

# Thermodynamische und strukturelle Untersuchungen an künstlichen und biologischen Membranen

Grundlegende Eigenschaften und der Einfluss kleiner Moleküle

Diplomarbeit

vorgelegt von

Denis Pollakowski

aus Braunschweig

angefertigt an der

Fakultät für Physik  
der

Georg-August-Universität zu Göttingen

2004



„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muß sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das Möglichste getan hat.“

J. W. Goethe, Italienische Reise  
Caserta, den 16. März 1787



# Danksagung

Dies soll nicht die übliche Pflichtübung sein, sondern ist wirkliches Bedürfnis.

Die vorliegende Arbeit ist in der Arbeitsgruppe „Biophysik und Thermodynamik von Membranen“ von Prof. Thomas Heimbürg am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen und am Niels-Bohr-Institut in Kopenhagen entstanden. Die Betreuung von Thomas Heimbürg war auf allen Ebenen, von der rein fachlichen bis zur persönlichen, so wie ich sie mir besser nicht hätte vorstellen können.

Prof. Werner Lauterborn hat diese Arbeit von Seiten der Universität Göttingen betreut. Nicht allein deshalb habe ich ihn immer als Lichtblick an dieser Institution empfunden.

Die Mitglieder meiner Arbeitsgruppe haben für eine angenehme Atmosphäre gesorgt, Heiko Seeger, Matthias Fidorra, Ivan Makarov, Agnieszka Hac, Vitaliy Oliynik und den ehemaligen Mitgliedern Thomas Schlötzer und Peter Grabitz sei dafür ganz herzlich gedankt. Insbesondere Heiko ist das gute Herz unserer Gruppe, zu dem man immer gehen kann, wenn man ein (Computer-) Problem hat. Er hat auch noch in letzter Minute Korrektur gelesen, als meine müden Finger sich mehr und mehr Fehler beim Tippen erlaubten.

Dr. Christian Monnerjahn, Ulrike Schulz und Kerstin von Roden danke ich dafür, dass sie mich immer mit *Escherichia coli* versorgt haben.

Fabiana war mir Halt und Stütze über die ganze Zeit, ohne sie wäre ich nicht der, der ich bin.

Auch meinen Eltern möchte ich danken dafür, dass sie immer zu mir gestanden haben und in schweren Zeiten nie aufgehört haben, an mich zu glauben.

Göttingen und Kopenhagen, im Januar 2004  
Denis Pollakowski



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einführung</b>	<b>2</b>
1.1	Membranen in biologischen Systemen . . . . .	2
1.2	Die Hauptbestandteile biologischer Membranen . . . . .	5
1.2.1	Lipide . . . . .	5
1.2.2	Proteine . . . . .	16
1.2.3	Kohlenhydrate . . . . .	18
1.3	Anordnung und Zusammenspiel der Membranbestandteile - Membranmodelle . . . . .	18
1.4	Motivation und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit . . . . .	24
<b>2</b>	<b>Methoden und Materialien</b>	<b>26</b>
2.1	Differentialkalorimetrie . . . . .	26
2.2	Viskosimetrie . . . . .	31
2.3	Materialien und Probenpräparation . . . . .	37
<b>3</b>	<b>Die untersuchten Systeme:</b>	
	<b>Einführung - Ergebnisse - Diskussion</b>	<b>41</b>
3.1	Der Einfluss kleiner Moleküle auf das Phasenverhalten von Lipiden . . . . .	41
3.1.1	Neurotransmitter . . . . .	41
3.1.2	Koffein . . . . .	48
3.1.3	Fluoxetin („Prozac“) . . . . .	50
3.1.4	Hexylglycerol . . . . .	54
3.1.5	Losartan . . . . .	57
3.2	Umwandlungen in biologischen Membranen . . . . .	66
3.2.1	Escherichia coli . . . . .	66
3.2.2	Lungensurfactant . . . . .	73
3.2.3	Sphingomyelin . . . . .	74
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick: „Der große Bogen“</b>	<b>79</b>

# Kapitel 1

## Einführung

### 1.1 Membranen in biologischen Systemen

Die fundamentale Einheit aller Lebewesen ist die Zelle. Sie ist räumlich definiert durch ihre Zytoplasmamembran. Auch die inneren Funktionseinheiten der Zelle (die Organellen) sind weitestgehend von Membranen umgeben. So können die vielfältigen zellulären Prozesse voneinander getrennt werden. Membranen erzeugen also Funktionseinheiten des Lebens. Damit definiert eine Membran auch immer eine Innen- und eine Außenseite. Sie bestimmt auch sämtliche Kommunikation, die zwischen diesen beiden Seiten abläuft. Diese kann auf direktem Wege mittels des Transports von Ionen oder Molekülen durch die Membran hindurch erfolgen oder indirekt durch Konformationsänderungen in bestimmten Membranbestandteilen. Die Abgrenzung unterschiedlicher Bereiche ermöglicht auch die Realisierung von z.B. unterschiedlichen Ionenkonzentrationen oder pH-Werten in unterschiedlichen Teilen der Zelle bzw. im Zytoplasma und dem extrazellulären Raum. Bei kontrollierter Permeabilität der Membran erlaubt dies die Aufrechterhaltung von elektrochemischen Gradienten, was beispielsweise die Voraussetzung für die Erzeugung von Aktionspotentialen in Neuronen ist.

Die hauptsächlichen Bestandteile einer Membran sind Lipide, Proteine und Kohlenhydrate. Letztere sind in der Regel an Lipide (Glykolipide) oder Proteine (Glykoproteine) auf der extrazellulären Seite der Membran gebunden und ragen dabei oft weit über die eigentliche Membranebene hinaus. In dieser Form können sie große netzartige Strukturen bilden (die sogenannte Glykokalix bzw. die extrazelluläre Matrix, siehe Abbildung 1.1). Auf der Innenseite der Zytoplasmamembran von eukaryotischen Zellen (also solchen mit einem Zellkern) befindet sich das Zytoskelett, eine filamentartige Struktur, die hauptsächlich aus Proteinen aufgebaut ist, meist das gesamte Zytoplasma



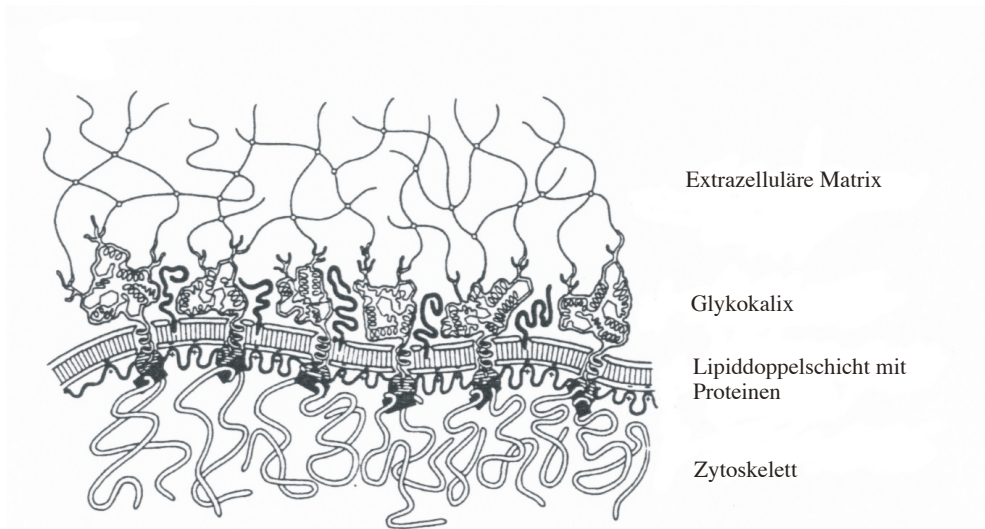


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung (Querschnitt) einer Zytoplasmamembran. Man erkennt als zentralen Teil die Lipiddoppelschicht mit eingelagerten Proteinen, die Glykokalix, die sich daran anschließend auf der extrazellulären Seite befindet, und als große netzartige Strukturen die extrazelluläre Matrix und das Zytoskelett. Die Lipiddoppelschicht und die Glykokalix sind auf dieser Darstellung im Vergleich zu den makromolekularen Netzwerken in dreihundertfacher Vergrößerung dargestellt. Das Zytoskelett existiert nur in eukaryotischen Zellen. Die extrazelluläre Matrix findet man ausschließlich in tierischen Zellen, in pflanzlichen befindet sich an ihrer Stelle die steife Zellwand. (Abbildung nach E. Sackmann, Technische Universität München)

durchzieht und so Einfluss auf die Form der Zelle nimmt und auch vielfältige Funktionen im intrazellulären Transport hat.

Zellen können Durchmesser bis  $100\ \mu\text{m}$  erreichen (tierische in der Regel  $10 - 30\ \mu\text{m}$ , pflanzliche  $10 - 100\ \mu\text{m}$ , Bakterien nur wenige  $\mu\text{m}$  [1]).<sup>1</sup> Die genaue Zusammensetzung einer jeden Membran ist einzigartig und spiegelt ihre jeweilige besondere Funktion im Organ bzw. Organismus wieder. Bei aller individueller Vielfalt sind die strukturellen Grundprinzipien allerdings immer die gleichen, dies gilt für tierische Zellen genauso wie für pflanzliche und ist auch für Einzeller wie Bakterien gültig.

Die Lipide von Zellmembranen sind aufgrund des hydrophoben Effekts

<sup>1</sup>Die Axone von Motorneuronen können sich allerdings über die gesamte Länge des Rückenmarks erstrecken und so Längen von über einem Meter erreichen.

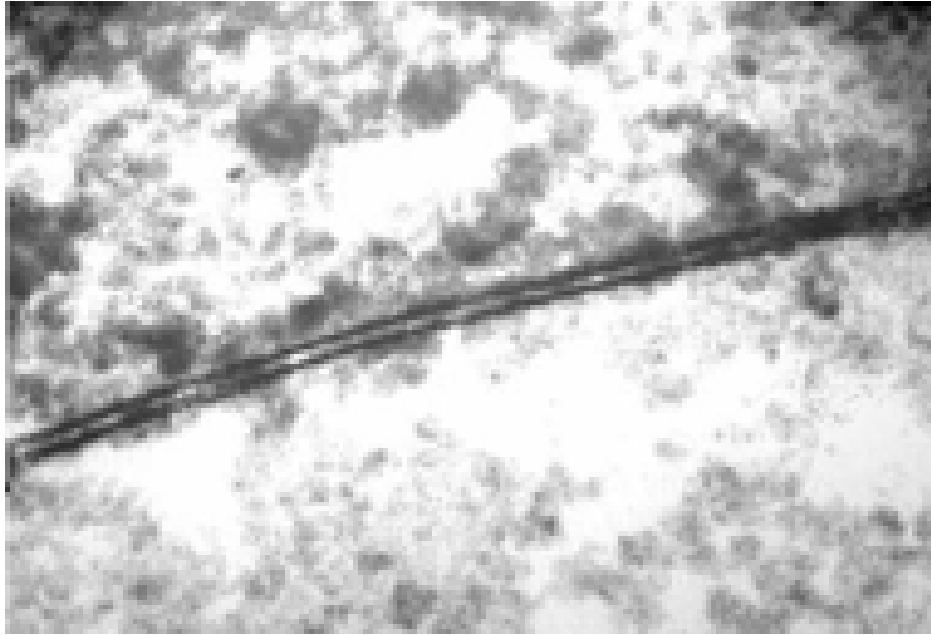


Abbildung 1.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Zellmembran (der Alge *Chara corallina*), auf der klar die Lipiddoppelschicht zu erkennen ist. Die zwei dunklen Streifen stellen die polaren Kopfgruppen der Lipide dar, der mittlere helle Bereich zeigt die unpolaren, hydrophoben Fettsäureketten. (Aufnahme von Coster und Kaplin 1973, University of New South Wales in Sydney, so aber erst in [2] gezeigt)

(mehr dazu im nächsten Abschnitt) überwiegend in einer Doppelschicht (Bilayer) angeordnet, was auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen deutlich zu erkennen ist (siehe Abbildung 1.2). Diese hat einen Durchmesser von nur 4 bis 5 nm (mit den eingelagerten Proteinen, die zum Teil über die Lipiddoppelschicht hinausragen wächst dieser aber auf insgesamt 6 bis 10 nm). Der Lipidgehalt der meisten Zellen liegt zwischen 40 und 60 Massenprozent, kann aber in Einzelfällen auch Werte von nur 25 (innere Membran von Mitochondrien) oder auch bis zu 75 Massenprozent (Myelinschicht der Axone von Neuronen) erreichen. Die Lipiddoppelschicht bedingt den mechanischen Zusammenhalt der Zelle und ist daher hauptsächliches strukturelles Element einer jeden Membran. Diese kurze reduktionistische Betrachtung unterstreicht bereits die Bedeutung der Lipiddoppelschicht, deren vielfältige Eigenschaften Thema der vorliegenden Arbeit ist.

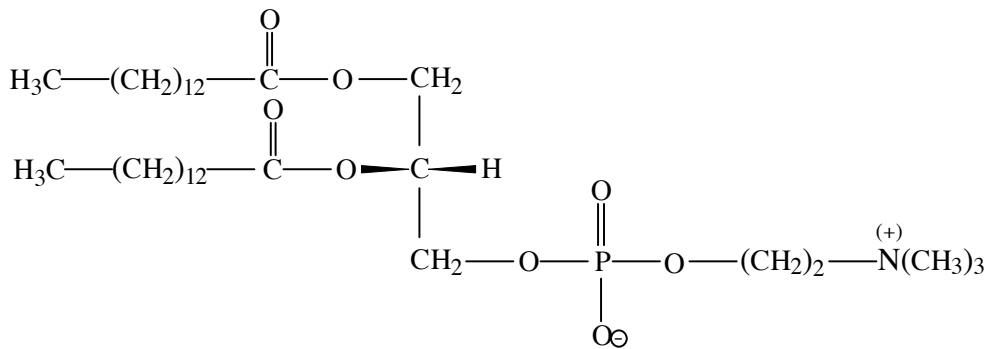


Abbildung 1.3: Strukturformel des Phospholipids Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC), das für die meisten Experimente in dieser Arbeit verwendet wurde. Es besteht aus zwei gesättigten Fettsäureketten mit je 14 C-Atomen, dem Glycerolverbindungsglied und der Phosphocholinkopfgruppe.

## 1.2 Die Hauptbestandteile biologischer Membranen

### 1.2.1 Lipide

#### Aufbau und Vielfalt von Lipiden

Trotz ihrer weiten Verbreitung und immensen biologischen Bedeutung gibt es keine allgemein akzeptierte Definition bzw. scharfe Abgrenzung von anderen Stoffen für die Molekülklasse der Lipide. Für Aufbau und Funktion von biologischen Membranen kann man allerdings zwei Hauptklassen als die maßgeblichen ansehen, dies sind in erster Linie die Phospholipide, die in den meisten Membranen den weitaus größten Anteil ausmachen, und die Sterole.

**Phospholipide** Die in Membranen am häufigsten vorkommenden Lipide gehören zur Klasse der Phospholipide. Diese bestehen aus einer polaren Kopfgruppe, die eine Phosphatgruppe enthält, sowie zwei unpolaren Fettsäureketten (es gibt aber auch einige wenige Phospholipide mit nur einer Fettsäurekette). Dieser grundsätzliche Aufbau aus einem polaren und somit hydrophilen (wasseranziehenden) Teil und einem unpolaren und dadurch hydrophoben (wasserabstoßenden) Teil ist die kennzeichnende Eigenschaft eines jeden Phospholipids und bedingt die im folgenden Abschnitt besprochene Selbstaggregation von Lipiden in Wasser. Diese Molekülstruktur wird amphiphil genannt (manchmal auch amphipatisch). Die Kopfgruppe und die

Fettsäureketten sind im Fall der Phosphoglyceride (auch Glycerophospholipide genannt) über ein Glycerolmolekül miteinander verbunden. Trotz dieses in seinen Grundsätzen feststehenden Aufbaus können Phosphoglyceride in einer enormen Vielfalt auftreten. Größe und Ladung der Kopfgruppe können sich unterscheiden. Phosphocholine (PC), Phosphoethanolamine (PE) und Phosphoglycerole sind weit verbreitete Beispiele. Die ersten beiden sind dabei zwitterionisch, Phosphoglycerol ist negativ geladen. Die Fettsäureketten lassen noch mehr Variationsmöglichkeiten zu. Die Anzahl der Kohlenstoffatome in ihnen kann in biologischen Membranen üblicherweise zwischen 12 und 26 schwanken. Die Fettsäureketten können dabei mitunter (einfach oder mehrfach) ungesättigt sein, d.h. innerhalb der Kohlenwasserstoffketten treten Doppelbindungen auf. Diese können wiederum nach Anzahl und auch Position variieren (zwischen 0 und 6 Doppelbindungen sind üblich). Die Natur schöpft diese Variationsmöglichkeiten aus, viele Zellmembranen weisen weit über hundert unterschiedliche Lipidsorten auf [1]. Gängige Membranmodelle (siehe Abschnitt 1.3) haben Probleme, die Bedeutung bzw. Ursache dieser Vielfalt zu erklären.

Die am besten studierte Klasse der Lipide ist sicherlich die der Glycerophosphocholine, die auch Phosphatidylcholine oder umgangssprachlich Lecithin genannt werden. Die Strukturformel eines solchen Moleküls ist in Abbildung 1.3 gezeigt. Es handelt sich dabei um Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) mit 14 Kohlenstoffatomen in einer Kette, das für die meisten Untersuchungen an künstlichen Lipidmembranen in dieser Arbeit benutzt wurde. Ein weiterer sehr gebräuchlicher Vertreter dieser Gruppe ist Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) mit 16 Kohlenstoffatomen pro Kette, das auch Verwendung für eine Versuchsreihe fand.

Außer den Phosphoglyceriden kommt den Sphingophospholipiden in biologischen Membranen noch eine große Bedeutung zu. Bei ihnen steht an der Stelle des Glycerols ein Sphingosinmolekül als Brückenbaustein, das selbst schon eine lange Kohlenwasserstoffkette hat (die in Abbildung 1.4 nach rechts zeigende Kette). Die oben beschriebenen Kopfgruppen können auch hier auftreten, wobei das Phosphocholin eine noch bedeutendere Rolle spielt. Mit dieser Kopfgruppe wird das sogenannte Sphingomyelin gebildet. Die Myelinscheide der Axone von Nervenzellen ist beispielsweise zum größten Teil aus dieser Lipidsorte aufgebaut. Anstelle des in der Strukturformel gezeigten R (für Restgruppe) können unterschiedliche Kohlenwasserstoffketten vorkommen.

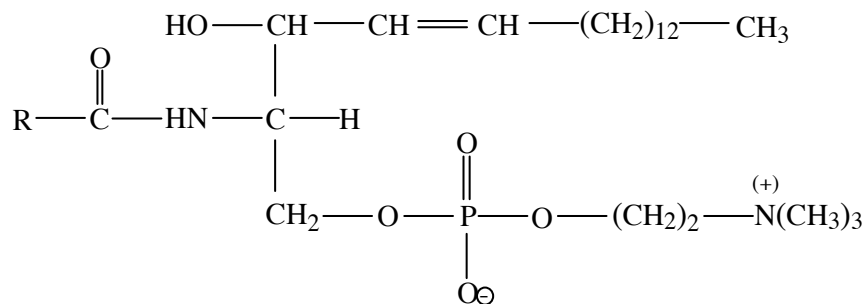


Abbildung 1.4: In der Struktur der Sphingophospholipide steht an der Stelle des Glycerols ein Sphingosin. Der wichtigste Vertreter dieser Lipidklasse ist das hier gezeigte Sphingomyelin mit einer Phosphocholinkopfgruppe. Eine Variation dieses Lipids kann nur noch über die eine mit R bezeichnete Kohlenwasserstoffkette erfolgen.

**Sterole** Sterole bilden die zweite wichtige Lipidkomponente in biologischen Membranen. Hierbei ist für tierische Zellen fast ausschließlich Cholesterol<sup>2</sup> von Bedeutung, in Pflanzen hingegen hauptsächlich Ergosterol (das einen ähnlichen Aufbau besitzt, hier aber nicht weiter betrachtet werden soll). Cholesterol hat mit den eben besprochenen Phospholipiden wenig gemeinsam (siehe die Strukturformel in Abbildung 1.5). Es besteht hauptsächlich aus vier verbundenen Kohlenwasserstoffringen und besitzt lediglich eine OH - Gruppe. Sein amphiphiler Charakter ist daher nur schwach ausgeprägt und es tendiert dazu, sich hauptsächlich im hydrophoben Bereich der Membran zu positionieren. Die Menge an Cholesterol in Membranen kann sehr unterschiedlich sein, in manchen Plasmamembranen kann auf je ein Phospholipid ein Cholesterolmolekül kommen. Die Membranen der meisten Bakterien (wie etwa das in dieser Arbeit untersuchte *Escherichia coli*)<sup>3</sup> enthalten hingegen kein Cholesterol.

Cholesterol ist auch die Ausgangsstufe für die Synthese vieler Hormone.

<sup>2</sup>In den letzten Jahren tendiert man im Rahmen der Internationalisierung der Nomenklatur auch in der deutschen Fachsprache dazu, die Bezeichnung Cholesterol anstelle von Cholesterin zu verwenden.

<sup>3</sup>Alle prokaryotischen Zellen (das sind solche, die keinen Zellkern sowie keine intrazellulären Membranen besitzen, dazu gehören auch sämtliche Bakterien) sind nicht in der Lage, Cholesterol zu synthetisieren. Im Allgemeinen hat dies zur Folge, dass Cholesterol in ihrer Zellmembran auch nicht vorkommt. Die einzige Ausnahme bilden die sogenannten Mycoplasma-Bakterien. Sie benötigen zum Wachstum Cholesterol in ihrer Umgebung, das sie in ihre Membran mit einbauen [3][4]. Die überragende Mehrheit der Bakterien gehört allerdings nicht zu dieser Klasse.

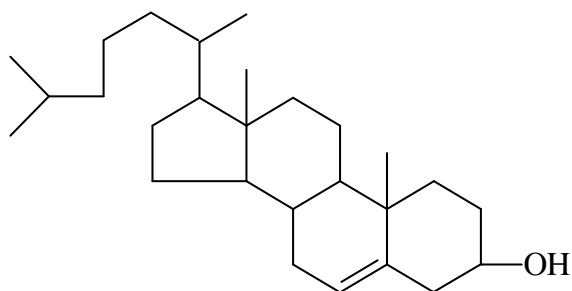


Abbildung 1.5: Die Abbildung zeigt die Strukturformel von Cholesterol. Kernelement sind dabei vier verbundene Kohlenwasserstoffringe. Darin schließt sich eine Kohlenwasserstoffkette an. Cholesterol verfügt über lediglich eine OH-Gruppe, weshalb es nur einen sehr schwach ausgeprägten amphiphilen Charakter hat.  $\text{CH}_n$ -Gruppen sind in dieser Darstellung nicht explizit wiedergegeben.

### Selbstaggregation von Lipidmolekülen in Wasser

Aufgrund ihres amphiphilen Charakters neigen Lipide in Wasser dazu, Aggregate zu bilden. Die Ursache dafür liegt im sogenannten hydrophoben Effekt.<sup>4</sup> Die Konzentration, bei der sich erste Aggregate ausbilden, die sogenannte kritische Mizellenkonzentration (*critical micelle concentration* CMC) liegt für die meisten Lipide in der Größenordnung von  $10^{-11}$  bis  $10^{-10} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ . Man kann Lipide also für praktische Belange als in Wasser unlöslich ansehen.

