ferromagnetismus *Zeitschrift für Physik* **31** 253
- [33] Ivanova V. (2000) Theoretical and experimental study of protein-lipid interactions *Dissertation* **3**
- [34] Jørgensen K., Mouritsen O.G. (1995) Phase Separation Dynamics and Lateral Organization of Two-Component Lipid Membranes. *Biophysical Journal* **75** 942-953
- [35] Kahya N., Pecher E.I., de Boeij W.P., Wiersma D.A., Hoekstra D. (2001) Reconstitution of Membrane Proteins into Giant Unilamellar Vesicles via Peptide-Induced Fusion *Biophysical Journal* **81** 1464-1474
- [36] Korlach J., Schille P., Webb W.W., (1999) Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** 8461-8466

- [37] Laffan, J. und Firshein, W., (1987). DNA Replication by a DNA-Membrane Complex Extracted from *Bacillus subtilis*: Site of Initiation In Vitro and Initiation Potential of Subcomplexes. *Journal of Bacteriology*, **169** 2819-2827
- [38] Lasic D.D. (1988). The Mechanism of Vesicle Formation. *Biochemical Journal* **256** 1-11
- [39] Lasic D.D. (1995) Applications of Liposomes *Handbook of Biological Physics* **10** 491-519
- [40] Lee A.G., (1977). Lipid Phase Transition and Phase Diagrams II. Mixtures involving Lipids. *Biochimica et Biophysica Acta* **472** 285-344
- [41] Lee A.G., (1977). Lipid Phase Transition and Phase Diagrams I. Lipid Phase Transitions *Biochimica et Biophysica Acta* **472** 237-281
- [42] Lehmann O.(1911). Die neue Welt der flüssigen Kristalle. *Akademische Verlagsgesellschaft*
- [43] Lehmann O., (1913) *Sitzungsbericht der Heielerger Akademie der Wissenschaften, Mat-nat Kl Abt. A, Abh.* 13
- [44] Lipowsky et al(1990) *Europhys. Letters* **13** 639
- [45] MacDonald R.C. et al., (1991) Small-Volume Extrusion Apparatus for Preparation of Large Unilamellar Vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta* **1061** 279-303
- [46] Mathivet L., Cribier S., Devaux P.F. (1996) Shape Change and Physical Properties of Giant Phospholipid Vesicles Prepared in the Presence of an AC Electric Field. *Biophysical Journal* **70** 1112-1121
- [47] Méléard P., Gerbeaud C., Bardusco P., Jeandaine N., Mitov M.D., Fernandez-Puente L. (1998) Mechanical Properties of Model Membranes Studied from Shape Transformation of Giant Vesicles. *Biochimie* **80** 401-413
- [48] Menger F.M., Keiper J.S.(1998) Chemistry and Physics of Giant Vesicles as Biomembrane Models. *Current Opinion in Chemical Biology* **2** 726-732
- [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] Mouritsen O.G., Bloom M.(1984) Mattres Model of Lipid-Protein Interactions in Membranes. *Biophysical Journal* **46** 141-153
- [51] Mouritsen O.G.(1991) *Chemistry and Physics of Lipids* **57** 179-194
- [52] Nielsen L.K., Vishnyakov A., Jørgensen K., Bjørnolm T., Mouritsen O.G. (2000) Nanometre-scale structure of fluid lipid membranes *J. Phys.: Condensed Matter* **12** A309-A314
- [53] Oberholzer T., Fischer A.(1998) Microinjection of Macromolecules in Giant Vesicles Prepared by Electroformation. *Giant Vesicles* **21** 285-295
- [54] Papahadjopoulos D., Watkins J.C.(1967) *Biochim. Biophys. Acta* **135** 639
- [55] Sackmann E.(1995) Physical Basis of Self-Organization and Function of Membranes: Physics of Vesicles. *Handbook of Biological Physics* **1** 1-63
- [56] Sakutai L., Suzuki T. Sakutai S., (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **985** 101
- [57] Saxton M. J. (2001) Anomalous Subdiffusion in Fluorescence Photobleaching Recovery: A Monte Carlo Study. *Biophysical Journal* **81** 2226-2240
- [58] Schneider M.F. (1999) Reversible Ausbildung eines Membrannetzwerkes im Schmelzregime von Phospholipiden. *Diplomarbeit*, Georg-August-Universität Göttingen
- [59] Seeger H. (2002) Theoretische und Experimentelle Beschreibung von Diffusionsprozessen in einem zweikomponentigen Lipidsystem. *Diplomarbeit*, Georg-August-Universität Göttingen
- [60] Simons K., Ikonen E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387** 569-572
- [61] Singer, S.J. und Nicolson, G.L.(1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175** 720-731
- [62] Mabrey S., Sturtevant J.M. (1976), Investigation of Phase Transitions of Lipids and Lipid Mixtures by High Sensivity Differential Scanning Calorimetry. *Biochemistry* **73** 3862-3866
- [63] Sugár István P., Thompson T.E., Biltonen R.L., (1999) Monte Carlo Simulation of Two-Component Bilayers: DMPC-DSPC Mixtures *Biophysical Journal* **76** 2099-2110

- [64] Sugár István P., Michonova-Alexova E. und Chong P.(2001). Geometrical Properties of Gel and Fluid Clusters in DMPC/DSPC Bilayers: Monte Carlo Simulation Approach Using a Two-State Model. *Biophysical Journal* **81** 2425-2441