Welche Formen (siehe Abbildung 1.6) bei dieser Selbstaggregation ausgebildet werden, ist abhängig von Kopf- und Fettsäuregruppe des jeweiligen

<sup>4</sup>Unter dem hydrophoben Effekt versteht man allgemein das Phänomen, dass unpolare Moleküle wie beispielsweise Kohlenwasserstoffe in Wasser dazu neigen, sich zu größeren Aggregaten zusammenzulagern. Bringt man ein solches Kohlenwasserstoffmolekül wie etwa als einfachstes Beispiel Methan ( $\text{CH}_4$ ) in Wasser, so orientieren sich die Wassermoleküle unter Bildung einer maximalen Zahl von Wasserstoffbrückenbindungen untereinander um dieses unpolare Teilchen. Es entsteht eine Hydrathülle. Die Ausbildung dieser geordneten Wasserstruktur ist mit einer Entropieabnahme des Wassers verbunden und damit ein „ungünstiger“ Prozess. Enthalpische Effekte sind hier von untergeordneter Bedeutung. Das Einbringen eines weiteren Methanmoleküls führt nun nicht dazu, dass sich ein zweiter solcher „Wasserkäfig“ unabhängig vom ersten bildet (was eine erneute Entropieabnahme gleicher Größe bedeutete), sondern die beiden unpolaren Teilchen lagern sich in einem einzigen „Wasserkäfig“ zusammen. Dem hydrophoben Effekt liegt keine neue Bindungsart zugrunde, er ist, wie Frank und Evans erstmals 1945 zeigten [5], im Wesentlichen entropischen Ursprungs. Für eine ausführliche Darstellung sei auf die bekannte Monographie Tanfords [6] verwiesen.

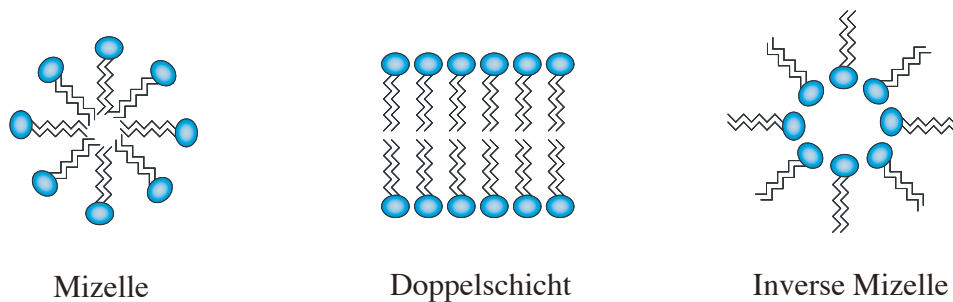


Abbildung 1.6: Die Abbildung zeigt die unterschiedlichen Aggregate, die Lipide in Wasser aufgrund des hydrophoben Effekts ausbilden. Bei niedrigen Konzentrationen bzw. bei Lipiden mit nur einer Fettsäurekette pro Molekül bilden sich Kugelmizellen. Lipide mit zwei (gesättigten) Fettsäureketten bilden bei höheren Konzentrationen Doppelschichten, üblicherweise in der Form eines Vesikels. Wenn in den Fettsäuren Doppelbindungen auftreten, so aggregieren die Lipide zu inversen Mizellen.

Lipids (was die Molekülgeometrie bestimmt) und insbesondere von der Konzentration.<sup>5</sup> Bei geringen Konzentrationen bilden sich Kugelmizellen, das sind kugelförmige Aggregate, bei denen die hydrophilen Kopfgruppen nach außen und die hydrophoben Fettsäureketten nach innen zeigen, so dass sie keinen Kontakt mit dem Wasser haben. Lipide, die nur über eine Fettsäurekette verfügen, bilden diese Aggregatform auch bei höheren Konzentrationen, da sie eine kegelförmige Molekülform besitzen (die einzelne Fettsäurekette bildet dabei die Spitze des Kegels) und so diese Kugelgestalt bevorzugt wird. Lipide mit zwei (gesättigten) Fettsäureketten tendieren bei höheren Konzentrationen hingegen dazu, Doppelschichten auszubilden. Diese können planar sein, haben in der Regel aber die Gestalt von Vesikeln. Dies ist die bevorzugte Form aller „gängigen“ Phospholipide und dominiert daher in biologischen Membranen wie auch in den hier untersuchten Modellsystemen. Wenn innerhalb der Fettsäureketten Doppelbindungen auftreten (also ungesättigte Fettsäuren vorliegen), so hat das zur Folge, dass sich die beiden Ketten „auseinanderspreizen“. Das Lipidmolekül hat dann die Form eines Kegelstumpfes (die Fettsäureketten bilden das breite Ende). Dieser erhöhte Platzbedarf erzeugt die Struktur einer inversen Mizelle, die langgestreckte Zylinder bilden, die sich wiederum übereinanderlagern, um den Kontakt der Ketten mit dem Wasser zu minimieren. Diese Aggregate bezeichnet man auch als hexagonale

<sup>5</sup>Temperatur, Druck, Ionenkonzentration und pH-Wert können für einige Lipide auch noch mitbestimmende Parameter sein.

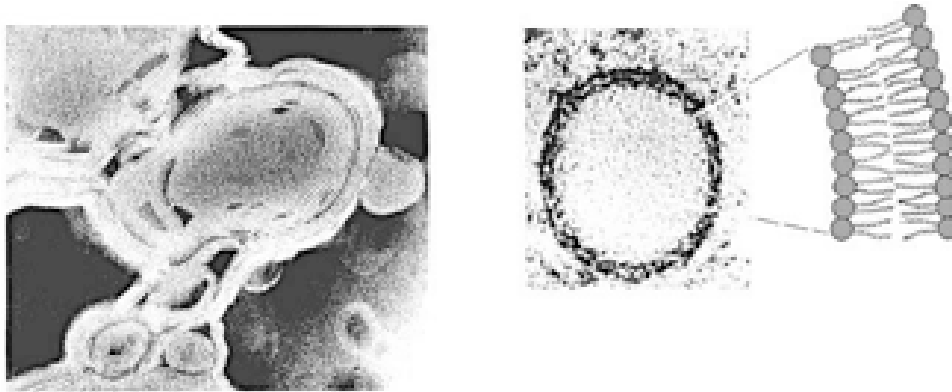


Abbildung 1.7: Auf der linken Fotografie ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines multilamellaren Phospholipidvesikels zu sehen, bei dem jede erkennbare Schicht eine Lipiddoppelschicht ist (nach Bangham, Cambridge University). Die rechte Fotografie zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines unilamellaren Vesikels, das nur aus einer Lipiddoppelschicht besteht, wie in der angrenzenden Grafik gezeigt ist (nach Stoekenius, University of California at San Francisco).

Phase vom Typ II, da die Zylinder in einem hexagonalen Muster angeordnet sind. Bei der hexagonalen Phase von Typ I sind die Fettsäureketten wie bei einer Kugelmizelle nach innen orientiert, allerdings werden jetzt auch Zylinder geformt. Die mögliche Bedeutung solcher hexagonaler Phasen für die Funktion von biologischen Membranen wird gegenwärtig diskutiert [7].

Wenn man Lipide in Pulverform in einer Konzentration in der Größenordnung von einigen mmol/l zu Wasser gibt, wie man es im Labor zur Probenherstellung praktiziert, bilden sich Vesikel aus Lipiddoppelschichten, wobei mehrere dieser Doppelschichten unmittelbar übereinander liegen, es entstehen sogenannte multilamellare Vesikel (MLVs). Daraus kann man mittels verschiedener Techniken, die im Abschnitt über die Präparation der Proben beschrieben werden, unilamellare Vesikel erzeugen (siehe Abbildung 1.7).

### **Thermotrope Umwandlungen in Phospholipidmembranen**

Eine der bemerkenswertesten Eigenschaften von Phospholipidmembranen ist die Tatsache, dass sie bei wohldefinierten Temperaturen Phasenumwandlungen zeigen. Eine Lipiddoppelschicht kann in bis zu vier unterschiedlichen Phasen auftreten, somit drei Umwandlungen zeigen. Dabei sollen hier nur die rein thermotropen Umwandlungen innerhalb der Doppelschichtstruktur



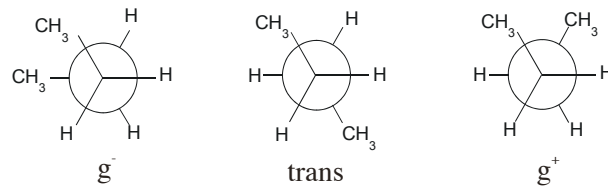


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der trans- sowie der beiden gauche-Isomere  $g^-$  und  $g^+$  eines Ethanmoleküls in der sogenannten Newman-Projektion. Die einzelnen Segmente der Kohlenwasserstoffketten in einem Phospholipid zeigen genau diese Konformationen (anstelle der hier gezeigten  $\text{CH}_3$ -Gruppen befinden sich innerhalb eines solchen Segmentes natürlich  $\text{CH}_2$ -Gruppen).

besprochen werden, manche Lipide zeigen zusätzlich noch die Herausbildung hexagonaler Strukturen bei Temperaturveränderungen oder sogar Strukturveränderungen in größeren Maßstäben wie Fusion von Vesikeln (dies wird in Kapitel 3 bei der Diskussion der Wirkung des blutdrucksenkenden Mittels Losartan auf Lipidmembranen eine Rolle spielen). Als Beispiel sei hier das bereits erwähnte Phospholipid DPPC gewählt, das vermutlich das beststudierte Lipid überhaupt ist.

Unterhalb von  $18^\circ\text{C}$  tritt DPPC nach längerer Inkubationszeit bei tiefen Temperaturen (mehrere Stunden bis Tage bei nur wenig über  $0^\circ\text{C}$ ) in der Sub-Gel-Phase  $L_C$  auf. Sie ist durch eine kristalline Anordnung der Lipide in einem orthorhombischen Gitter charakterisiert, in der die freie Rotation der Fettsäureketten stark eingeschränkt ist. In der  $L_\beta$ -Phase (die bei  $18^\circ\text{C} < T < 34^\circ\text{C}$  vorliegt) liegen die Ketten hauptsächlich gestreckt in der energetisch niedrigsten sogenannten all-trans-Konformation (siehe Abbildung 1.8) nebeneinander und sind - abhängig von der Temperatur - um einen Winkel von etwas  $30^\circ$  gegen die Membrannormale geneigt. Diese Neigung der Lipide ist auf den unterschiedlichen Flächenbedarf der Kopfgruppen und der gesättigten Kohlenwasserstoffketten zurückzuführen und ermöglicht eine effiziente Packung der Ketten. Diese Packung erfolgt in einem verzerrten, quasihexagonalen Gitter [8]. In der  $P_\beta$ -Phase (bei  $34^\circ\text{C} < T < 41^\circ\text{C}$ ) sind die Kohlenwasserstoffketten in der Doppelschicht ebenfalls gestreckt. Diese Phase unterscheidet sich von der  $L_\beta$ -Phase aber durch eine Überstruktur in Form einer periodischen Wellung der lamellaren Doppelschicht. Diese Phase wird daher „*ripple phase*“ genannt. Die Lipide sind dabei in einem hexagonalen Gitter angeordnet [8]. Den Übergang von der  $L_\beta$ - in die  $P_\beta$ -Phase bezeichnet man als Vorumwandlung. Heimburg [9] interpretiert diese gewellte Phase mit einem teilweisen Aufbrechen der Struktur in der Vorumwandlung

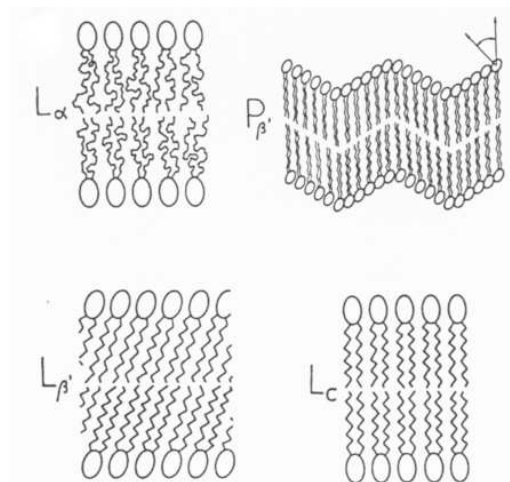


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der unterschiedlichen thermotropen Lipidphasen (Querschnitt durch eine Lipiddoppelschicht) von Phosphatidylcholinen. Die Kohlenwasserstoffketten sind in der  $L_{\beta}$ - und der  $P_{\beta}$ -Phase um etwa  $30^\circ$  gegen die Membranebene geneigt. (Abbildung nach E. Sackmann, Technische Universität München)

und dem Auftreten von Liniendefekten in der ansonsten noch geordneten Membran. Die  $L_{\alpha}$ -Phase (bei Temperaturen über  $41^\circ\text{C}$ ) schließlich ist durch eine hohe Beweglichkeit der Kohlenwasserstoffketten gekennzeichnet, die auf die Bildung von gauche-Isomeren ( $g^-$  und  $g^+$ , siehe Abbildung 1.8) der Ketten zurückzuführen ist und daher oft als „geschmolzen“ bezeichnet wird. Die  $L_{\alpha}$ -Phase wird aus diesem Grund auch fluide oder flüssigkristalline Phase genannt, während die  $L_{\beta}$ -, die  $P_{\beta}$ - und die  $L_C$ -Phase als Gel-Phasen bezeichnet werden. Dabei ist die Bezeichnung Gel historisch begründet und hat mit einem Gel wie man es aus der Kolloidchemie<sup>6</sup> kennt nichts zu tun. Ein Querschnitt durch die Lipiddoppelschicht für alle vier unterschiedlichen Phasen ist in Abbildung 1.9 gezeigt. Der Übergang in die fluide Phase wird als Hauptumwandlung bezeichnet. Ihr kommt die größte Bedeutung zu, und

<sup>6</sup>Die Kolloidchemie ist das Teilgebiet der physikalischen Chemie, das sich mit dem kolloiden Zustand der Materie befasst. Kolloide sind Stoffe, die besonders fein zerteilt sind und sich so in mancherlei Hinsicht wie Moleküle verhalten.

Unter einem Gel versteht man in der Kolloidchemie ein formbeständiges, dabei leicht deformierbares, an Flüssigkeiten und Gasen reiches disperses System aus mindestens zwei Komponenten. Dies sind meistens ein fester, kolloid zerteilter Stoff mit langen oder stark verzweigten Teilchen (wie beispielsweise Gelantine oder Kieselsäure) und eine Flüssigkeit (meist Wasser) als Dispersionsmittel.

wenn einfach nur von Umwandlung die Rede ist, ist immer die Hauptumwandlung gemeint. Den Mittelpunkt dieser Hauptumwandlung (bei dem also 50% der Lipidmoleküle in der  $P_\beta$ - und 50% in der  $L_\alpha$ -Phase sind) nennt man dabei den Schmelzpunkt  $T_m$  (für *melting temperature* oder auch *transition midpoint*). Die Dicke der Lipiddoppelschicht ist in der fluiden Phase geringer als in den Gelphasen, da durch Bildung mehrerer Rotationsisomere in den Kohlenwasserstoffketten die Kettenlänge reduziert wird. Da jedes Lipidmolekül so „mehr Platz für sich beansprucht“ bedingt dies gleichzeitig eine Zunahme der Membranfläche um rund 25% sowie eine Vergrößerung des Volumens um etwa 4% (Werte jeweils für DPPC [10]).

Da in der Hauptumwandlung streng genommen zwei unabhängige Prozesse stattfinden, nämlich das Aufbrechen der hexagonalen Gitterstruktur sowie das eigentliche Schmelzen der Kohlenwasserstoffketten, neigen manche Autoren [11] in neuerer Zeit dazu, dem Rechnung zu tragen und anstelle von gelförmig und fluid von fest-geordnet und flüssig-ungeordnet zu sprechen, was das Schmelzen der Ketten (geordnet - ungeordnet) und die Auflösung der Gitterstruktur (fest - flüssig) unabhängig voneinander benennen kann. So sind im Prinzip auch noch zwei Zwischenzustände denkbar. Dieselben Autoren vermuten auch, dass in der Gegenwart von Cholesterol ein solcher, nämlich der flüssig-geordnete Zustand auftreten kann, in dem also die Kohlenwasserstoffketten noch geordnet sind, die hexagonale Gitterstruktur aber bereits aufgebrochen ist.

Der Schmelzprozess einer Membran kann in einem Differentialkalorimeter beobachtet werden. Dieses misst die Wärmekapazität (bei konstantem Druck) einer Lipiddispersion in Abhängigkeit von der Temperatur. Ein solches Wärmekapazitätsprofil für das oben beschriebene DPPC ist in Abbildung 1.10 gezeigt. Die Hauptumwandlung ist hierbei durch einen markanten Anstieg der Wärmekapazität gekennzeichnet. Da für konstanten Druck  $C_p = \frac{\Delta Q}{\Delta T} = \frac{\Delta H}{\Delta T}$  gilt, kann man durch Integration auch die Umwandlungsenthalpie  $H$  bestimmen. Die Technik und die genauen thermodynamischen Zusammenhänge der Differentialkalorimetrie werden in Kapitel 2 beschrieben.

In der Hauptumwandlung verändern sich nicht nur Wärmekapazität und Enthalpie auf dramatische Weise, sondern auch die Dichte (bzw. das spezifische Volumen) der Lipide. Es lässt sich experimentell zeigen, dass sich Enthalpie- und Volumenveränderung exakt proportional zueinander verhalten [12][13]. Dies hat weitreichende Konsequenzen für die mechanischen Eigenschaften der Lipidmembran in der Umwandlung. Da im Bereich der Umwandlung starke Fluktuationen auftreten, sind Enthalpie- und Volumenfluktuationen auch miteinander gekoppelt. Mittels Methoden der statistischen Mechanik (Fluktuations-Dissipations-Theorem) lässt sich zeigen, dass dies bedeutet, dass Volumen- und Flächenkompressibilität proportional zur Wär-

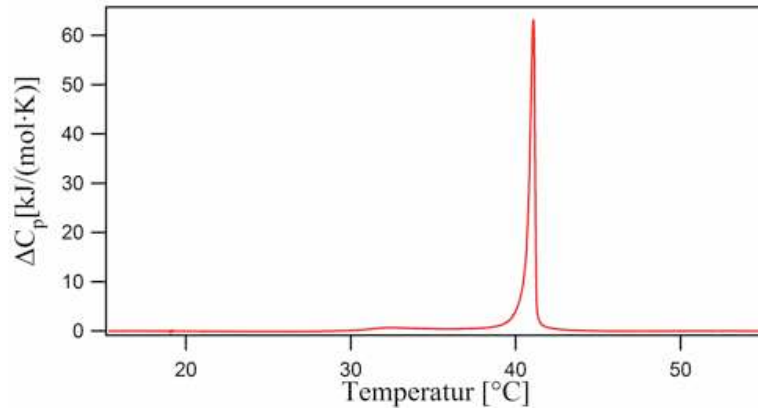


Abbildung 1.10: Typisches Wärmekapazitätsprofil von Phospholipidvesikeln. Die hier gezeigte Schmelzkurve stammt von einer unilamellaren, 5 millimolaren DPPC-Dispersion. Die Hauptumwandlung ist als bestimmendes thermodynamisches Ereignis zu erkennen. Sie zeichnet sich durch eine sehr starke Zunahme der Wärmekapazität auf einem eng begrenzten Temperaturintervall aus. Die Vorumwandlung ist in dieser Darstellung hingegen kaum sichtbar. Die Fläche unterhalb der Kurve entspricht der Umwandlungsenthalpie.

mekapazität sind [10]. Für die Volumenkompressibilität konnte dies mittlerweile experimentell bestätigt werden [14]. Für die Elastizität gilt eine ähnlich einfache Beziehung. Anders ausgedrückt kann man sagen, dass eine Membran im Bereich der Umwandlung weich und elastisch wird. Zusammen mit der Beobachtung, dass die in der gelförmigen und fluiden Phase für hydrophile Substanzen kaum zu passierende Lipidmembran im Bereich der Phasenumwandlung einen gewaltigen Sprung in ihrer Permeabilität zeigt [15][16][17], kann man also insgesamt von einem völlig anderen physikalischen Zustand der Lipidmembran im Bereich der Umwandlung sprechen.

Das Schmelzen einer Lipidmembran ist ein sogenannter kooperativer Prozess, d.h. die einzelnen Lipidmoleküle schmelzen nicht unabhängig voneinander, sondern in größeren Gruppen, in kooperativen Einheiten.<sup>7</sup> Dies bedingt das scharf ausgeprägte Wärmekapazitätsprofil. Bei multilamellaren Vesikeln ist diese Kooperativität wegen der übereinanderliegenden Doppelschichten noch größer als bei unilamellaren, der Bereich der Hauptumwandlung da-

<sup>7</sup>Die Größe einer solchen kooperativen Einheit kann man mit  $\frac{\Delta H_{vH}}{\Delta H_{kal}}$  angeben, wobei  $\Delta H_{kal}$  die kalorimetrisch bestimmte Umwandlungsenthalpie ist und  $\Delta H_{vH}$  die sogenannte van't-Hoff-Enthalpie, die sich unter Annahme einer Zweizustandsumwandlung aus der Gleichgewichtskonstante bestimmen lässt. Für nähere Details hierüber sei auf [18] verwiesen.

her noch enger begrenzt. Gleichzeitig ist die Vorumwandlung deutlicher zu erkennen.

Die Schmelztemperatur von Lipidmembranen hängt empfindlich von der Kettenlänge und dem Sättigungsgrad der Kohlenwasserstoffketten ab, zu einem geringeren Grad auch von der Beschaffenheit der Kopfgruppe. Je länger die Ketten sind, desto stärker wirken van-der-Waals-Kräfte zwischen ihnen, was eine höhere Schmelztemperatur zur Folge hat. Doppelbindungen innerhalb der Ketten haben einen gegenteiligen Effekt. Dadurch, dass sie eine parallele Anordnung der Kohlenwasserstoffketten grundsätzlich verhindern, schmelzen Membranen mit ungesättigten Fettsäureketten deutlich früher. Lipide mit geladenen Kopfgruppen zeigen zudem eine Abhängigkeit von Salzkonzentration und pH-Wert des umgebenden Milieus. Dies ist durch die elektrostatische Wechselwirkung auf der Membranoberfläche begründet und lässt sich mit Hilfe der Gouy-Chapman-Theorie berechnen [19]. Grundsätzlich verschieben ein höherer pH-Wert und/oder eine höhere Konzentration an (einwertigen) Kationen die Schmelztemperatur zu niedrigeren Temperaturen. Der entsprechend umgedrehte Fall gilt natürlich auch. Da das negativ geladene Phosphatidylglycerol in vielen biologischen Membranen zu finden ist, könnte diese Variabilität der Phasenumwandlung eine biologische Bedeutung haben. Bei der Untersuchung der Membranen des Bakteriums *Escherichia coli* wird diese Verschiebung anzutreffen sein.

Cholesterol als Bestandteil von vielen Membranen hat einen signifikanten Einfluss auf das Phasenverhalten. Allgemein verbreitert es das Wärmekapazitätsprofil. Mit zunehmender Menge wird daher die Umwandlung immer weniger ausgeprägt, bis sie bei einem Bestandteil von etwa 50 mol% Cholesterol in der Membran in einer kalorimetrischen Messung nicht mehr erfassbar ist. Vielfach wird dies damit interpretiert, dass keine Phasenumwandlung mehr auftritt. Dies ist aber nicht notwendigerweise der Fall. Die Umwandlung könnte sich auch über so einen breiten Bereich erstrecken, dass der Messbereich eines Kalorimeters sie nicht mehr voll erfassen kann.

## **Reine Lipidvesikel als Modellsysteme für biologische Membranen**

Reine Lipidvesikel (bestehend aus einer oder auch mehreren Lipidsorten) werden als Modellsysteme verwendet, um grundlegende physikalische und chemische Eigenschaften von Membranen zu studieren, da die Komplexität biologischer Membranen ihr Studium im Allgemeinen sehr erschwert. Durch das Vorhandensein vieler Lipid- und Proteinkomponenten ist die Zahl der thermodynamischen Freiheitsgrade deutlich höher als bei Modellmembranen. In der vorliegenden Arbeit werden daher auch viele Untersuchungen an reinen Lipidvesikeln vorgenommen. Man geht davon aus, dass grundsätzliche

Ergebnisse (wie etwa die in dieser Arbeit dokumentierten Einflüsse von vielen Substanzen auf das Phasenverhalten von Lipiden) von so prinzipieller Natur sind, dass man sie in dieser oder ähnlicher Form auch in biologischen Membranen antrifft.

Historisch gesehen war das erste Lipidmodellsystem eine planare Struktur, die sogenannte *black lipid membran*. Sie wurde Anfang der sechziger Jahre von Mueller et al. eingeführt [20][21]. Mit Hilfe verschiedener Techniken ist es möglich, eine planare Membran über ein rundes Loch mit einem Durchmesser von einigen Zehntelmillimetern bis zu einigen Millimetern zu spannen. Das Loch befindet sich in einer dünnen Festkörperschicht, die zwei mit wässrigen Lösungen gefüllte Kompartimente voneinander trennt, die beide individuell modifiziert werden können. Ein Transport zwischen diesen beiden Seiten kann dann nur durch die Membran hindurch erfolgen, was viele interessante Experimente zur Membranpermeabilität oder beispielsweise auch zur elektrischen Leitfähigkeit ermöglicht. Planare Lipidmembranen erscheinen im reflektierten Licht (fast) schwarz, da sich die an der Vorder- und Rückseite der Membran reflektierten Lichtwellen durch Interferenz beinahe auslöschen, daher auch der Name *black lipid membran*. Ein wesentlicher Nachteil dieses Modellsystems besteht darin, dass die Herstellung der planaren Membranen immer einen nicht unerheblichen Anteil von Lösungsmittel in diesen zurücklässt [22], was eine genaue Untersuchung von Membraneigenschaften, die vom Phasenverhalten abhängen, erschwert, da dieses stark von Lösungsmittelrückständen beeinflusst wird.

Nur wenige Jahre nach der Einführung planarer Modellmembranen wurden auch die ersten künstlichen vesikulären Strukturen hergestellt [23]. Viele der Pionierarbeiten auf diesem Gebiet wurden am *Institute of Animal Physiology* in Babraham bei Cambridge (England) durchgeführt [24]. G. Weissmann, der zu der Zeit Gast in Babraham war, prägte wenig später für diese künstlichen Lipidvesikel die Bezeichnung Liposomen. Heute wird dieser Name vor allem im Zusammenhang mit pharmazeutischen Anwendungen verwendet, denn Vesikel eignen sich auch als Transportsystem für Medikamente (*drug carrier*). Diese mögliche Anwendung wurde erstmals Anfang der siebziger Jahre von Gregoriadis und Ryman vorgeschlagen [25][26].

### 1.2.2 Proteine

Proteine sind hochkomplexe Makromoleküle. Ihre monomeren Grundbausteine sind die 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren.<sup>8</sup> Wenn nur wenige

---

<sup>8</sup>Von den in den letzten Jahren zusätzlich gefundenen zwei natürlichen Aminosäuren sei hier abgesehen, da sie nur in äußerst exotischen Organismen vorkommen.

Aminosäuren ein Molekül bilden, so spricht man meist von Peptiden, während Proteine viele tausend enthalten können. Die dreidimensionale Struktur eines Proteins liegt in der jeweils vorliegenden Aminosäuresequenz begründet. Wie sich daraus im Detail die genaue Struktur ableitet, ist bis heute allerdings nicht verstanden (Problem der Proteinfaltung). Experimentell bestimmt man diese dreidimensionale Struktur durch Röntgenbeugung an Proteinkristallen.

Proteine werden in Membranen als die hauptsächlichen Funktionsträger angesehen. Membranproteine unterteilt man in die zwei Haupttypen periphere (oder extrinsische) und integrale (oder intrinsische) Proteine, abhängig davon wie sie mit der Lipiddoppelschicht interagieren.

Periphere Proteine liegen komplett außerhalb der Membran und wechselwirken mit den Kopfgruppen der Lipide oder Teilen von integralen Membranproteinen durch Ionen -, Wasserstoffbrücken - oder van-der-Waals - Bindungen. Sie haben keine Wechselwirkung mit den inneren hydrophoben Fettsäureketten der Lipiddoppelschicht und lassen sich relativ einfach durch Veränderung des pH-Wertes oder bestimmter Ionenkonzentrationen in der umliegenden Lösung von der Membran ablösen. Periphere Proteine können sowohl auf der extrazellulären als auch auf der Seite des Zytoplasmas liegen. Cytochrom c ist ein Beispiel für ein peripheres Membranprotein.

Integrale Proteine sind in die Lipiddoppelschicht eingebettet. Viele von ihnen durchspannen die komplette Doppelschicht und werden daher als Transmembranproteine bezeichnet. Diese verfügen über einen hydrophoben Teil, der sich im Kontakt mit den Fettsäureketten der Lipide im „Innern“ der Doppelschicht befindet und zwei hydrophile Teile, die über die Membranebene hinaus in das umliegende wässrige Milieu ragen. Integrale Membranproteine sind nur schwer isolierbar und es bedarf des Einsatzes von Lösungsmitteln, um sie aus der Membran extrahieren. Dies erschwert auch die Strukturaufklärung solcher Proteine, zu der man einen Kristall züchten muss, um Röntgenbeugungsexperimente durchzuführen. Dies gelang zum ersten Mal in den 1980er Jahren. Sämtliche porenbildende Proteine sind Transmembranproteine, dies sind beispielsweise Ionenkanäle ( $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Kanäle), die für die Erzeugung und Weiterleitung von Aktionspotentialen in Neuronen benötigt werden (wobei allerdings die genaue Funktion des Chloridkanals noch ungeklärt ist). Aquaporine sind reine Wasserkanäle. Überhaupt sind solche Kanalproteine hochspezifisch. Rezeptorproteine für beispielsweise Neurotransmitter oder Carrierproteine, die bestimmte Moleküle durch die Membran transportieren, sind weitere Beispiele für integrale Proteine.

Das klassische Lehrbild der Biologie ist, dass die Proteine die alleinigen Funktionsträger der Zelle sind, und dass die sie umgebenden Lipide nur das Medium für eine gewisse räumliche Fixierung liefern. In den letzten Jahren

mehren sich Hinweise darauf, dass dieses Bild zu eng gefasst ist. Argumente dafür, dass die Lipiddoppelschicht nicht nur mechanischen Halt liefert, sondern modulierend in die Funktionweise der Proteine eingreift und möglicherweise zelluläre Prozesse auch direkt durch ihre besonderen variablen Eigenschaften mitbestimmt werden, sollen auch in dieser Arbeit gesammelt werden.

### **1.2.3 Kohlenhydrate**

Kohlenhydrate (Zucker) haben für sämtliche Lebensformen eine enorme Bedeutung. Sie übernehmen vielfältigste Funktionen und bilden sogar den größten Anteil an der Gesamtmasse aller auf der Erde vorkommenden Biomoleküle. Ribose und Desoxyribose sind beispielsweise Bestandteile von RNA bzw. DNA. Die Hauptbedeutung der Kohlenhydrate liegt allerdings in ihrer Aufgabe im Metabolismus. Der universelle Energiespeicher ATP (Adenosin-triphosphat) ist ein Zuckerderivat, und auch die Stärke in pflanzlichen sowie das Glykogen in tierischen Zellen (beides Ausgangsstoffe bzw. Speichermoleküle im Metabolismus) sind Polysaccharide (Vielfachzucker), die zu dem Monosaccharid (Einfachzucker) Glukose abgebaut bzw. aus Glukose aufgebaut werden. Zellulose (die häufigste organische Verbindung überhaupt) ist ebenfalls ein Polysaccharid und ein wichtiges Strukturelement der Zellwände von Pflanzen und Bakterien. Oligosaccharide (Vielfachzucker) sind häufig an Lipide und Proteine der Membran geheftet (Glykolipide bzw. Glykoproteine). In dieser Form spielen sie eine Rolle in der Zellerkennung. Außerdem bestimmen sie beispielsweise auch die Blutgruppe und andere immunologische Eigenschaften der Membran. Typische Zucker in Glykolipiden und Glykoproteinen sind Glukose, Galaktose, Mannose und Fukose. Eine typische Tierzelle kann mehrere hundert unterschiedliche Glykoproteine haben. Glykolipide findet man im Allgemeinen nur auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran (Glykokalix).

## **1.3 Anordnung und Zusammenspiel der Membranbestandteile - Membranmodelle**

Um die Mitte des 19. Jahrhunderts wurde die Zellmembran als diskreter Teil der Zelle erkannt. Carl Nägeli beobachtete, dass sich beschädigte und unbeschädigte Pflanzenzellen unterschiedlich stark mit Pigmenten durchsetzen ließen. Daraus schloss er, dass Zellen von einer äußeren Schicht umgeben sein müssen, die besondere Eigenschaften besitzt und diese Versuchsergebnisse verursacht. Er nannte diese äußere Schicht Plasmamembran [27]. Ihre



Zusammensetzung war hingegen noch völlig unbekannt.

Charles Ernest Overton konnte am Ende des 19. Jahrhunderts durch eine Reihe von Experimenten zur Membranpermeabilität zeigen, dass Lipide ein Hauptbestandteil von Zellmembranen sind. In den Jahren 1890 bis 1899 führte er rund zehntausend akribisch dokumentierte Versuche durch, in denen er von über fünfhundert Substanzen die Rate bestimmte, mit der diese die Membranen von Pflanzenzellen passierten. Die Resultate zeigten einen direkten Zusammenhang mit der Löslichkeit dieser Substanzen in Fett (Overton verwendete Olivenöl). Daraus schloss er auf einen hohen Anteil von Lipiden in Zellmembranen [28].

Langmuir konnte 1917 in einem einfachen Gerät (das wir heute als Langmuirtrog<sup>9</sup> kennen und in prinzipiell unveränderter Form nach wie vor Verwendung findet) zeigen, dass fettartige Substanzen eine monomolekulare Schicht (Monolayer) bilden, wenn sie auf eine Luft-Wasser-Grenzschicht aufgebracht werden. Mit diesem Gerät war es auch möglich, die von dem Monolayer eingenommene Fläche genau zu bestimmen [29].

Die ersten Untersuchungen an Lipiden, die tatsächlich aus Zellmembranen gewonnen wurden, führten Evert Gorter und sein Assistent Grendel an der Universität Leiden durch. In ihrem klassischen Experiment extrahierten Gorter und Grendel mit Azeton die Lipide aus der Membran roter Blutkörperchen (die keine Organellen mit eigenen Membranen enthalten). Mittels eines modifizierten Langmuirtrogs konnten sie zeigen, dass die Lipidmoleküle sowohl eine Doppelschicht als auch eine Monoschicht bilden können. Desweiteren hatte die Monoschicht, die aus den Lipiden eines roten Blutkörperchens bestand, eine doppelt so große Fläche wie die der intakten Zellmembran. Daraus schlossen Gorter und Grendel, dass die Membran roter Blutkörperchen aus einer Lipiddoppelschicht aufgebaut ist [30].<sup>10</sup> Obwohl man diese Entdeckung noch nicht als konkretes Membranmodell bezeichnen kann, war sie der erste wichtige Meilenstein zur Strukturaufklärung von Zellmembranen.

Das erste Membranmodell, das weite Akzeptanz in der Wissenschaft fand, wurde 1935 von Danielli und Davson propagiert. James F. Danielli hatte in

---

<sup>9</sup>Dieses Gerät, das wir heute mit dem Namen Langmuirs verbinden, wurde von ihm zwar deutlich verbessert, aber nicht zuerst entwickelt. Diese Ehre gebührt Agnes Pockels, die im 19. Jahrhundert in ihrer Küche mit einfachsten Mitteln viele grundlegende Untersuchungen zur physikalischen Chemie gemacht hat. Später veröffentlichte sie mit der Unterstützung Lord Kelvins 14 wissenschaftliche Abhandlungen, die sie zu einer der ersten bedeutenden Frauen in der modernen Wissenschaft machten.

<sup>10</sup>Wie sich später herausstellte, machten Gorter und Grendel zwei größere Fehler. Zum einen nahmen sie die Fläche der Zellmembran der roten Blutkörperchen als ein Drittel kleiner an als sie wirklich ist. Zum anderen unterschätzten sie aber auch die Menge an Lipiden um genau diesen Faktor, so dass ihre Schlussfolgerung trotz der fehlerhaften Daten richtig war [31].

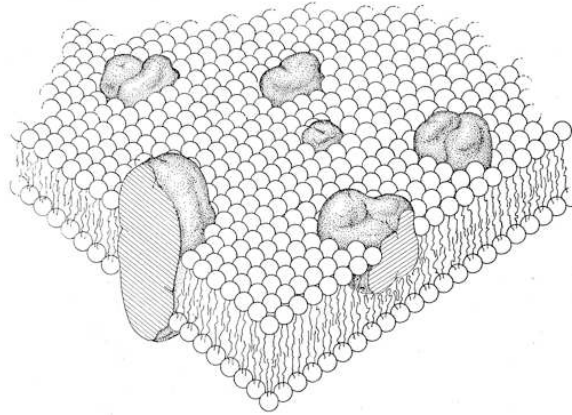


Abbildung 1.11: Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung des Fluid-Mosaik-Modells von biologischen Membranen, wie sie in der Originalveröffentlichung von Singer und Nicolson gezeigt ist [34]. Die Proteine sind als integrale Proteine in die Membran eingebettet und bilden ein Mosaik in der Lipidmatrix. Die Lipide werden als fluid und weitestgehend homogen verteilt angenommen.

seiner Zeit an der Princeton University (1933 - 1935) beobachtet, dass Proteine von aus Makreleneiern extrahierten Öltröpfchen absorbiert werden [32]. Diese Entdeckung bildet den Schlüsselbaustein für das 1935 zusammen mit Hugh Davson am University College in London vorgestellte Membranmodell [33]. Dieses besagt, dass man sich die Zellmembran als eine Art „Sandwich“ vorstellen kann, in der Mitte befindet sich die Lipiddoppelschicht wie schon von Gorter und Grendel erkannt, an beiden Außenseiten gibt es eine dünne Proteinbeschichtung (die, wie sie annahmen, die ganze Zelle bedeckt).

Dieses Membranmodell schien mit Aufkommen der Elektronenmikroskopie eine Bestätigung zu finden. Auf den ersten mit dieser Technik erstellten Aufnahmen von Zellmembranen Ende der 1950er Jahre war eine kontinuierlich erscheinende Membran zu erkennen. Diese Bilder zeigten zwei parallele dunkle Linien (ähnlich wie die in Abbildung 1.2), was als Bestätigung der Doppelschichtnatur der Membran anzusehen war. Bei allen untersuchten Zelltypen wurde grundsätzlich diese Struktur gefunden. Auch die Organellen waren von solchen einheitlichen Membranen umgeben. J. David Robertson prägte daher das Bild der *unit membrane* als universelles Modell für biologische Membranen [35][36]. Insbesondere waren auf diesen frühen elektronenmikroskopischen Aufnahmen also keine einzelnen Proteine auszumachen. Danielli hatte hingegen mittlerweile sein Membranmodell dahingehend variiert, dass

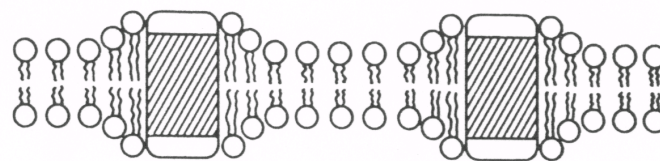
er auch Poren aus Peptiden annahm, die durch die Membran hindurchführen [37], um die speziellen Permeabilitätseigenschaften einer Membran erklären zu können.

In den sechziger Jahren mehrten sich die Hinweise darauf, dass das Bild einer Membran mit einer homogenen, nur äußeren Proteinverteilung nicht richtig sein kann [38][39]. Diese Arbeiten fanden 1972 ihren Höhepunkt in der berühmt gewordenen Publikation „The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes“ von Singer und Nicolson [34]. Dieses Modell enthält keine einheitliche Proteinschicht mehr. Vielmehr erscheinen die Proteine als einzeln in die Membran eingebettete integrale Proteine. Sie bilden das besagte Mosaik (siehe Abbildung 1.11). Dies lies sich auf mittels spezieller Techniken erstellten elektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser Zeit erstmals erkennen. Die Lipiddoppelschicht wird als quasi zweidimensionales viskoses Fluid angenommen. Das Fluid-Mosaik-Modell erlaubt grundsätzlich lateral die freie Diffusion sowohl von Lipidmolekülen als auch von Proteinen. Singer und Nicolson schlossen langreichweitige Wechselwirkungen innerhalb der Membran aus. Die Lipide werden als grundsätzlich statistisch verteilt angesehen.<sup>11</sup> Für die Tatsache, dass es in biologischen Membranen teilweise bis zu hundert unterschiedliche Lipide gibt, kann keine Erklärung gegeben werden. Eine Ausbildung von besonderen Strukturen sowie das Phasenverhalten von Lipiden findet keinen Platz in diesem Modell. Dies ist späteren Entwicklungen vorbehalten und Gegenstand aktueller Forschung. Das Fluid-Mosaik-Modell setzt aber den Grundstein für das moderne Verständnis von biologischen Membranen und ist als ein Meilenstein in der Biologie anzusehen.

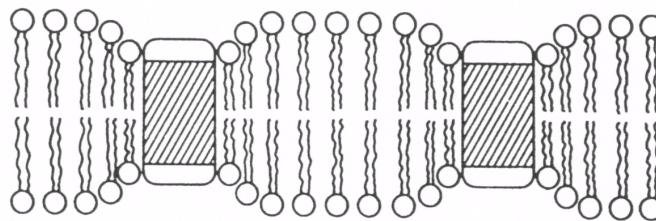
Integrale Membranproteine weisen hydrophobe und hydrophile Teile auf. Je nachdem wie groß diese Teile sind, kann dies die Verteilung bzw. den Zustand der umliegenden Lipide beeinflussen. Wenn nämlich ein „*hydrophobic mismatch*“ vorliegt, wenn also entweder die hydrophoben Teile des Proteins (für die es energetisch ungünstig ist, mit dem Wasser Kontakt zu haben) länger als die Dicke der Lipiddoppelschicht ist, oder aber dieser Teil kürzer ist (was einen ebenso ungünstigen Kontakt der hydrophilen Teile des Proteins mit den hydrophoben Fettsäureketten der Lipide zur Folge hätte), bewirkt dies an dieser Position eine Veränderung der Dicke der Lipiddoppelschicht. Dies wird dadurch erreicht, dass Lipide mit längeren (bzw. kürzeren) Fettsäureketten das Protein umgeben oder sich der Zustand der Lipide von fluid zu gelförmig (bzw. umgekehrt) verändert. Da sich das so ergebende Membranbild (siehe Abbildung 1.12) an eine Matratze (mit Knöpfen) erinnert, wählten Bloom und Mouritsen 1984 die Bezeichnung „*matress model*“ für

---

<sup>11</sup>Allerdings hielten Singer und Nicolson eine besondere Anordnung der Lipide in unmittelbarer Nachbarschaft zu integralen Membranproteinen für durchaus denkbar.



a



b

Abbildung 1.12: Querschnitt durch zwei Lipiddoppelschichten, die Transmembranproteine enthalten. Die hydrophilen Teile der Proteine sind dabei die weißen Bereiche, die hydrophoben die quergestreiften. Zwei Möglichkeiten des „*hydrophobic mismatch*“ sind gezeigt: In (a) ist das Protein länger als die Dicke der Lipiddoppelschicht, in (b) ist es kürzer. Dies führt zur Ausbildung einer Membranstruktur, die Bloom und Mouritsen als „*mattress model*“ publizierten. Die Abbildung ist aus [40] entnommen.

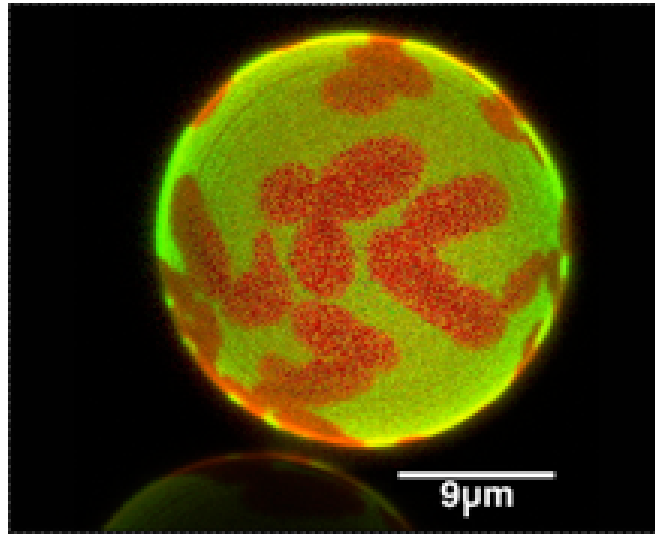


Abbildung 1.13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines sogenannten *giant unilamellar vesicles*, das aus zwei Lipidkomponenten besteht (Dilauroylphosphatidylcholin (DLPC) mit 12 Kohlenstoffatomen pro Fettsäurekette und Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) mit 16 Kohlenstoffatomen pro Fettsäurekette). Der rote Farbstoff (DiIC<sub>18</sub>) bindet an die Gelphase, der grüne (BODIPY<sub>C16</sub>) an die fluide Phase. Deutlich ist eine Domänenbildung zu erkennen. Die Aufnahme stammt von M. Fidorra (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, und Nils-Bohr-Institut, Kopenhagen).

ihr Membranmodell [40].

Während sich das Fluid-Mosaik-Modell in der Biologie durchsetzte und heute in jedem Lehrbuch zu finden ist, wurde aber immer deutlicher, dass insbesondere die als quasi uniform und fluid angenommene Lipiddoppelschicht so nicht der Realität entspricht, sondern dass es innerhalb der Membran begrenzte Gebiete von Lipiden gibt, deren Zusammensetzung und physikalischer Zustand sich deutlich von anderen Bereichen unterscheidet. Dies wurde zum ersten Mal bereits 1977 von Jain und White publiziert [41] und wurde von ihnen als „*plate-model*“ bezeichnet. In den folgenden Jahren wurden viele Untersuchungen an Modellmembranen durchgeführt. Für die sich von ihrer Umgebung unterscheidenden Lipidbereiche etablierte sich die Bezeichnung Domänen. Diese Domänen können leicht in Zweikomponentensystemen erkannt werden. Während dies in frühen Arbeiten indirekt über die Messung von Diffusionsraten markierter Lipidmoleküle durchgeführt wurde, kann man heute die Domänen auf Vesikeln in ihrer Gesamtheit durch Fluoreszenzmikroskopie zeigen (siehe Abbildung 1.13). Auch in biologischen Membranen

intakter Zellen konnten früh Hinweise auf Lipiddomänen gefunden werden [42] [43]. Simons und van Meer schlugen vor, dass diese für das Sortieren und den Transport von Lipiden und speziellen Proteinen zuständig sind [44]. Später prägten Simons und andere Autoren die Bezeichnung „*rafts*“ (Flöße), um diese besondere Transportfunktion hervorzuheben. Dabei versteht man unter „*rafts*“ meist solche Strukturen in Biomembranen, die relativ groß und langlebig sind und einen hohen Gehalt an Sphingolipiden und Cholesterol sowie Glykolipide und bestimmte Proteine enthalten [45][46][47] und sich dadurch von den „klassischen“ Domänen in Zweikomponenten - Modellsystemen unterscheiden, die starke Fluktuationen zeigen und hochdynamische Strukturen sind. Um die Existenz solcher „*rafts*“ in Membranen zu zeigen und ihre Zusammensetzung zu analysieren, ist es notwendig, sie bei sehr niedrigen Temperaturen unter Einsatz hoher Konzentrationen von Detergentien aus der Membran herauszulösen. Inwiefern solche drastischen Maßnahmen die „*rafts*“ verändern oder sie möglicherweise in dieser Form sogar erst erzeugen, ist eine Frage, die gegenwärtig für erhebliche Diskussionen sorgt [48][49].

Grundsätzlich kann man heute sicher davon ausgehen, dass Membranen sehr heterogene Strukturen sind, in der viele unterschiedliche Lipide in mitunter verschiedenen thermodynamischen Zuständen koexistieren und für einen enormen „Formenreichtum“ sorgen. Abbildung 1.14 zeigt eine solche zeitgemäße Vorstellung.

## 1.4 Motivation und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Diese Arbeit soll zum tieferen Verständnis von (insbesondere biologischen) Membranen beitragen, wobei das Augenmerk auf der Bedeutung der Lipide liegt. Das heißt, dass diese Arbeit Argumente für die sich in den letzten Jahren zunehmend verbreitende (aber bei weitem nicht allgemein akzeptierte) These sammelt, dass die Lipiddoppelschicht nicht allein eine ausschließlich passive strukturelle Funktion hat, also lediglich den Proteinen einen Halt in der Membran bietet, sondern durchaus auch eine aktive, in viele Prozesse eingreifende Rolle besitzt, sei es dadurch, dass sie die Funktion von Proteinen moduliert oder selbst Funktionen der Zellregulation übernimmt. Dazu werden zum einen Modellsysteme (reine Lipidvesikel) genauer untersucht, insbesondere der Einfluss von kleinen Molekülen auf das thermodynamische und strukturelle Verhalten der Membran. Dabei sind solche Substanzen von besonderem Interesse, von denen man allgemein annimmt, dass sie auf Rezeptorproteine wirken (etwa Neurotransmitter oder das blutdrucksenkende

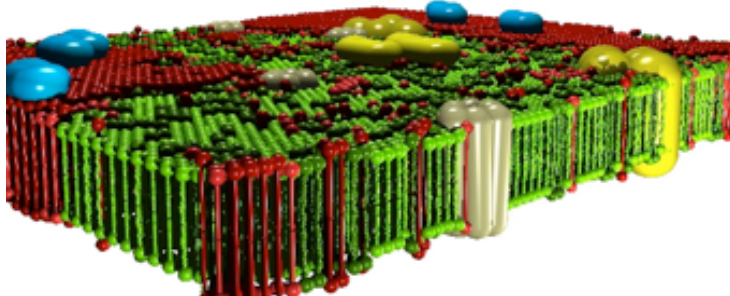


Abbildung 1.14: Die Abbildung zeigt eine mittels Raytracingsoftware erzeugte moderne Darstellung einer biologischen Membran. Die Lipiddoppelschicht besteht aus unterschiedliche Sorten von Lipiden, die im gelförmigen oder fluiden Zustand sind und Domänen ausbilden. Proteine können fest in der Membran verankert (integrale Proteine) oder an die Oberfläche der Lipiddoppelschicht gebunden sein (periphere Proteine). (Abbildung von H. Seeger, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, und Niels-Bohr-Institut, Kopenhagen)

Medikament Losartan) oder deren Wirkmechanismus weitestgehend unbekannt ist (zum Beispiel das Psychopharmakon Fluoxetin oder Hexylglycerol, eine Substanz, die in der Lage ist, die Blut-Gehirn-Schranke zu öffnen). Zum anderen werden biologische Membranen untersucht, wobei insbesondere der Zusammenhang von natürlicher Umgebungstemperatur des biologischen Systems und der Schmelztemperatur der Lipide interessiert.

# Kapitel 2

## Methoden und Materialien

### 2.1 Differentialkalorimetrie

Kalorimetrie bedeutet wörtlich Messung von Wärme. Um 1760 erkannte Joseph Black, dass die Wärme, die schmelzendem Eis zugeführt wird, bei konstanter Temperatur ausschließlich für die Umwandlung vom festen in den flüssigen Aggregatzustand verbraucht wird. Die Begriffe Wärme und Temperatur wurden damit auch zum ersten Mal in ihrer heutigen, unterschiedlichen Bedeutung erkannt [50][51]. Black baute eine erste einfache Form eines „Phasenumwandlungskalorimeters“, indem er eine warme Probe in einen Hohlraum eines Eisblocks brachte, die Öffnung wieder verschloss und - nachdem die Probe die Eistemperatur angenommen hatte - die Menge des Schmelzwassers wog. Lavoisier und Laplace entwickelten um 1780 erste wirklich brauchbare Versionen eines solchen Kalorimeters. Hermann (1834), Herschel (1847) und vor allem Bunsen (1870) zeigten weitere Verbesserungen. Kalorimetrie unter Ausnutzung thermoelektrischer Effekte wurde zum ersten mal von Steinwehr (1901) und Brönsted (1906) betrieben.

Das erste „Scanning“-Kalorimeter mit Leistungskompensation, bei dem die Wärmekapazität der Probe über einen weiten Temperaturbereich gemessen werden konnte, wurde 1935 von Sykes eingeführt [52]. Das erste Differentialkalorimeter (*differential scanning calorimeter*, DSC), bei dem eine Proben- und eine Referenzzelle parallel aufgeheizt werden, ist erstmals von Clarebrough et al. in [53] beschrieben. In die Biologie fand es ab den 1960er Jahren Verwendung, hauptsächlich durch die Arbeiten von Peter L. Privalov und Julian M. Sturtevant, die auch maßgebliche technische Entwicklungen initiierten. Privalov hat sich dabei vor allem durch die kalorimetrische Untersuchung von Proteinen einen Namen gemacht, Sturtevant primär durch die von Lipidmembranen.



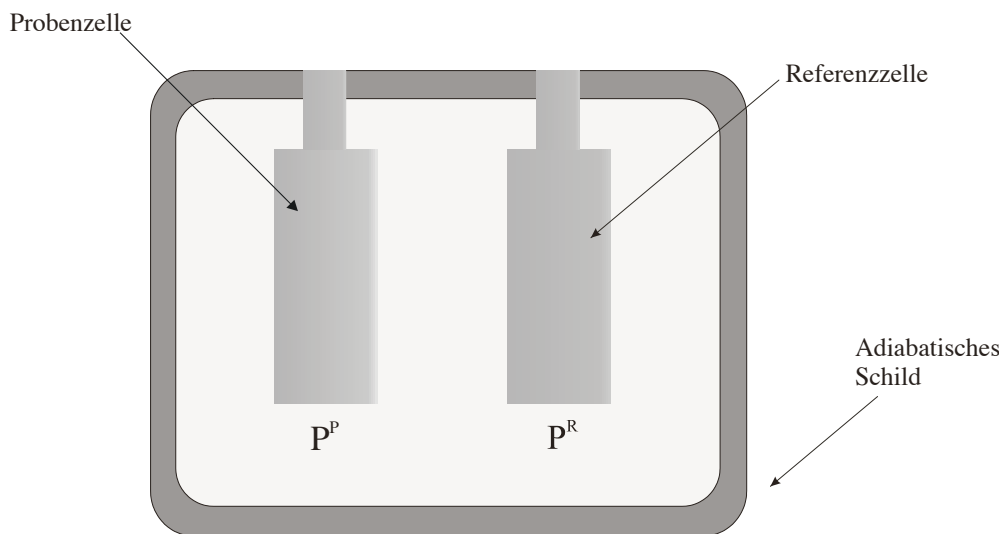


Abbildung 2.1: Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines Differentialkalorimeters. Es besteht im Wesentlichen aus zwei identischen Zellen (der Proben- und der Referenzzelle), die thermisch isoliert sind („adiabatisches Schild“). Während der Messung werden beide Zellen durch Zuführung elektrischer Leistung  $P^P$  für die Probenzelle bzw.  $P^R$  für die Referenzzelle erwärmt. Dabei sorgt die elektronische Ansteuerung dafür, dass beide Zellen immer die gleiche Temperatur haben, was bedeuten kann, dass beispielsweise im Falle einer endothermen Umwandlung in der Probenzelle die ihr zugeführte Leistung  $P^P$  höher ist als  $P^R$ . Diese Leistungsdifferenz  $\Delta P$  ist der Messwert des Differentialkalorimeters.

Dieser kurze historische Abriss zeigt die lange Tradition der Kalorimetrie. Darin liegt zum Teil aber auch ihr Akzeptanzproblem in den modernen Biowissenschaften, die vielfach auf modernste bildgebende Verfahren und in neuester Zeit auf die sich zunehmend verbreitenden Einzelmolekültechniken fixiert scheinen.<sup>1</sup> Dass auch die Kalorimetrie in den letzten Jahren einen technologischen Quantensprung gemacht hat, was tiefe Einblicke in biologische Vorgänge erlaubt, fand außerhalb der damit direkt arbeitenden Wissenschaftlergruppen leider wenig Beachtung.

In Abbildung 2.1 ist der schematische Aufbau eines Differentialkalorimeters gezeigt. Es enthält zwei Zellen. Sie sind im Gerät thermisch isoliert.

<sup>1</sup> Außerdem stellen die der Kalorimetrie zu Grunde liegenden thermodynamischen Begriffe und Gesetzmäßigkeiten für viele Wissenschaftler, die diese in ihrer Ausbildung nicht explizit gelernt haben, eine große Verständnisbarriere dar, so dass sie Messergebnisse in ihrer vollen Bedeutung und Tragweite nicht einordnen können.

Dieses „adiabatische Schild“ sorgt dafür, dass keine Wärme das System nach außen verlassen oder von außen aufgenommen werden kann. Die Probenzelle enthält die zu untersuchende Substanz (also z.B. eine Lipiddispersion), die Referenzzelle das reine Lösungsmittel (meist also Wasser oder den benutzten Puffer).

Während der Messung werden beide Zellen getrennt durch Zuführung einer elektrischen Leistung  $P^P$  für die Probenzelle bzw.  $P^R$  für die Referenzzelle erwärmt. Dies erfolgt durch direkte Umsetzung der elektrischen Energie in Wärme durch Peltierelemente (oder bei älteren Kalorimetertypen indirekt durch die Temperierung über Wasserbäder). Die Temperaturen der Probe und der Referenz werden dabei von unabhängigen Temperaturfühlern erfasst. Durch die symmetrische Anordnung von Proben- und Referenzzelle wirken sich eventuelle Unzulänglichkeiten der thermischen Isolierung auf beide Zellen gleichermaßen aus, so dass daraus resultierende Messfehler weitestgehend ausgeschlossen werden.<sup>2</sup> Das Aufheizen erfolgt mit einer vor Messbeginn eingestellten Heizrate  $\frac{\Delta T}{\Delta t}$ , die die gewünschte Temperaturänderung  $\Delta T$  pro Zeiteinheit  $\Delta t$  angibt. Die Temperatur  $T$  des Systems ist damit durch

$$T = T_0 + \frac{\Delta T}{\Delta t} \cdot t$$

gegeben.  $T_0$  ist dabei die Temperatur zum Zeitpunkt  $t = 0$ .

Das Messprinzip der DSC-Methode erfordert nun, dass die Temperaturen von Probe ( $T^P$ ) und Referenz ( $T^R$ ) während der Messung gleich bleiben, d.h. es muss

$$T = T^P = T^R$$

gelten. Findet in der Probe eine endotherme Phasenumwandlung wie etwa das Schmelzen einer Lipidmembran statt, so muss die Probenzelle im Vergleich zur Referenzzelle stärker aufgeheizt werden, damit die beiden Temperaturen  $T^P$  und  $T^R$  gleich gehalten werden können. Die Heizleistung  $P^P$  für die Probenzelle ist jetzt also höher als die für die Referenzzelle ( $P^R$ ). Die daraus resultierende Differenz  $\Delta P$  der Heizleistungen ist die Messgröße des Differentialkalorimeters:

$$\Delta P = P^P - P^R$$

Diese Differenz in der Heizleistung kann in die Differenz der Wärmekapazitäten umgerechnet werden. Für die einer Zelle in einem bestimmten Zeitin-

---

<sup>2</sup>In der Praxis ist es aber meist doch notwendig, bei der Auswertung eine vom Gerät verursachte Nulllinie zu subtrahieren, um die ausschließlich dem untersuchten System zuzuschreibenden Größen zu ermitteln.

tervall  $\Delta t$  zugeführte Wärmemenge  $\Delta Q$  gilt nämlich gerade

$$\Delta Q = \int_t^{t+\Delta t} P(t) dt \approx P \cdot \Delta t,$$

wobei  $P$  in dem jeweils betrachteten kleinen Zeitintervall  $\Delta t$  als näherungsweise konstant angenommen wird (Diskretisierung). Die Wärmekapazität  $C$  für die Substanz in dieser Zelle ergibt sich dann zu

$$C = \frac{\Delta Q}{\Delta T} = P \cdot \frac{\Delta t}{\Delta T}.$$

Für die Differenz der Wärmekapazitäten in Proben- und Referenzzelle gilt somit

$$\Delta C = C^P - C^R = P^P \cdot \frac{\Delta t}{\Delta T} - P^R \cdot \frac{\Delta t}{\Delta T} = \Delta P \cdot \frac{\Delta t}{\Delta T}.$$

Die Messgröße  $\Delta P$  ist also direkt proportional zur Differenz der Wärmekapazitäten  $\Delta C$ , die dann bei bekannter Heizleistung  $\frac{\Delta T}{\Delta t}$  ermittelt werden kann. Nur diese Differenz der Wärmekapazitäten ist von Interesse, denn sie zeigt eine Umwandlung in der Probenzelle an. Dies gilt allgemein sowohl bei konstantem Druck als auch bei konstantem Volumen.<sup>3</sup>

Bei Betrachtung der Situation konstanten Drucks, wie sie für die meisten Versuche im Labor normalerweise gegeben ist, erweist sich die Einführung der Enthalpie  $H$ <sup>4</sup> als zweckmäßig. Auch Prozesse in Tieren und Pflanzen laufen unter konstantem Druck ab, weshalb die Enthalpie eine wichtige Größe zur Beschreibung biologischer Vorgänge ist. Die Wärmekapazität bei konstantem Druck  $C_p$  kann dann als

$$C_p = \frac{\Delta Q}{\Delta T} = \frac{\Delta H}{\Delta T} \text{ bzw. } C_p = \frac{\delta Q}{dT} = \frac{dH}{dT}$$

ausgedrückt werden. Durch Integration über die Differenz der Wärmekapazitäten bei konstantem Druck  $\Delta C_p$

$$H = \int_{T_A}^{T_B} \Delta C_p(T) dT$$

---

<sup>3</sup>Kalorimetrische Messungen bei konstantem Volumen werden in sogenannten „Bombenkalorimetern“ durchgeführt, die durch sehr starke Systemwände eine Vergrößerung des Volumens während der Messung verhindern. Diese werden zu Untersuchung biologischer Proben allerdings auf Grund ihrer geringen Sensitivität nicht eingesetzt.

<sup>4</sup>Die Enthalpie  $H$  ist definiert als  $H = U + p \cdot V$ , wobei  $U$  die innere Energie,  $p$  der Druck und  $V$  das Volumen des betrachteten Systems ist. Für das Differential der Enthalpie ergibt sich somit  $dH = dU + p \cdot dV + V \cdot dp$ , bei konstantem Druck also  $dH = dU + p \cdot dV$ . Der erste Hauptsatz der Thermodynamik  $dU = \delta Q - p \cdot dV$  (bei Betrachtung reiner Volumenarbeit) kann so bei konstantem Druck unter Verwendung der Größe Enthalpie auch als  $\delta Q = dU + p \cdot dV = dH$  formuliert werden. (Das Symbol  $\delta$  deutet hierbei wie üblich an, dass  $Q$  keine Zustandsgröße ist und daher mathematisch nicht durch ein totales Differential beschrieben werden kann.)

lässt sich daher die Enthalpie für eine in der Probe stattfindende Phasenumwandlung bestimmen. Dabei bezeichnen  $T_A$  und  $T_B$  Anfang und Ende der Umwandlung.

Da man davon ausgehen kann, dass am Schmelzpunkt  $T_m$  in der Mitte der Umwandlung beide Phasen nebeneinander existieren und gleichwahrscheinlich sind, gilt für die freie Enthalpie  $G = H - T \cdot S$  hier gerade  $\Delta G = 0$ .<sup>5</sup> Es ist also

$$\Delta G = \Delta H - T_m \cdot \Delta S = 0$$

und somit

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T_m},$$

d.h. durch die Messung des Schmelzpunktes (der bei Umwandlungen mit einem symmetrischen Wärmekapazitätsprofil auf das Maximum der gemessenen Wärmekapazität fällt) und die Ermittlung der Umwandlungsenthalpie lässt sich auch die Entropieveränderung bestimmen.

Durch eine kalorimetrische Messung kann man also die komplette thermodynamische Information eines Systems ermitteln, was die Kalorimetrie zu einem äußerst mächtigen Werkzeug macht.

Für diese Arbeit wurde das Differentialkalorimeter VP-DSC der Firma MicroCal Incorporated (Northampton/MA, USA) verwendet. VP steht dabei für Valerian Plotnikov, dem maßgeblichen Entwickler dieses Gerätes. Für eine detaillierte technische Beschreibung sei auf Plotnikov et al. [54] verwiesen. Das VP-DSC gehört zu den empfindlichsten Kalorimetern, die derzeit erhältlich sind. Darüber hinaus zeichnet es sich dadurch aus, dass die Zellen ein sehr kleines Volumen von 0,5152 ml besitzen, was für die Untersuchung biologischer Proben, die oft nur in äußerst geringen Mengen verfügbar sind, von entscheidender Bedeutung ist. Gerade dieses kleine Zellenvolumen hat für die Biokalorimetrie einen Durchbruch bewirkt, weshalb diese Geräteklasse auch den Namen Mikrokalorimeter trägt. Die Zellen selbst sind aus Tantal gefertigt, einem Metall, das ähnliche Korrosionseigenschaften hat wie Glas. Dies hat den großen Vorteil, dass man zur Reinigung auch starke Säuren verwenden kann. Gleichzeitig sind natürlich die für ein Metall üblichen und für den Kalorimeterbetrieb unabdingbaren guten Wärmeleiteigenschaften gegeben. Die Ansteuerung des VP-DSCs und die Erfassung der Messwerte erfolgt über einen Computer mit von MicroCal entwickelter Steuersoftware. Innerhalb dieser kann man etliche Messparameter festlegen. Dies sind zunächst

---

<sup>5</sup>Für die Umwandlung eines Zweizustandsprozesses  $A \rightleftharpoons B$  (mit entarteten Zuständen) gilt nach Boltzmann  $\frac{[A]}{[B]} = \exp\left(\frac{\Delta H - T \cdot \Delta S}{k \cdot T}\right) = \exp\left(\frac{\Delta G}{k \cdot T}\right)$ , wobei  $[A]$  bzw.  $[B]$  die Wahrscheinlichkeit des jeweiligen Zustandes und  $k$  die Boltzmannkonstante ist. Am Schmelzpunkt in der Mitte der Umwandlung ist also  $\frac{[A]}{[B]} = 1$  und somit  $\Delta G = 0$ .

natürlich Anfangs- und Endtemperatur der Messung sowie die Heizrate  $\frac{\Delta T}{\Delta t}$ . Desweiteren kann man das Zeitintervall bestimmen, in der die (fast) kontinuierlich erfassten Messwerte zu einem Wert gemittelt werden („Filter“) sowie eine Voreinstellung für den „Feedback“, d.h. wie schnell das Gerät auf beginnende Veränderungen reagiert. Hier kann man einen hohen, mittleren, niedrigen oder keinen Feedback wählen, abhängig davon, ob man eine scharfe Umwandlung mit einem ausgeprägtem Signal erwartet (dann empfiehlt sich die Einstellung hoch) oder eher eine gleichmäßige breite Umwandlung (dann sollte man einen niedrigen oder keinen Feedback wählen, um nicht unnötig das Rauschen zu verstärken). Für reine Lipidsysteme wurden in dieser Arbeit immer  $5^\circ\text{C}/h$  als Heizrate und eine hoher Feedback gewählt, für die biologischen Proben  $20^\circ\text{C}/h$  sowie kein Feedback, da sie in geringerer Konzentration vorlagen und grundsätzlich eine breitere Umwandlung zeigen. Als Filter hat sich eine Standardeinstellung von 10 Sekunden bewährt.

## 2.2 Viskosimetrie

Die Viskosität ist ein Maß der Zähflüssigkeit, das für laminare Strömungen definiert ist (also für Strömungen, deren Geschwindigkeitsvektoren parallel zueinander ausgerichtet sind). Durch die Messung der Viskosität einer Lösung können auf makroskopischer Ebene strukturelle Veränderungen innerhalb dieser Lösung untersucht werden.

Die Moleküle einer Lösung üben aufeinander Kräfte aus und beeinflussen sich so gegenseitig derart, dass die Verschiebung einer gedachten Flüssigkeitsschicht gegenüber einer anderen Flüssigkeitsschicht nur unter Aufwendung einer Kraft möglich ist (siehe Abbildung 2.2). Die Wechselwirkung der Moleküle bewirkt also, dass bei der Verschiebung der beiden Schichten zueinander eine Reibungskraft auftritt, die für die Verschiebung der Flüssigkeitsschichten überwunden werden muss. Diese Reibungskraft  $F_{\text{Reibung}}$  wird dabei umso größer, je größer die zu bewegendende Fläche  $A$  sowie die Geschwindigkeitsdifferenz  $dv$  und je kleiner der Abstand  $dx$  zwischen den Schichten ist. Es gilt daher:

$$F_{\text{Reibung}} = \eta A \frac{dv}{dx}$$

Der Proportionalitätsfaktor  $\eta$  wird Viskosität oder auch Viskositätskoeffizient genannt. Er hat die Dimension  $\text{Pa} \cdot \text{s}$  ( $1 \text{ Pa} \cdot \text{s} = 1 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Die Viskosität ist also ein Maß für den Widerstand, den die Flüssigkeitsschicht gegen ihre relative Verschiebung aufbringt. Newton hat es 1687 mit folgenden Worten formuliert: „Viscosity is a lack of slipperiness between adjacent layers of fluid.“ Neben der Viskosität verwendet man häufig auch die rezi-

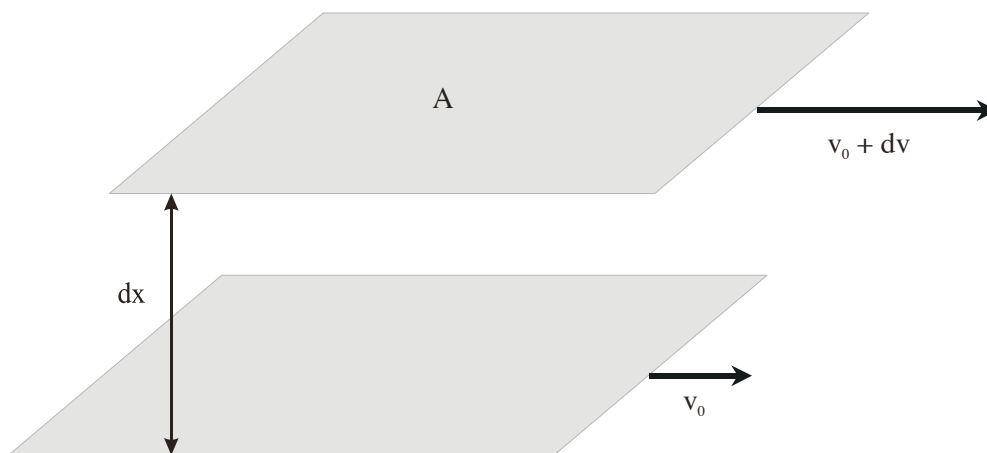


Abbildung 2.2: Zur Definition der Viskosität: Eine Flüssigkeitsschicht der Fläche  $A$  wird mit einer um  $dv$  größeren Geschwindigkeit bewegt als eine zu ihr parallel im Abstand  $dx$  bewegte (oder ruhende) Schicht. Dabei tritt eine Reibungskraft auf, die proportional zur Fläche  $A$  und  $\frac{dv}{dx}$  ist.

proke Größe Fluidität  $\phi = \frac{1}{\eta}$  und auch die kinematische Viskosität  $\nu = \frac{\eta}{\rho}$ , in der die Dichte  $\rho$  des Mediums berücksichtigt wird.

Flüssigkeiten, deren Viskosität  $\eta$  unabhängig vom Geschwindigkeitsgradienten  $\frac{dv}{dx}$  ist, bezeichnet man als newtonsche Flüssigkeiten. Nichtnewtonsche Flüssigkeiten hingegen verändern ihre Viskosität in Abhängigkeit vom Geschwindigkeitsgradienten. Da das in dieser Arbeit verwendete Rotationsviskosimeter immer mit konstanter Geschwindigkeit betrieben wurde, war es für den Vergleich einzelner Messungen nicht erforderlich, diese Unterscheidung explizit zu beachten.

Die Viskosität ist stark temperaturabhängig (sie nimmt mit steigender Temperatur ab). Dies gilt insbesondere für wässrige Lösungen, was mit der besonderen Clusterstruktur<sup>6</sup> des Wassers zusammenhängt. Da meist der Ein-

<sup>6</sup>Wasser zeigt einige Besonderheiten im physikochemischen Verhalten, was mit dem starken Dipolcharakter des  $\text{H}_2\text{O}$ -Moleküls zusammenhängt. Diese Polarisation hat nicht nur rein elektrostatische Konsequenzen, sondern führt auch zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Solche Wasserstoffbrücken können mit Atomen anderer Moleküle gebildet werden, insbesondere sind jedoch die Verknüpfungen der Wassermoleküle untereinander von Bedeutung. Neben der Bindung zu den beiden Wasserstoffatomen im eigenen Molekül bilden die Sauerstoffatome eines jeden Wassermoleküls noch jeweils zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu Wasserstoffatomen in anderen Wassermolekülen, so dass sich eine Tetraederstruktur ausbildet. Unterhalb des Schmelzpunktes ist diese Tetraederstruktur zu einem regelmäßigen Gitter fortgesetzt, was die Kristallstruktur des Eises ausmacht. Mit infrarotspektroskopischen Messungen kann man zeigen, dass diese Struktur beim Schmelzen

fluss der gelösten oder suspendierten Stoffe auf die Viskosität von Interesse ist, um Aussagen über eventuelle strukturelle Veränderungen bei unterschiedlichen Temperaturen in eben diesen Stoffen machen zu können, benutzt man oft eine der folgenden Größen:

- relative Viskosität:  $\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_L}$  (einheitenlos)
- spezifische Viskosität:  $\eta_{spez} = \frac{\eta - \eta_L}{\eta_L} = \eta_{rel} - 1$  (einheitenlos)
- reduzierte Viskosität:  $\eta_{red} = \frac{\eta_{spez}}{c}$  (in  $\frac{l}{mol}$ )
- Grenzviskosität:  $[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{spez}}{c}$  (in  $\frac{l}{mol}$ )

Dabei ist  $\eta$  die Viskosität der Lösung oder Suspension,  $\eta_L$  die Viskosität des reinen Lösungsmittels und  $c$  die molare Konzentration des gelösten (oder suspendierten) Stoffes. Mit steigender Konzentration dieses gelösten (oder suspendierten) Stoffes steigt auch die Viskosität. Um dem Rechnung zu tragen, wird bei der reduzierten Viskosität und bei der Grenzviskosität (auch intrinsische Viskosität genannt) dieser Einfluss mit berücksichtigt, idealerweise in einer Grenzwertbildung  $c \rightarrow 0$  bei der Grenzviskosität (durch Messung bei mehreren Konzentrationen und Extrapolation nach  $c = 0$ ). Für die hier beschriebene Aufgabenstellung hat sich aber die Benutzung der relativen Viskosität als ausreichend und am praktikabelsten erwiesen.

Für diese Arbeit wurde ein Viskosimeter vom Typ Low Shear 30 der Firma Contraves (Zürich, Schweiz), heute ProRheo (Althengstett, Deutschland) verwendet. Es handelt sich hierbei um ein Rotationsviskosimeter. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 2.3 gezeigt. Ein drehbarer Topf enthält die Probe. Von dieser wird etwa 1 ml benötigt. Der Probentopf wird durch einen Synchronmotor mit konstanter Geschwindigkeit angetrieben. In der Probe hängt ein Pendel an einem Torsionsdraht. Probentopf und Messpendel haben Zylinderform. Durch die Drehung des Probentopfes wird über die Probenflüssigkeit ein Drehmoment auf den Pendelkopf ausgeübt. Dies führt zum Verdrehen des Torsionsdrahtes. An diesem ist ein Spiegel angebracht. Ein darauf einfallender Lichtstrahl wird durch die Drehung abgelenkt, was in einem dahintergeschalteten fotoelektrischen Detektor einen Stromfluss erzeugt. Die Stärke dieses Stromflusses ist proportional zur Auslenkung

---

des Eises nicht vollständig abgebaut wird. Auch oberhalb des Schmelzpunktes existieren noch Bereiche untereinander verbundener Wassermoleküle von eisartiger Struktur, deren Größe mit steigender Temperatur abnimmt. Die genaue Größe dieser Cluster ist umstritten. In Schmelzpunktnähe enthalten sie 90 bis 650 Moleküle, in der Nähe des Siedepunktes hingegen nur noch 25 bis 75 [55]. Ein Ausdruck dieser Verringerung der Clustergröße ist gerade die starke Abnahme der Viskosität des Wassers mit steigender Temperatur.

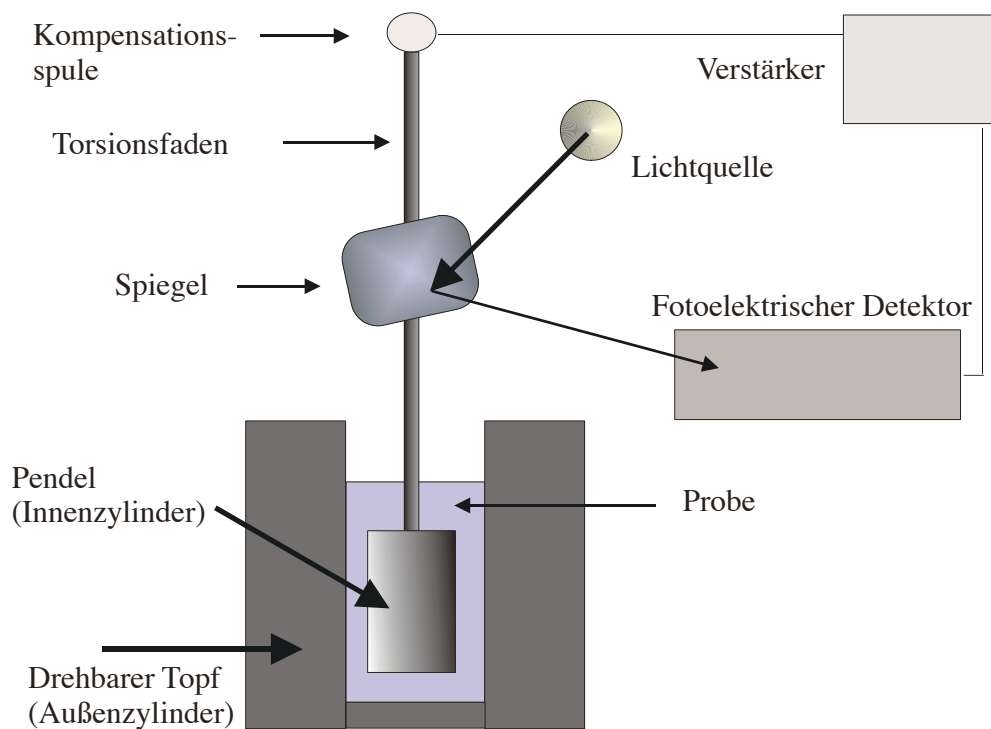


Abbildung 2.3: Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines Rotationsviskosimeters. Das in der Probe hängende Pendel erfährt durch die Rotation des Probentopfes ein Drehmoment. Dieses wird über eine fotoelektrische Anordnung mittels eines Regelstromes, der in einer Spule ein entgegengesetzt gerichtetes Drehmoment erzeugt, ausgeglichen. Die Größe des Regelstromes ist direkt proportional zur Viskosität.



des Lichtstrahls. Daher wird er auch als Regelstrom über einen Verstärker und eine Kompensationsspule verwendet. Das so elektromagnetisch erzeugte Drehmoment ist im Gleichgewicht zum mechanischen Drehmoment. Diese Gegensteuerung erfolgt so schnell, dass sich der Torsionsdraht in der Praxis kaum bewegt. Der Regelstrom ist somit ein Maß für das Drehmoment am Pendelkopf in der Probe und ist daher proportional zur Viskosität. Seine Größe stellt den Messwert des Gerätes dar. Bei Kenntnis der Torsionskonstante und der Gerätedimensionen kann so die Viskosität bestimmt werden. Da diese absolute Viskosität für die Betrachtung eventueller temperaturbedingter struktureller Veränderungen innerhalb der Probe von geringerem Interesse ist, wird in dieser Arbeit grundsätzlich die relative Viskosität (also des Quotienten  $\eta/\eta_L$ , siehe oben) betrachtet, die zudem direkt aus der Größe des Regelstromes ohne explizite Kenntnis der Gerätekonstanten bestimmt werden kann. Die Ansteuerung des Gerätes und das Erfassen der Messwerte erfolgt rechnergestützt. Die Schnittstelle zwischen Rechner und Gerät übernimmt eine A/D-D/A-Wandlerkarte PCI-1200 der Firma National Instruments (Austin/TX, USA). Die nötige Software wurde mit der von National Instruments entwickelten grafischen Programmiersprache Labview im Rahmen von [56] entwickelt.

Die Proben wurden in der Regel in einem Temperaturbereich von ca.  $2^\circ\text{C}$  bis  $45^\circ\text{C}$  gemessen. Die Temperierung erfolgte dabei über ein Wasserbad des Typs RK20 der Firma Lauda (Königshofen, Deutschland). Dieses erlaubt eine Genauigkeit in der Temperaturansteuerung von etwa  $0,02^\circ\text{C}$ . Ein Thermometer vom Typ PM 135-A von Waldsee Electronic (Bad Waldsee, Deutschland) misst die Temperatur zusätzlich direkt unter dem Probenkopf mit einer Genauigkeit von etwa  $0,002^\circ\text{C}$ .

Um das schnelle Austrocknen der Probe bei der Messung mit höheren Temperaturen zu verhindern, wurde das Viskosimeter mit einem Wasserkanal erweitert, der um den Probenbereich herum verläuft. Dieser Wasserkanal ist an das Wasserbad angeschlossen und daher immer identisch zur Probe temperiert. Im Wasserkanal befindet sich zusätzlich Schaumstoff, der sich voll Wasser saugt. Der ganze Probenbereich einschließlich Wasserkanal wird nun von einer Plexiglashaube abgedeckt. So herrscht bei steigender Temperatur über der Probe eine hohe Luftfeuchtigkeit, was ihr Austrocknen deutlich verlangsamt (siehe Abbildung 2.4).



Abbildung 2.4: Diese Fotografie zeigt den besonderen Aufbau des verwendeten Viskosimeters. Deutlich zu erkennen ist der extra angebrachte Wasserkanal, in dem sich Schaumstoff befindet, das während der Messung mit Wasser getränkt ist. In Kombination mit einer Plexiglashaube, die den Probenbereich einschließlich diesem Wasserkanal abdeckt, wird so dafür gesorgt, dass die Luft über der Probe stets eine hohe Luftfeuchtigkeit besitzt und somit beim Erhöhen der Temperatur die Probe nicht austrocknet. Weiterhin kann man den Probentopf mit dem darin hängenden Pendel erkennen. In dem darüber foldenden größeren Aufbau befindet sich der Torsionsfaden.

## 2.3 Materialien und Probenpräparation

### Reine Lipidvesikel

**Verwendete Lipide und andere Chemikalien** Für die Experimente mit reinen Lipidvesikeln wurden zwei Lipidsorten verwendet:

- 1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DMPC)
- 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (DPPC)

Diese wurden von der Firma Avanti Polar Lipids (Alabaster/AL, USA) bezogen. Sie werden grundsätzlich tiefgefroren in Pulverform geliefert.

Die Lipide wurden in Puffer mit folgenden Bestandteilen gelöst:

- Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure-Diammoniumsalz (EDTA)
- 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethan-Sulfonsäure (HEPES)

EDTA ist ein Kalziumpuffer, der immer verwendet wurde. Er bindet stark an Kalziumionen und verhindert so deren Einfluss auf die Probe. Insbesondere geladene Lipide reagieren ausgesprochen sensibel auf Kalzium. Ohne Kalziumionen ist auch der Stoffwechsel vieler Mikroorganismen nicht möglich. Daher hat der Einsatz von EDTA den willkommenden Nebeneffekt, dass die Proben weniger leicht von solchen Mikroorganismen befallen werden. EDTA wurde von Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen. HEPES ist ein Puffer, der im pH-Bereich von ca. 7,0 bis 7,5 wirksam ist. Wenn die entsprechende Probe in diesem Bereich zu untersuchen war, wurde HEPES verwendet, ansonsten nur EDTA. HEPES zeichnet sich vor anderen Puffersubstanzen dadurch aus, dass es die Umwandlung von Lipiden nur äußerst minimal beeinflusst. Es stammt von Sigma-Aldrich (St. Louis/MO, USA).

Der pH-Wert wurde mit einem elektronischen pH-Meter der Firma WTW (Wien, Österreich) überprüft und eingestellt. Dies erfolgte wie üblich mittels  $\text{NaOH}_{(aq)}$  und  $\text{HCl}_{(aq)}$  (Baker, Deventer, Niederlande). Für die Untersuchung der Ionenabhängigkeit der Umwandlung in Membranen von *Escherichia coli* wurde  $\text{NaCl}$  (auch von Baker) verwendet. Für die Herstellung sämtlicher Proben bzw. Pufferlösungen wurde hochreines Wasser verwendet, das durch ein mehrstufiges chemisch aktives Filtersystem Milli-Q UF Plus der Firma Millipore (Eschborn, Deutschland) erzeugt wird. Gegenüber destilliertem Wasser hat dies den Vorteil, dass nicht nur Ionen, sondern beispielsweise auch organische Lösungsmittel oder Stoffwechselprodukte von Bakterien eliminiert werden.

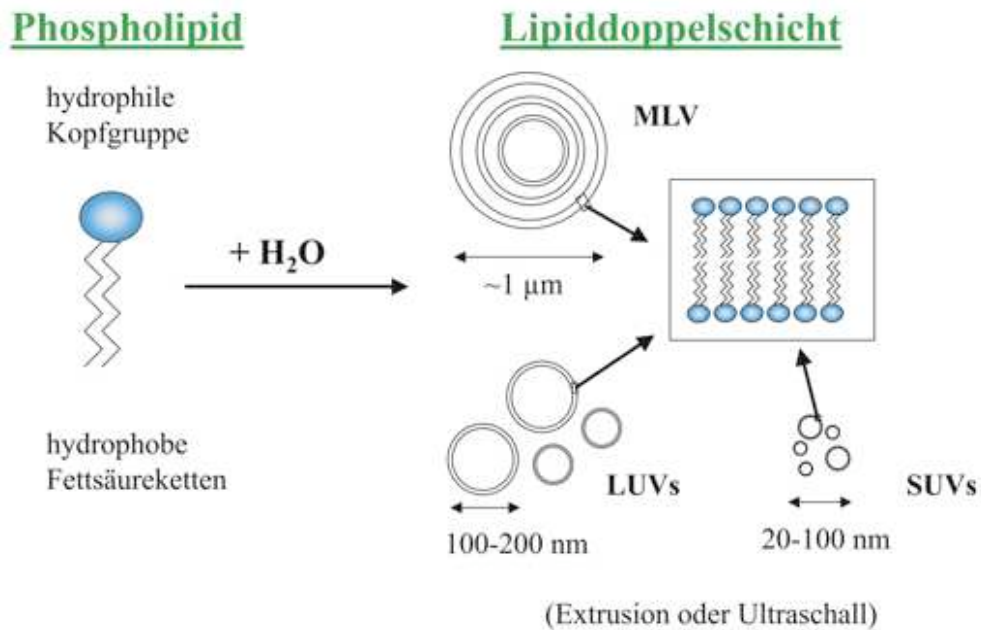


Abbildung 2.5: Wenn Lipide in Wasser gegeben werden formen sie auf Grund ihres amphiphilen Charakters in der Regel spontan multilamellare Vesikel. Mittels Ultraschall oder Extrusion ist es möglich, aus diesen multilamellaren Vesikeln (MLVs) unilamellare (LUVs oder SUVs) herzustellen.

Die Neurotransmitter Dopamin, Serotonin (beide als Hydrochlorid) und GABA sowie Koffein und Fluoxetin (auch als Hydrochlorid) wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis/MO, USA) bezogen. 1-0-Hexylglycerol wurde von Prof. H. Eibl (Abteilung Phospholipide, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Losartan (als Kaliumsalz) wurde von der Firma Merck/MSD Sharp & Dohme (Haar, Deutschland) ebenso freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

**Präparation von Lipidvesikeln** Wenn die hier benutzten Lipide in Wasser gegeben werden, bilden sie wie in Kapitel 1 beschrieben, spontan vesikuläre Aggregate. Dabei formen sich zunächst multilamellare Vesikel (MLVs), bei denen mehrere Lipiddoppelschichten konzentrisch übereinander liegen. Die Experimente in dieser Arbeit wurden hingegen alle mit unilamellaren Vesikeln durchgeführt. Diese unterteilt man je nach Größe in SUVs (*small unilamellar vesicles*) mit einem Durchmesser von etwa 20 bis 100 nm und LUVs (*large unilamellar vesicles*), die einen Durchmesser von ca. 100 bis 200

nm besitzen.<sup>7</sup> Unilamellare Vesikel kann man aus den multilamellaren auf unterschiedliche Weise erzeugen. SUVs entstehen dadurch, dass man die MLV-Dispersion Ultraschall aussetzt. LUVs kann man dadurch erzeugen, dass man die multilamellaren Vesikel mehrfach durch eine Polycarbonatmembran mit Poren definierter Größe presst (Extrusion). Bei einem Durchgang durch diese Poren reißen die Membranen der MLVs auf und fusionieren danach wieder zu kleineren Vesikeln. Wenn man dies oft genug macht, erhält man unilamellare Vesikel, deren Durchmesser mit einer gewissen Streuung dem der Poren entspricht. Mit dieser Technik wurden sämtliche Vesikel hergestellt. Praktisch wird dies in einem sogenannten Extruder durchgeführt. Dies ist ein einfaches Gerät, in dem die Polycarbonatmembran eingespannt wird. An beiden Enden kann man Spritzen anbringen, so dass die Lipiddispersion immer durch die Polycarbonatmembran „hin- und hergeschoben“ werden kann. Dabei ist es entscheidend, dass die Membran im fluiden Zustand ist, daher befindet sich die ganze Anordnung in einem durch ein Wasserbad temperierten Messingblock, der es ermöglicht, die Probe auf konstanter vorgegebener Temperatur zu halten. Für die Experimente dieser Arbeit wurden grundsätzlich Polycarbonatmembranen mit 100 nm Porendurchmesser gewählt. Die Lipiddispersionen wurden jeweils 25 mal durch diese Membran gedrückt. Der Extruder vom Typ LipoFast Basic und die zugehörigen Polycarbonatmembranen stammen von der Firma Avestin (Ottawa, Kanada).

Von sämtlichen Substanzen, deren Einfluss auf das Phasenverhalten der Lipidvesikel untersucht wurde, wurden wässrige Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen erstellt. Diese wurden 1:1 mit der (unilamellaren) Lipiddispersion vermischt, was dann die jeweilige Probe ergab. Die Lipidkonzentrationen betrugen dabei immer  $5 \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$ . Anstelle von  $\frac{\text{mmol}}{\text{l}}$  wird oft die gängige Schreibweise *mM* verwendet.

## Biologische Membranen

**Zytoplasmamembran von Escherichia coli** Escherichia coli XL1-blue wurde von Stratagene (La Jolla/CA, USA) bezogen. XL1-blue zeichnet sich durch eine Tetracyclinresistenz aus. Tetracyclin ist ein Antibiotikum, durch seinen Einsatz kann während des Züchtens die Entstehung anderer Bakterien verhindert werden. Das Heranwachsen der Bakterien erfolgt in Agar-Nährlösung. Für die Membranpräparation wird die Lösung mit Bakterien zunächst in eine French Press gegeben. Dies ist eine Maschine, die nach dem Prinzip eines Extruders arbeitet. Allerdings wird dabei ein Druck von 1500

---

<sup>7</sup>Es gibt auch noch GUVs (*giant unilamellar vesicles*) mit einem Durchmesser von bis zu mehreren Micrometern. Ihre Herstellung bedarf aber einer völlig anderen Technik und geht nicht den Weg über die MLVs.

bar verwendet. Anschließend wurden mehrere Zentrifugationsschritte durchlaufen, um die innere und die äußere Membran voneinander zu trennen und die Konzentration zu steigern. Die so aufkonzentrierten Proben wurde in dem oben beschriebenen EDTA-HEPES-Puffer suspendiert, bei basischen bzw. sauren pH-Werten wurde außer auf EDTA auf eine weitere Puffersubstanz verzichtet, um keinen unnötigen Einfluss auf das Phasenverhalten zu haben. Der pH-Wert wurde dann so genau wie möglich ohne Puffer eingestellt.

**Lungensurfactant und Sphingomyelin** Lungensurfactant ist der Oberflächenfilm der Lungenbläschen. Surfactant steht für *surface active agent*. In dieser Arbeit wurde nur der reine Lipidextrakt aus Rinderlungen untersucht, sogenanntes BLES (*bovine lipid extract surfactant*). Dieses wurde von Prof. F. Possmayer (University of Western Ontario, Toronto, Kanada) zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden dabei so genutzt wie sie geliefert wurden.

Sphingomyelin vom Schweinehirn wurde wie die künstlichen Lipide von Avanti Polar Lipids bezogen. Auch die Probenpräparation erfolgte in diesem Fall analog zu der der künstlichen Lipidvesikel.

# Kapitel 3

## Die untersuchten Systeme: Einführung - Ergebnisse - Diskussion

### 3.1 Der Einfluss kleiner Moleküle auf das Phasenverhalten von Lipiden

#### 3.1.1 Neurotransmitter

##### Einführung

Neurotransmitter sind die chemischen Botenstoffe des Nervensystems.<sup>1</sup> Es sind in der Regel kleine Moleküle, die in der Verbindungsstelle zweier Neuronen, der Synapse, wirksam werden. Ein präsynaptisches Neuron schüttet Transmitter in den synaptischen Spalt aus, was eine Änderung des Membranpotentials am postsynaptischen Neuron bewirkt. Neurotransmitter wirken dabei auf Rezeptoren. Dies sind Transmembranproteine, an deren extrazelluläre Seite sich der Transmitter bindet und so in der gängigen Vorstellung eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins bewirkt. Wenn der Rezeptor ein Ionenkanal ist, so führt das Binden des Neurotransmitters zum Öffnen oder Schließen des Kanals. Eine zweite Art Rezeptor ist an intrazelluläre „*second messenger*“-Kaskaden gekoppelt, die aber letztendlich auch auf einen Ionenkanal wirken und so das Membranpotential verändern. Neurotransmitter werden im Zellkörper (Soma) synthetisiert und dann zur Synapse transportiert, wo sie in Vesikeln eingeschlossen lagern. Wenn ein Aktionspotential diesen Bereich erreicht, führt ein Einstrom von Calciumio-

---

<sup>1</sup>Viele von ihnen kommen allerdings auch in anderen Teilen des Körpers vor.

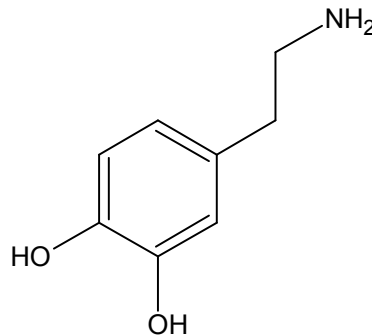


Abbildung 3.1: Strukturformel von Dopamin.

nen dazu, dass die synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran fusionieren und so die Neurotransmitter in den synaptischen Spalt diffundieren. Es gibt auch spezifische enzymatische Reaktionen, die zur Zerstörung oder zum „Recycling“ der Transmitter führen, denn ein Signal im synaptischen Spalt ist so lange wirksam wie der entsprechende Transmitter sich dort aufhält. Neurotransmitter können exzitatorisch (anregend) oder inhibitorisch (hemmend) wirksam sein, je nach dem, ob sie an der postsynaptischen Seite eine Depolarisation oder eine Hyperpolarisation hervorrufen.

**Dopamin** Dopamin ist einer der wichtigsten Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Es gehört zur Klasse der Catecholamine, das sind Verbindungen, die eine Amingruppe und einen Catecholkern (d.h. ein Benzenring mit zwei OH - Gruppen) enthalten. Dopaminsysteme sind im Gehirn für motorische Funktionen, Verhalten, Stimmung und Wahrnehmung mitverantwortlich. Dopamin kann sowohl exzitatorisch als auch inhibitorisch wirksam werden.

**Serotonin** Serotonin (chemischer Name 5-Hydroxytryptamin, kurz 5-HT) enthält zwei aromatische Ringe. Serotonerge Neuronen sind im Gehirn in Systeme involviert, die Stimmung und emotionales Verhalten sowie den Schlaf regulieren. Serotonin ist ein exzitatorischer Neurotransmitter. Es kommt aber nicht nur in den Neuronen des zentralen Nervensystems vor, sondern fast überall im Körper, beispielsweise auch im Darm, in der glatten Muskulatur und in Blutplättchen. Tatsächlich befinden sich nur 1 bis 2% des Gesamtkörpergehalts an Serotonin im Gehirn.



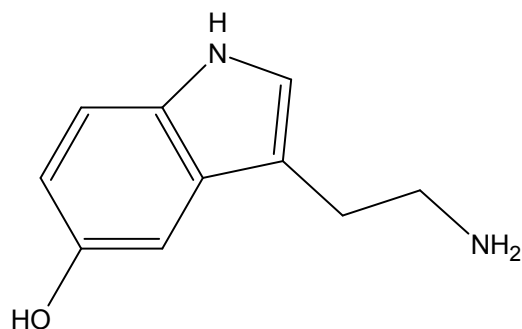


Abbildung 3.2: Strukturformel von Serotonin.

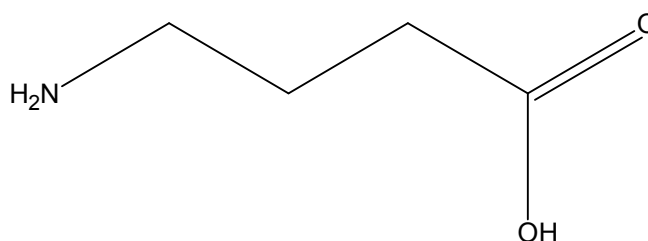


Abbildung 3.3: Strukturformel von GABA.

**GABA** GABA steht für  $\gamma$  - *Aminobutyric Acid* ( $\gamma$  - Aminobuttersäure). Synonyme Bezeichnungen sind auch 4-Aminobuttersäure und Piperidinsäure. GABA ist einer der hauptsächlichen inhibitorischen Neurotransmitter des Gehirns. Darüber hinaus ist er auch in der Retina anzutreffen.

### Experimentelle Ergebnisse

Es wurde der Einfluss von Dopamin, Serotonin und GABA auf die Schmelztemperatur von DMPC untersucht. Dopamin und Serotonin lagen als Hydrochlorid vor. In wässriger Lösung ergaben sich daher pH-Werte von jeweils 4,8. Bei höheren pH-Werten sind die Lösungen nicht stabil. Die pH-Werte in synaptischen Vesikeln liegen auch um  $pH = 5$ . Die vorliegende Situation entspricht also auch der physiologischen Realität. Der pH-Wert der wässrigen GABA-Lösung lag bei  $pH = 6,5$ . Da DMPC ein zwitterionisches Lipid ist, ist keine Verschiebung der Umwandlung allein wegen des sauren pH-Wertes zu erwarten. In zusätzlich durchgeführten Kontrollexperimenten konnte dies bestätigt werden.

Dopamin und Serotonin zeigen markante Verschiebungen der Phasenum-

wandlung. Es wurde jeweils eine DMPC-Konzentration von 5 mM verwendet und unterschiedliche Neurotransmitterkonzentrationen, im Falle von Dopamin von 5 mM bis 200 mM, für Serotonin von 25 mM bis 100 mM. GABA wurde lediglich mit einer Konzentration von 100 mM verwendet. Die dabei zu erkennende minimale Verschiebung muss nicht unbedingt auf den Einfluss von GABA zurückzuführen sein. Auch durch die Verwendung von 0,5 mM EDTA oder kleine Verunreinigungen kann es bereits zu minimalen Verschiebungen kommen. Dopamin konnte die Umwandlung um bis zu  $2,5^{\circ}\text{C}$  in Richtung tieferer Temperaturen verschieben. Dies erfolgte bei der maximalen Konzentration von 200 mM. Serotonin konnte bereits bei einer Konzentration von 100 mM die Umwandlung um  $3,25^{\circ}\text{C}$  nach unten verschieben. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide Moleküle besser an die fluide als an die gelförmige Phase binden. Die stärkere Wirkung von Serotonin lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass dieses Molekül über zwei Ringe verfügt und sich so besser in der Membran „verankern“ kann. Bei beiden Substanzen verändert sich mit zunehmender Konzentration zudem das Umwandlungsprofil, insbesondere verschwindet die für DMPC so charakteristische Doppelspitze.<sup>2</sup> Die hier verwendeten Konzentrationen der Neurotransmitter entsprechen derjenigen, die auch in synaptischen Vesikeln vorliegen [57][58][59].

## Diskussion

Bei den hier vorgestellten Ergebnissen stellt sich sofort die Frage nach einer möglichen biologischen Bedeutung, denn dass eine Verschiebung der Umwandlungstemperatur der Lipide in der postsynaptischen Membran auftritt, steht sicher außer Frage, da die durch den synaptischen Spalt diffundierenden Neurotransmitter ja nicht nur die Rezeptorproteine treffen, sondern zwangsläufig auch die umgebende Lipidmembran. Falls durch diese Verschiebung die Körpertemperatur gerade im Bereich der Umwandlung liegt, so hätte das erhebliche Folgen für die Umgebung der Proteine, denn die mechanischen Eigenschaften einer Membran verändern sich im Schmelzregime sehr stark, wie in Kapitel 1 beschrieben. Solche Veränderungen könnten Konformationsänderungen der Proteine induzieren und so ihre Funktion mitbestimmen. Beispielsweise berichten Woodward et al. [60] über eine schwache Aktivierung von Serotoninrezeptoren durch Dopamin. Nach gängiger Lehrmeinung, bei der Transmitter-Rezeptor-Wechselwirkungen streng spezifisch sind, sollte

---

<sup>2</sup>Diese Aufspaltung der Hauptumwandlung in zwei Spitzen ist eine Besonderheit von DMPC, die sonst kein Lipid zeigt. Die Ursache dafür ist nicht verstanden. Diese Aufspaltung ist äußerst sensibel gegenüber Zusätzen in der Lipiddispersion. Zwei gleich große Spitzen sieht man nur, wenn sich DMPC in reinem Wasser befindet. Schon geringe Zusätze an Puffersubstanz lassen in der Regel die linke Spitze kleiner werden.

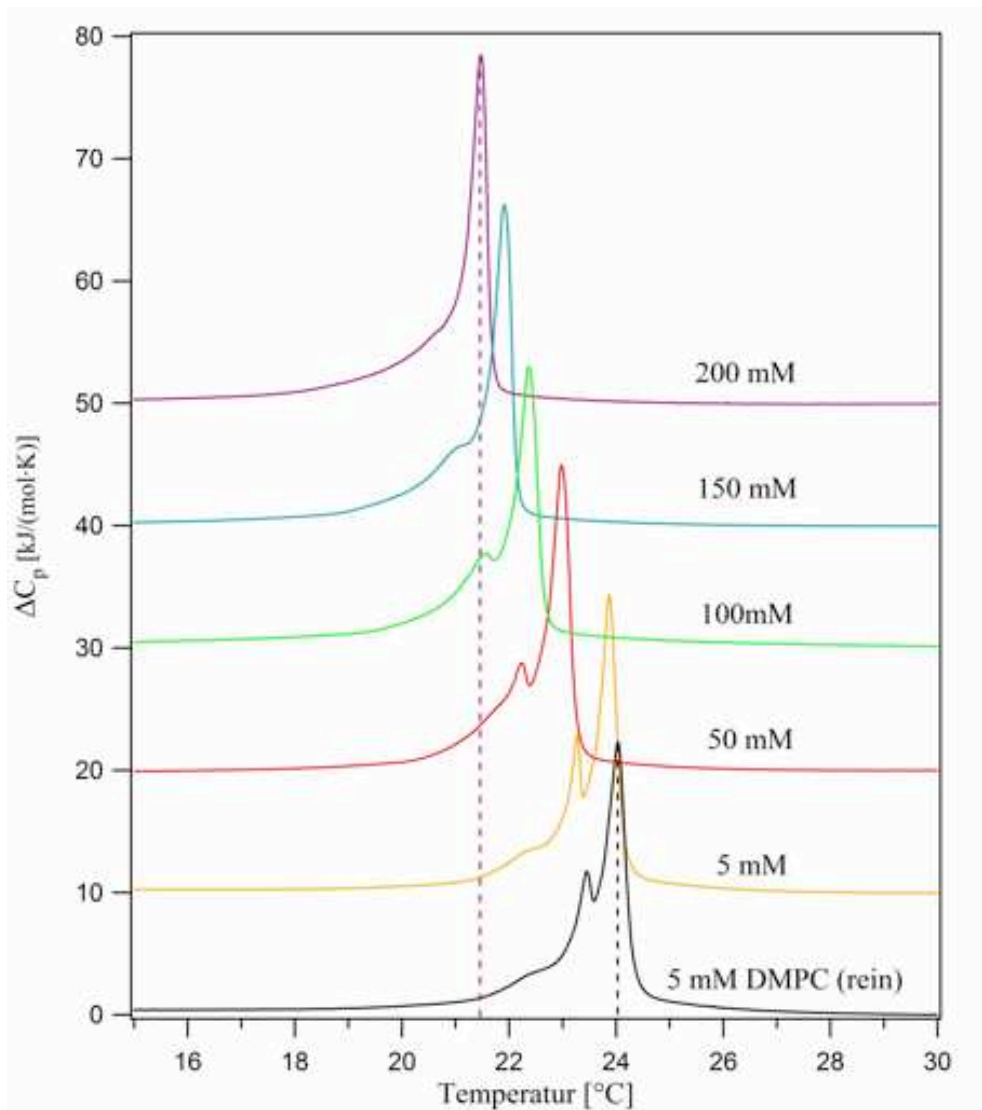


Abbildung 3.4: Die Abbildung zeigt die Wärmekapazitätsprofile von einer 5 mM DMPC-Suspension mit unterschiedlich hohen Konzentrationen des Neurotransmitters Dopamin. Dopamin verursacht eine deutliche Verschiebung der Schmelztemperatur, im Falle von 200 mM Dopamin um ca. 2,5°C. Zur besseren Unterscheidung der unterschiedlichen Messungen wurden die Graphen jeweils mit einer y-Achsen-Verschiebung versehen.

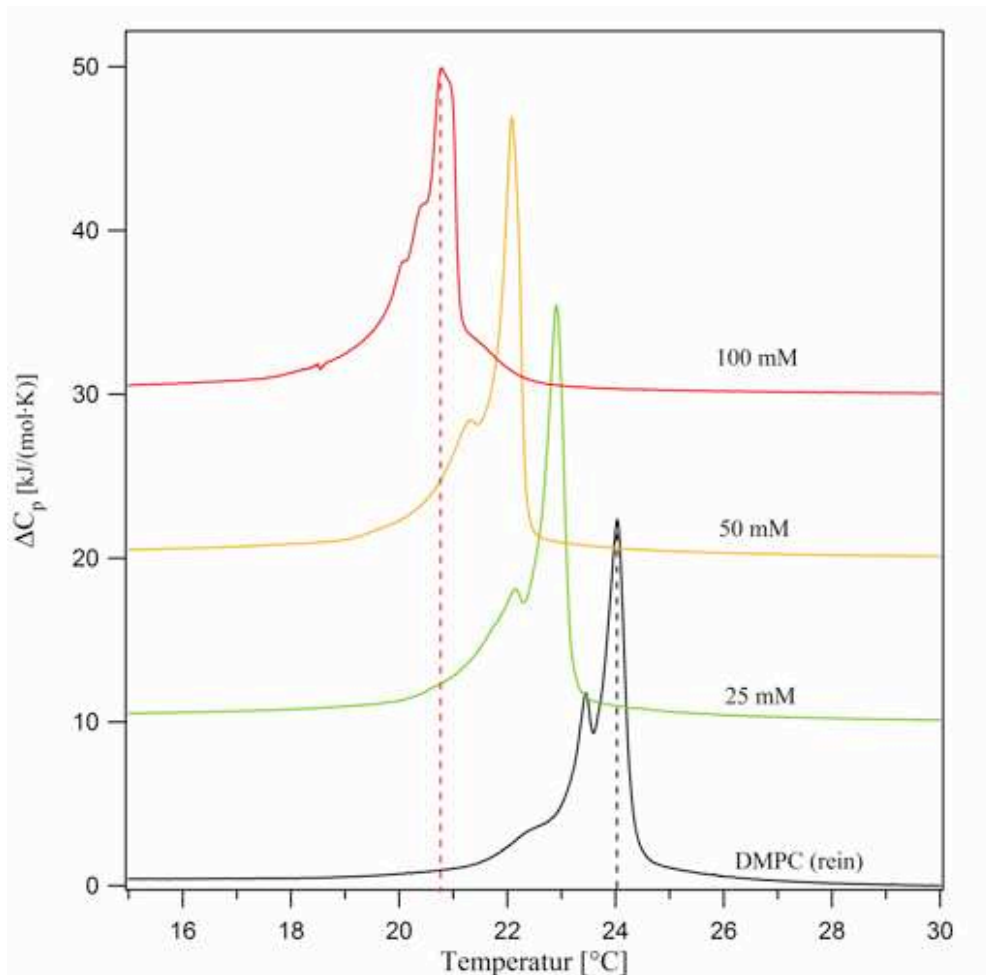


Abbildung 3.5: Die Abbildung zeigt die Wärmekapazitätsprofile von einer 5 mM DMPC-Suspension mit unterschiedlich hohen Konzentrationen des Neurotransmitters Serotonin. Serotonin verursacht eine stärkere Verschiebung der Schmelztemperatur als Dopamin, bei 100 mM bereits um ca. 3,25°C. Zur Steigerung der Übersichtlichkeit wurden die einzelnen Graphen wieder mit einer y-Achsen-Verschiebung versehen.

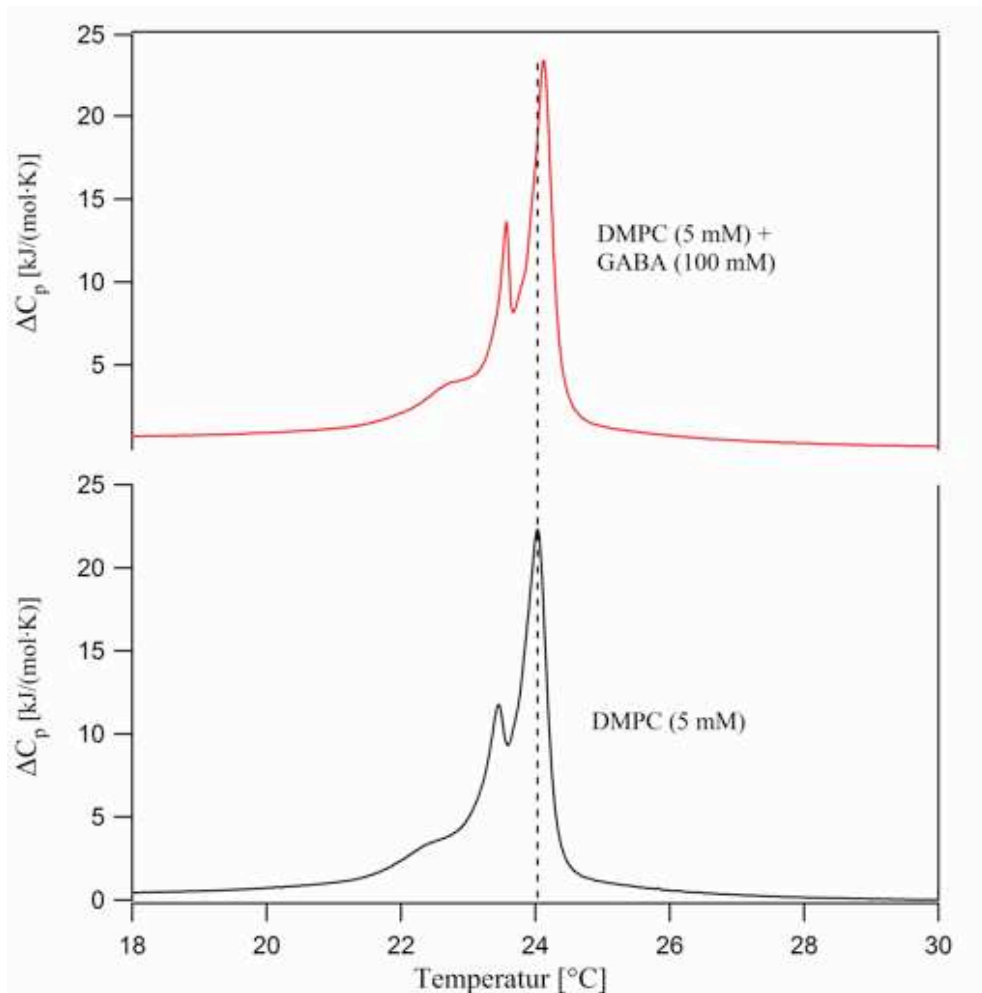


Abbildung 3.6: Die Abbildung zeigt das Wärmekapazitätsprofil einer 5 mM DMPC-Suspension mit 100 mM GABA im Vergleich zu der von reinem DMPC. Die minimale Verschiebung der Schmelztemperatur ist nicht zwingend auf den Einfluss von GABA zurückzuführen, da solch kleine Verschiebungen mitunter durch Verunreinigungen verursacht werden können.

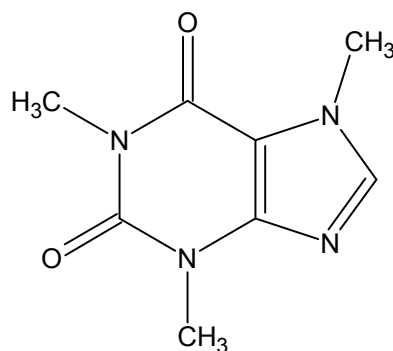


Abbildung 3.7: Strukturformel von Koffein.

dies eigentlich nicht geschehen. Es ist auch noch interessant anzumerken, dass GABA, das keine Verschiebung der Schmelztemperatur bewirkte, ein schnell wirkender Neurotransmitter ist, was bedeutet, dass er direkt an einen Rezeptor koppelt. Dopamin und Serotonin hingegen, die starke Verschiebungen in der Umwandlungstemperatur zeigen, sind langsame Neurotransmitter, d.h. sie wirken über sogenannte G-Proteine bzw. „*second-messenger*“-Kaskaden. Das bei diesem „Umweg“ eventuell auch die Lipidmembran eine Rolle spielen könnte, ist eine interessante Vorstellung.

### 3.1.2 Koffein

#### Einführung

Koffein (chemischer Name 1,3,7-Trimethylxanthin, die Strukturformel ist in Abbildung 3.7 wiedergegeben) ist der am weitesten verbreitete Stimulant des zentralen Nervensystems, was zweifelsohne damit zusammenhängt, dass Koffein der einzige legale Vertreter dieser Klasse ist. Der Genuss von Tee und Kaffee ist auf der gesamten Welt üblich. Eine durchschnittliche Tasse Kaffee enthält etwa 100 mg Koffein.

#### Experimentelle Ergebnisse

Koffein kann nur einen kleinen Einfluss auf das Schmelzprofil von DMPC ausüben. Bei einer Konzentration von 50 mM Koffein (auf 5 mM DMPC) verschiebt sich die Spitze des Wärmekapazitätsprofils lediglich um etwa ein halbes Grad nach unten (siehe Abbildung 3.8). Die Form der Umwandlung bleibt erhalten.

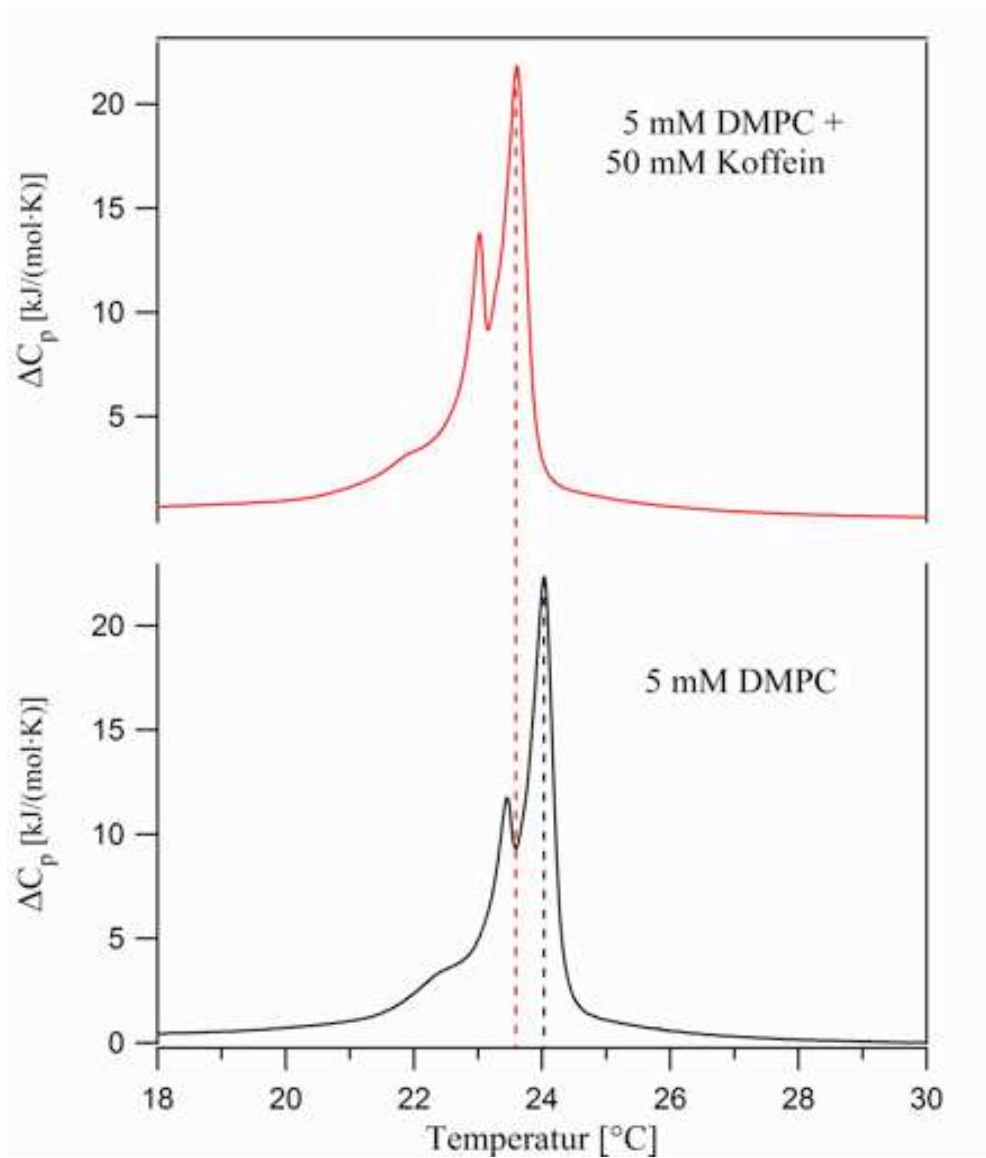


Abbildung 3.8: Wärmekapazitätsprofil von 5 mM DMPC unter dem Einfluss von 50 mM Koffein. Die Umwandlung wird hierbei um lediglich ein halbes Grad in Richtung tieferer Temperaturen verschoben.

## Diskussion

Da Koffein auf den ersten Blick eine ähnliche Molekülstruktur hat wie Serotonin (Zweiringstruktur), erstaunt zunächst der geringere Einfluss auf die Umwandlungstemperatur. Serotonin verschiebt diese bei gleichen Konzentrationen genau doppelt so stark. Bei genauerer Betrachtung zeigen die Moleküle doch deutliche Unterschiede. Koffein hat zwei Sauerstoffatome, die mittels Doppelbindungen mit dem 6er-Ring verbunden sind. Dies führt zu einem starken Dipolcharakter, der die Sauerstoffatome im Bereich der Kopfgruppen positioniert und ein tiefes Eindringen des restlichen Moleküls in die Membran verhindert. Serotonin andererseits hat nur eine polare OH-Gruppe und am entgegengesetzten Molekülende zudem noch eine Kohlenwasserstoffkette. Die Ringstruktur und insbesondere die Kohlenwasserstoffkette kann daher tiefer in die Membran eindringen und so eine stärkere Störung in der Lipiddoppelschicht verursachen.

Die Wirkung von Koffein beruht im Wesentlichen auf der Hemmung des Enzyms Phosphodiesterase, die cyclo-AMP zu AMP abbaut (Adenosinmonophosphat). Dadurch bleibt die über cyclo-AMP als *second messenger* ausgelöste Adrenalinwirkung länger erhalten. Eine andere Theorie besagt, dass Koffein als Konkurrent zu Adenosin um dessen Bindungsstellen kämpft (also ein Adenosinantagonist ist) und damit die Aktivität dieser Nervenzellen hemmt. Wird Adenosin durch Koffein verdrängt, wird das Nervensystem angeregt. Inwiefern in diesen Erklärungsmodellen die Phasenverschiebung der Lipidmembran eine Rolle spielen kann, bleibt abzuwarten. Ein indirektes Einwirken auf Membranproteine ist aber immer denkbar.

### 3.1.3 Fluoxetin („Prozac“)

#### Einführung

Fluoxetin ist ein Antidepressivum, das zu der Klasse der selektiven Serotoninwiederaufnahmehemmer (*selective serotonin reuptake inhibitors*, SSRIs) gehört. Seine prinzipielle Wirkung soll es daher seiner Fähigkeit verdanken, die Wiederaufnahme von Serotonin in die Präsynapse hinauszuzögern. Durch die so erreichte längere Verweildauer von Serotonin im synaptischen Spalt verstärkt sich die Wirkung auf die postsynaptischen Serotoninrezeptoren. Fluoxetin wurde bei *Eli Lilly and Company* synthetisiert und erstmals 1974 von Wong et al. beschrieben [61]. Auf den amerikanischen Markt kam es 1987 unter der Bezeichnung Prozac und startete Anfang der neunziger Jahre eine für ein Psychopharmakon beispiellose Erfolgsgeschichte. Beflügelt durch aggre-



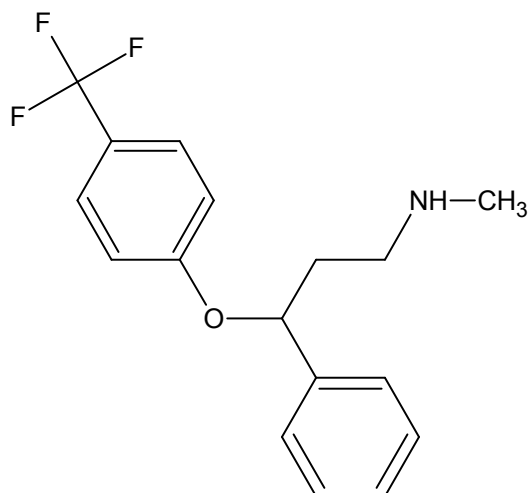


Abbildung 3.9: Strukturformel von Fluoxetin.

sives Marketing, vielfache Medienberichte und auch Buchveröffentlichungen<sup>3</sup> mutierte das in den USA nicht verschreibungspflichtige Prozac trotz seines hohen Preises bald zu einer Art „Life-Style-Droge“, die auch von vielen Politikern und Managern genommen wurde und wird, um leistungsfähiger und motivierter zu sein. Die im Vergleich zu der älteren Generation von Antidepressiva zwar geringeren aber durchaus nicht unerheblichen Nebenwirkungen wurden dabei gezielt unterbewertet. Erst als sich Ende der neunziger Jahre Berichte über im Zusammenhang mit Prozac stehende Suicide häuften, nahm die Popularität ab. In Deutschland ist Fluoxetin (hier unter dem Namen Fluctin auf dem Markt) ein verschreibungspflichtiges Medikament und hat daher auch keine vergleichbare Verbreitung finden können.

### Experimentelle Ergebnisse

Aufgrund seiner Struktur (siehe Abbildung 3.9), die eine Kombination von Ring- und Kettenstruktur darstellt, ist Fluoxetin ein aussichtsreicher Kandidat für eine Wechselwirkung mit der Lipidmembran. Durch seine beiden relativ weit auseinanderliegenden aromatischen Ringe kann dieses Molekül vermutlich eine substanzielle Störung in die Lipiddoppelschicht einbringen, während sich die Kohlenwasserstoffkette (mit einem Stickstoffatom), räum-

<sup>3</sup>Newsweek widmete Fluoxetin am 26. März 1990 eine ausführliche Titelgeschichte. Elizabeths Wurtzels Autobiographie „Prozac Nation“, in der sie schonungslos ihre langjährige Depression in eindringlichen Details beschreibt und wie Prozac ihr schließlich eine enorme Hilfe war, wurde ein Bestseller.

lich dazwischen liegend, zwischen die Fettsäureketten der Lipide „schiebt“. Diese Erwartung wird durch die kalorimetrischen Messungen bestätigt. Von allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Substanzen konnte Fluoxetin die mit Abstand ausgeprägteste Verschiebung der Schmelztemperatur bewirken (siehe Abbildung 3.10). Die Umwandlung von DMPC mit einer Konzentration von 5 mM liegt unter dem Einfluss von Fluoxetin in einer vergleichsweise niedrigen Konzentration von 5 mM bei fast  $10^{\circ}\text{C}$  unter dem normalen Wert. Die Form des Wärmekapazitätsprofils verändert sich dabei auch leicht, insbesondere wird die für DMPC charakteristische Doppelspitze unterdrückt (was bei anderen Substanzen nur bei hoher Konzentration der Fall war).

## Diskussion

Das Erklärungsmuster für die antidepressive Wirkung von Fluoxetin basiert auf einem alten Modell zur Entstehung von Depressionen, der sogenannten Serotoninhypothese. Ihr zufolge ist die Aktivität serotonerger Neuronen der Schlüssel für unterschiedliche Stimmungen: Hohe Aktivität bedingt Euphorie, niedrige Niedergeschlagenheit. Depression ist dann von einer chronisch tiefen Serotoninausschüttung verursacht. Selektive Serotoninwiederaufnahmehemmer (SSRIs) wie Fluoxetin beeinflussen die Aktivität des Serotonintransporter (5-HTT), ein Protein, das für die Wiederaufnahme des Serotonins in die Synapse und somit die Entfernung aus dem synaptischen Spalt zuständig ist. Dieser Grundsätzlichen Vorstellung zur Wirkung widersprechen allerdings etliche Fakten. So müsste in gesunden Personen die Einnahme von SSRIs zu Euphorie führen und die Verringerung des Serotoninspiegels durch gezielte Diät eine Depression auslösen. Dies ist allerdings nicht der Fall. Weiterhin ist auch in depressiven Patienten keine zeitliche Korrelation zwischen der antidepressiven Wirkung, die erst 2 bis 6 Wochen nach Start der Medikamenteneinnahme auftritt, und den physiologischen Vorgängen der Serotoninwiederaufnahmehemmung, die bereits nach Stunden eintritt, vorhanden. Die Wirksamkeit von sogenannten atypischen Antidepressiva wie Tianeptin, die die Serotoninwiederaufnahme sogar fördern anstatt zu hemmen, kann innerhalb dieses Modells auch nur schwerlich erklärt werden. Diese Beobachtungen führen manche Autoren (siehe etwa [62]) dazu, nach anderen Wirkungspunkten von Fluoxetin zu suchen. So wurde beispielsweise berichtet [63], dass Fluoxetin Acetylcholinrezeptoren blockiert, die nichts mit dem serotonergen System zu tun haben. Unter diesem Licht erscheint das hier gezeigte Ergebnis einer immensen Veränderung der Lipidmembran unter Fluoxetineinfluss äußerst interessant. Einmal mehr könnte hier ein Rezeptorprotein durch die umgebende Lipidmembran beeinflusst werden, vergleichbar mit der bereits oben zitierten Beobachtung, dass Serotoninrezeptoren auf Dopamin reagieren kön-

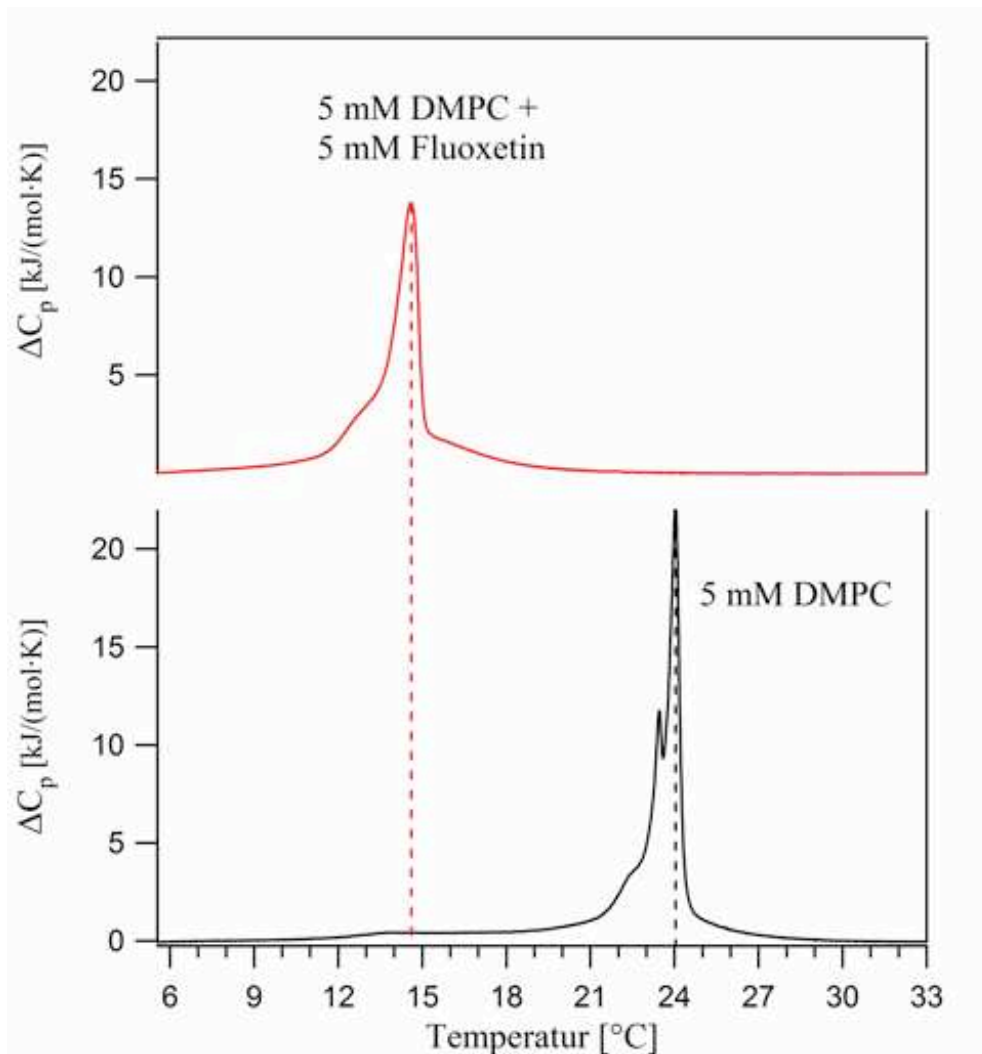


Abbildung 3.10: Einfluss von Fluoxetin auf die Schmelztemperatur von DMPC. Von allen in dieser Arbeit untersuchten Substanzen konnte Fluoxetin den mit Abstand markantesten Einfluss zeigen. Es verursacht bei einer vergleichsweise geringen Konzentration von 5 mM (auf 5 mM DMPC) eine Verschiebung der Umwandlung um fast 10°C zu niedrigeren Temperaturen.

nen [60].

### 3.1.4 Hexylglycerol

#### Einführung

**Blut-Gehirn-Schranke** Die Blut-Gehirn-Schranke ist eine physikalische Barriere im Blutkreislaufsystem und hindert viele Substanzen daran, ins Gehirn und zentrale Nervensystem zu gelangen. Die Tatsache, dass es eine solche Schranke gibt, wurde zum ersten Mal von Paul Ehrlich am Ende des 19. Jahrhunderts beobachtet. Ehrlich war Bakteriologe und untersuchte die Anfärbetechniken für unterschiedliche Organe. Dabei beobachtete er, dass - wenn er einen Farbstoff injizierte - alle Organe angefärbt wurden mit Ausnahme des Gehirns. 1913 injizierte Edwin Goldmann (einer von Ehrlichs Studenten) einen Farbstoff direkt ins Rückgrad. In diesem Fall färbte sich das Gehirn, während der Rest des Körpers frei von Farbstoff blieb. Damit war die Existenz einer Art von Barriere zwischen zentralem Nervensystem und dem Rest des Körpers etabliert. Die Ursache dieser Barriere liegt nicht in einer speziellen zusätzlichen Membran, sondern in den Blutgefäßen selbst, wie erstmals in den sechziger Jahren mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konkret gezeigt werden konnte. Die Blutgefäße des Körpers sind mit flachen Zellen (den sogenannten Endothelialzellen) ausgekleidet, die zwischen ihnen kleine Spalten (sogenannte Fenestrierungen) haben. Durch diese können die zahlreichen Substanzen des Körpers zwischen Blutbahn und Geweben hin- und herwechseln. Im Gehirn sind die Endothelialzellen wesentlich dichter gepackt, was zur Folge hat, dass fast nichts durch sie hindurchtreten kann. Dies zeigt sich beispielsweise auch im elektrischen Widerstand, der hier bis zu  $8000 \text{ Ohm}\cdot\text{cm}^2$  betragen kann, während er im Rest des Körpers üblicherweise zwischen etwa 3 und  $33 \text{ Ohm}\cdot\text{cm}^2$  liegt.

Kurzkettige Alkylglycerole wie das hier untersuchte 1-0-Hexylglycerol (die Strukturformel ist in Abbildung 3.11 wiedergegeben) besitzen die bemerkenswerte Eigenschaft, dass sie nach intraarterieller Injektion für kurze Zeit die Blut-Gehirn-Schranke öffnen [64]. Dies eröffnet die Möglichkeit, Medikamente wie etwa Antitumorwirkstoffe in das Gehirn zu bringen, die sonst nicht die Blut-Gehirn-Schranke passieren können.

#### Experimentelle Ergebnisse

1-0-Hexylglycerol zeigt einen starken Einfluss auf die Umwandlung von DPPC. Die Schmelztemperatur wird sehr ausgeprägt zu niedrigeren Temperaturen verschoben. Hexylglycerol bindet somit gut an die fluide Lipidphase. Die

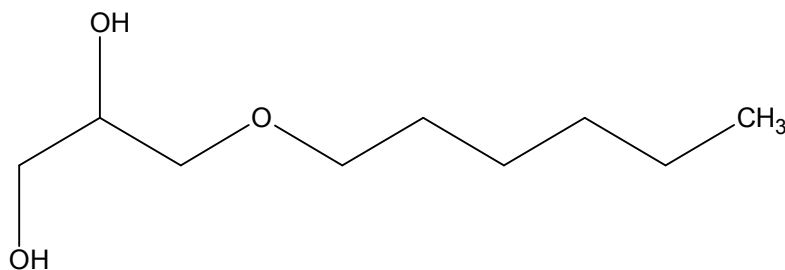


Abbildung 3.11: Strukturformel von 1-O-Hexylglycerol.

Verschiebung des Schmelzpunktes beträgt dabei in der höchsten untersuchten Konzentration von 40 mM Hexylglycerol (auf 5 mM DPPC) etwa  $12^{\circ}\text{C}$ . Die Umwandlung selbst verbreitert sich mit zunehmender Konzentration von Hexylglycerol etwas, bei 20 mM und 40 mM ist zudem eine Art Ausläufer am oberen Ende der Umwandlung im Wärmekapazitätsprofil zu erkennen.

## Diskussion

Da durch Hexylglycerol die Blut-Gehirn-Schranke für sämtliche Substanzen durchlässig wird, bedeutet dies, dass die Endothelialzellen selbst durchlässig werden und nicht etwa spezielle Transportsysteme wie sie es für Nährstoffe, die ins Gehirn gelangen sollen gibt, nun eventuell auch andere ausgesuchte Substanzen mit durch die Zellen schleusen. Es erscheint sehr wahrscheinlich, dass diese gesteigerte Permeabilität etwas mit der Phasenumwandlung der Lipide in den Membranen der Endothelialzellen zu tun hat. Wie bereits beschrieben, nimmt die Permeabilität der Lipiddoppelschicht im Bereich der Umwandlung grundsätzlich stark zu [15][16][17]. Das starke Vermögen von Hexylglycerol, eine Verschiebung der Phasenumwandlung zu bewirken, könnte bedeuten, dass die Endothelialmembran gerade in den Bereich ihrer Umwandlung verschoben wird. Die lediglich kurze Zeitspanne, in der die Blut-Gehirn-Schranke geöffnet ist, lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass das Hexylglycerol schnell wieder abgebaut wird, denn die Blut-Gehirn-Schranke basiert nicht nur auf der dichten Packung der Endothelialzellen, sondern auch auf einem speziellen Enzymsystem. So würde die Konzentration von Hexylglycerol in der Membran durch enzymatischen Abbau bald wieder abnehmen, was eine erneute Verschiebung der Phasenumwandlung in Richtung Ausgangsposition (in einer gewissen Distanz von der herrschenden Temperatur) zur Folge hätte.

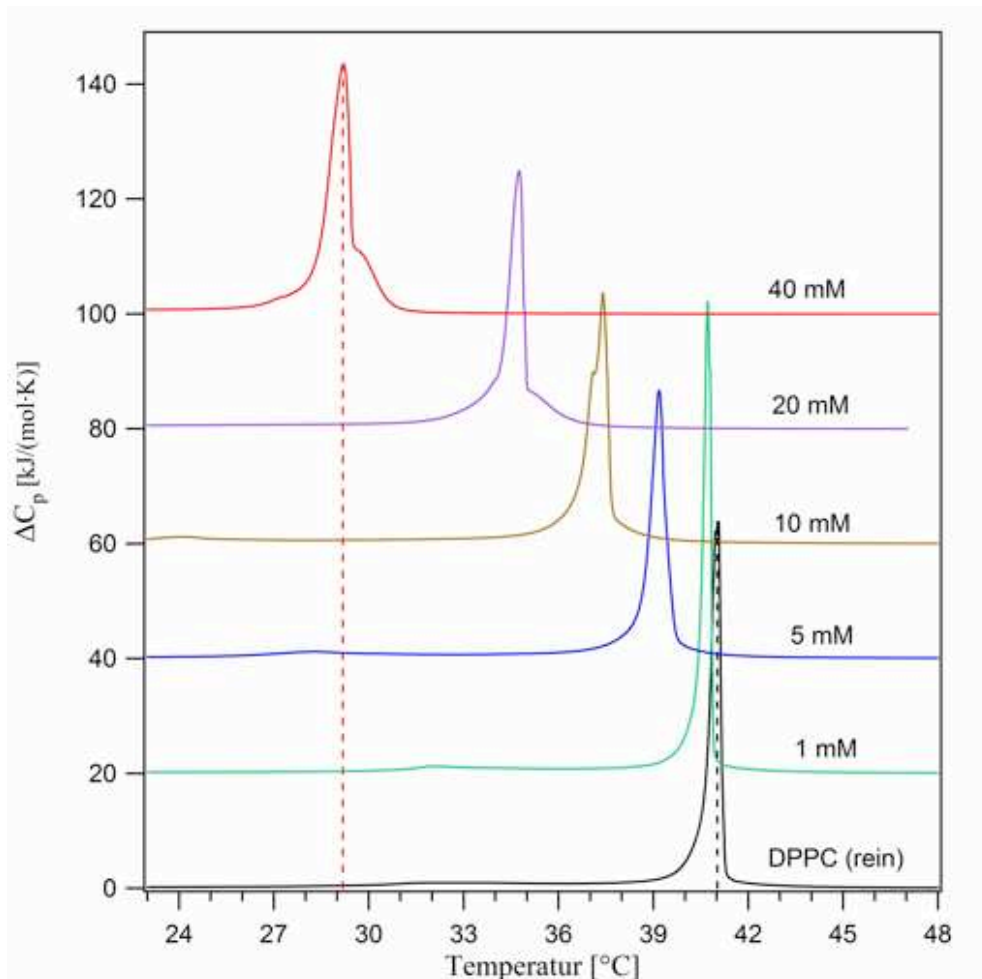


Abbildung 3.12: Einfluss von 1-O-Hexylglycerol in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Schmelztemperatur von DPPC. Hexylglycerol vermag die Umwandlung sehr stark in Richtung niedriger Temperaturen zu verschieben, im Falle von 40 mM Hexylglycerol um fast genau  $12^{\circ}\text{C}$  (DPPC-Konzentration ist 5 mM).

### 3.1.5 Losartan

#### Einführung

Losartan ist ein blutdrucksenkendes Medikament. Seine Wirkung wird darauf zurückgeführt, dass es hochspezifisch an einen bestimmten Rezeptor bindet. Hierbei handelt es sich um den sogenannten Angiotensin-II-Rezeptor  $AT_1$ . Angiotensin II ist ein Peptid, das als Endprodukt in einer enzymatischen Kaskade des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) auftritt. Dieses reguliert die Natrium- und Wasserbalance in den Blutgefäßen und den Blutdruck. Angiotensin II wird dabei eine Schlüsselrolle zugeschrieben. Es ist verantwortlich für die Verengung der Gefäße und damit den Anstieg des Blutdrucks. Angiotensin II wirkt auf zwei Rezeptoren auf der Zellmembran,  $AT_1$  und  $AT_2$ . Sämtliche bekannten physiologischen Effekte werden über den  $AT_1$ -Rezeptor vermittelt, also auch der Anstieg des Blutdruckes. Die Funktion des  $AT_2$ -Rezeptors ist bis jetzt unbekannt. Losartan blockiert den Effekt von Angiotensin II auf den  $AT_1$ -Rezeptor. Durch die Besetzung dieses Rezeptors werden alle wesentlichen biologischen Wirkungen von Angiotensin II, die zur Entstehung von Bluthochdruck beitragen können, antagonisiert, was Losartan zu einem hochwirksamen Medikament macht. Es wurde in Deutschland 1995 zugelassen. Die Strukturformel ist in Abbildung 3.13 wiedergegeben. Losartan liegt in der üblichen Form als Kaliumsalz vor. Dies hat zur Folge, dass es in wässriger Lösung eine negative Ladung trägt.

#### Experimentelle Ergebnisse

Die Abbildungen 3.15 bis 3.18 zeigen das Wärmekapazitätsprofil in Verbindung mit der Viskosität (relativ zu Wasser) einer 5 mM DMPC-Dispersion mit unterschiedlich hohen Konzentrationen von Losartan. Abbildung 3.14 zeigt die Referenzmessung mit reinem DMPC. Losartan wurde in den Konzentrationen 3 mM, 10 mM, 15 mM und 20 mM verwendet. Die Wärmekapazitätsprofile haben mit dem ursprünglichen der reinen DMPC-Dispersion nicht mehr viel gemeinsam, sie zeigen ein völlig anderes Verhalten. Schon bei der Probe mit lediglich 3 mM Losartan erkennt man eine Aufspaltung der Umwandlung, eine scharfe Spitze bei 20 °C und ein breiterer Bereich, der sich bis etwa 25°C erstreckt. Dieses Verhalten findet man bei der Probe mit 10 mM Losartan wieder, wobei die beiden Maxima der Wärmekapazität nun weiter auseinander liegen und einen Bereich von etwa 17°C bis 27°C abdecken. Ab einer Losartankonzentration von 15 mM erkennt man drei Spitzen im Schmelzprofil, bei 20 mM ist die dritte Spitze in der Mitte nun auch äußerst deutlich erkennbar. Die gesamte Umwandlung erstreckt sich bei dieser Konzentration nun über einen Bereich, der von ca. 14°C bis 30°C reicht.

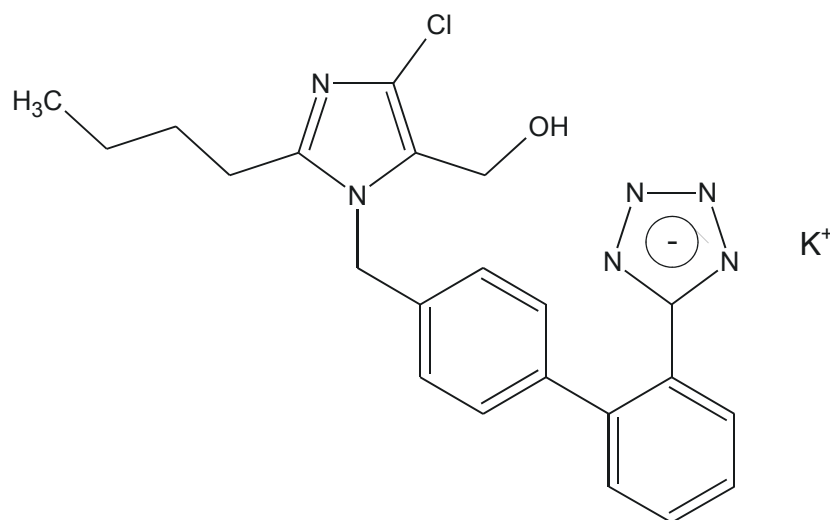


Abbildung 3.13: Strukturformel von Losartan. Losartan ist in der üblichen Verbindung (in der es auch als Medikament benutzt wird) ein Kaliumsalz. In wässriger Lösung trägt es daher eine negative Ladung.

Die Umwandlungsenthalpie  $\Delta H$  bleibt bei allen Konzentrationen in etwa gleich. Parallel zu dieser Verbreiterung der Umwandlung mit der Herausbildung mehrerer Wärmekapazitätsmaxima steigt die Viskosität der Dispersion an. Dabei liegen Anfang und Ende der erhöhten Viskosität exakt bei den Temperaturen, bei denen auch der verbreiterte Bereich im Wärmekapazitätsprofil zu finden ist. Bei Beginn der 3-Spitzen-Aufspaltung (also bei einer Losartankonzentration von 15 mM) kann man auch in den Viskositätsmessungen eine zusätzliche Abstufung erkennen. Die absolute Viskositätserhöhung ist in diesen Fällen besonders hoch und erreicht im Fall von 20 mM Losartan den Faktor vier verglichen mit einer reinen DMPC-Dispersion.

Über die Aufspaltung des Wärmekapazitätsprofils wurde auch in [65] und [66] berichtet, dabei konnte die 3-Spitzen-Bildung aber bei weitem nicht so klar aufgelöst werden. Die exakte Übereinstimmung der kalorimetrischen Ergebnisse mit der Zunahme der Viskosität konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden.

## Diskussion

Losartans molekulare Struktur aus mehreren Ringen mit angrenzender Kohlenwasserstoffkette lässt eine Wechselwirkung mit der Membran erwarten. Da Losartan eine negative Ladung trägt, wird diese in die Lipiddoppelschicht mit eingebracht. Damit ergeben sich Parallelen zu Lipiden, die von sich aus eine



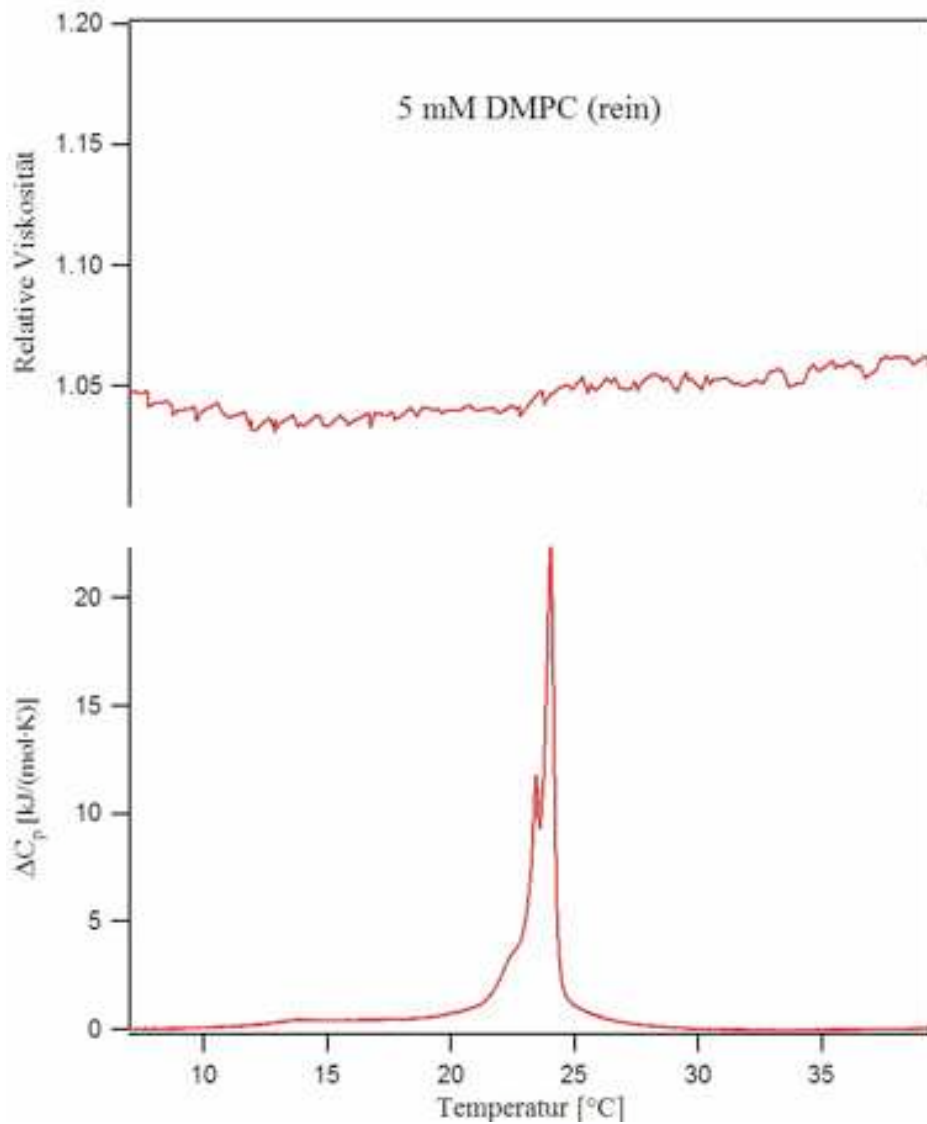


Abbildung 3.14: Wärmekapazitätsprofil und Viskositätsmessung einer reinen 5 mM (unilamellaren) DMPC-Suspension. Diese Messung dient zum Vergleich mit den folgenden, die zusätzlich zu DMPC unterschiedlich hohe Konzentrationen von Losartan enthalten.

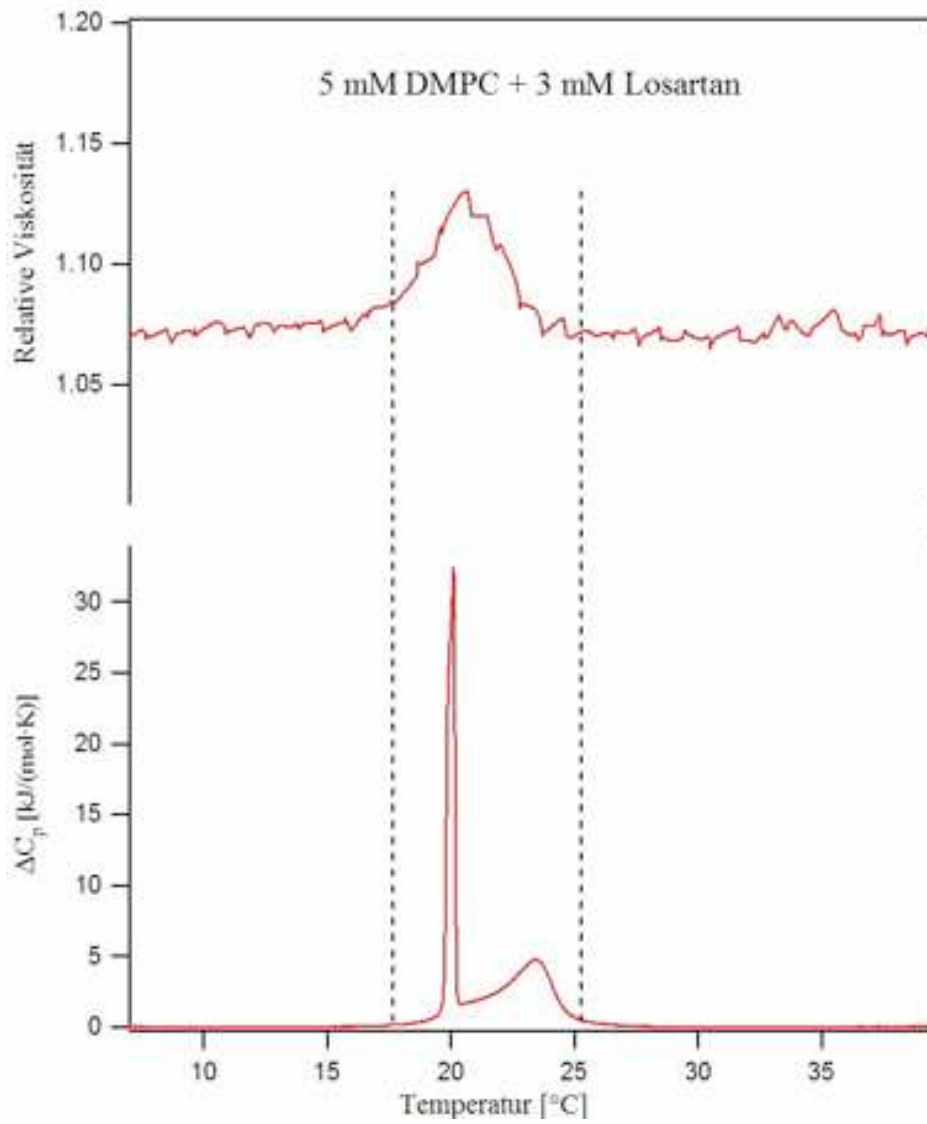


Abbildung 3.15: Viskositäts- und Wärmekapazitätsprofil von 5 mM DMPC mit 3 mM Losartan.

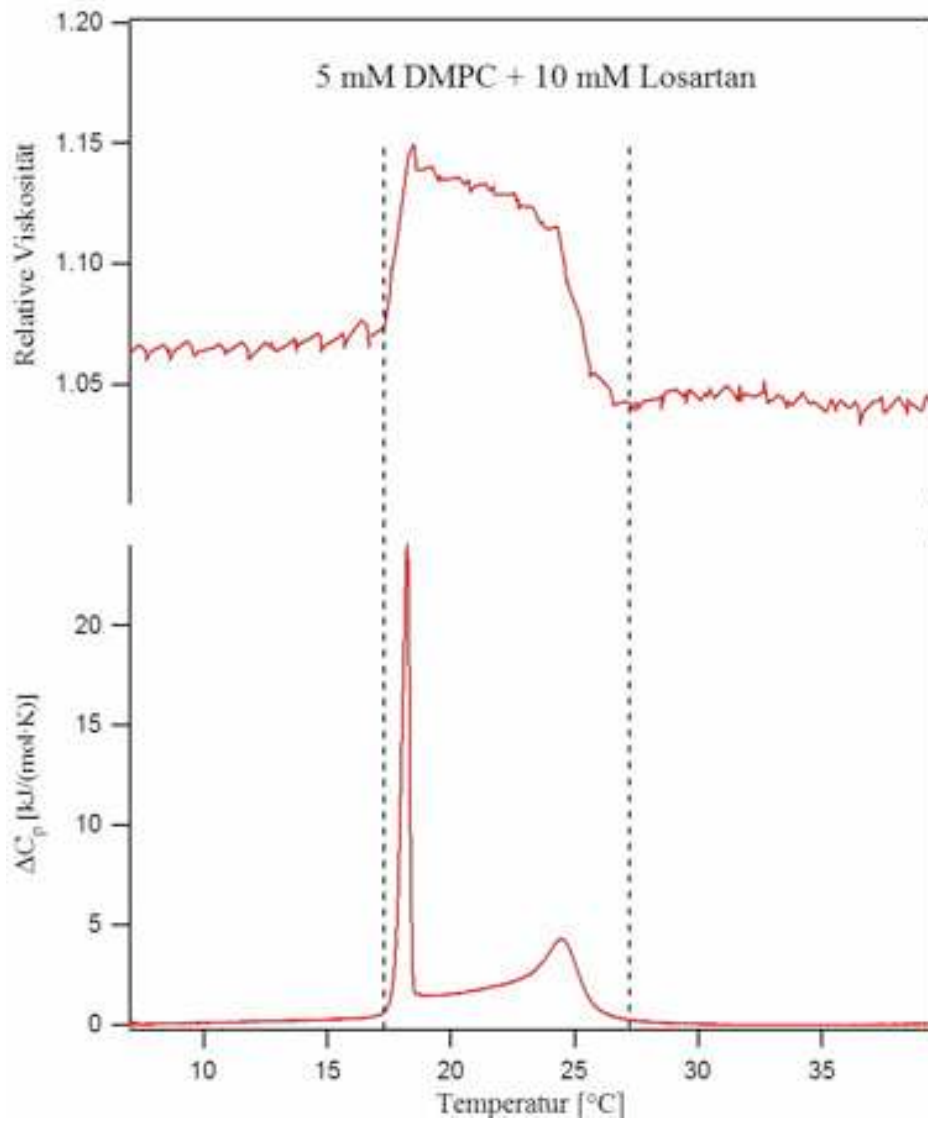


Abbildung 3.16: Viskositäts- und Wärmekapazitätsprofil von 5 mM DMPC mit 10 mM Losartan.

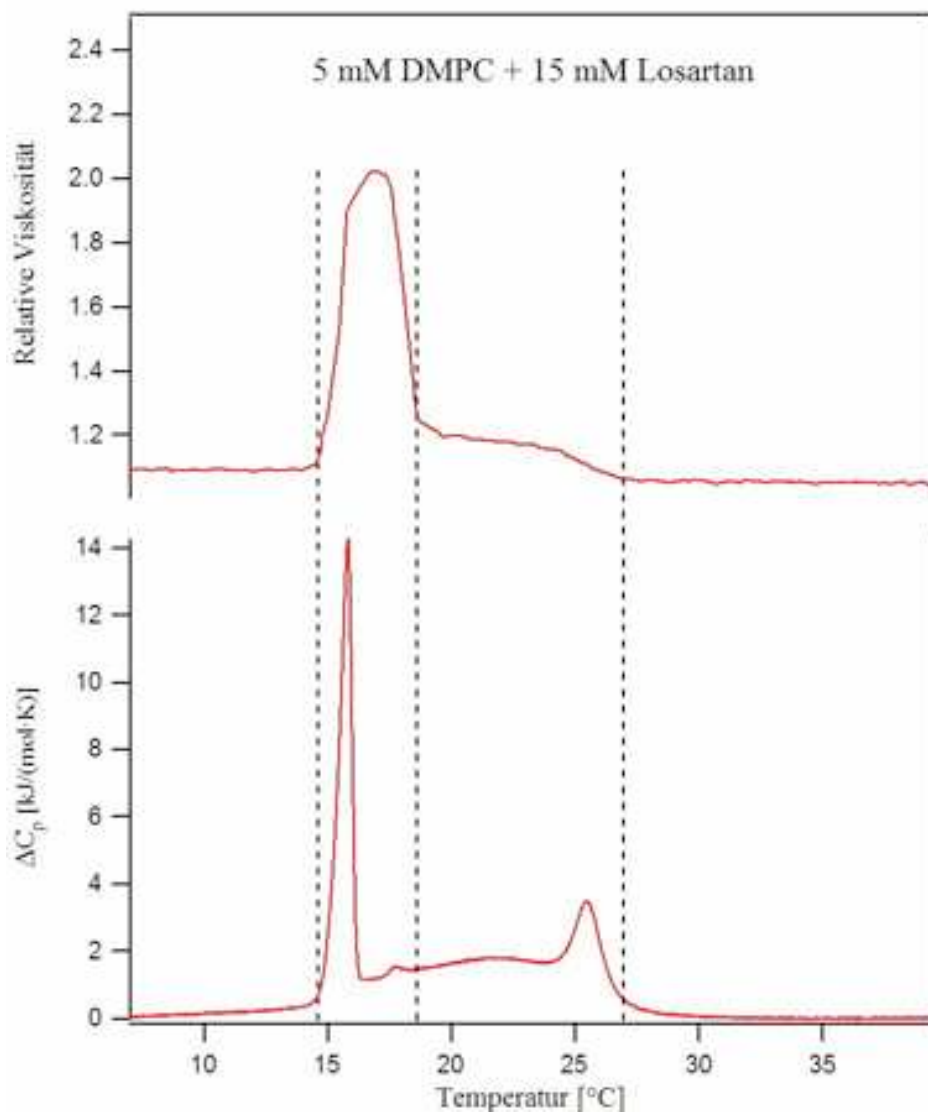


Abbildung 3.17: Viskositäts- und Wärmekapazitätsprofil von 5 mM DMPC mit 15 mM Losartan.

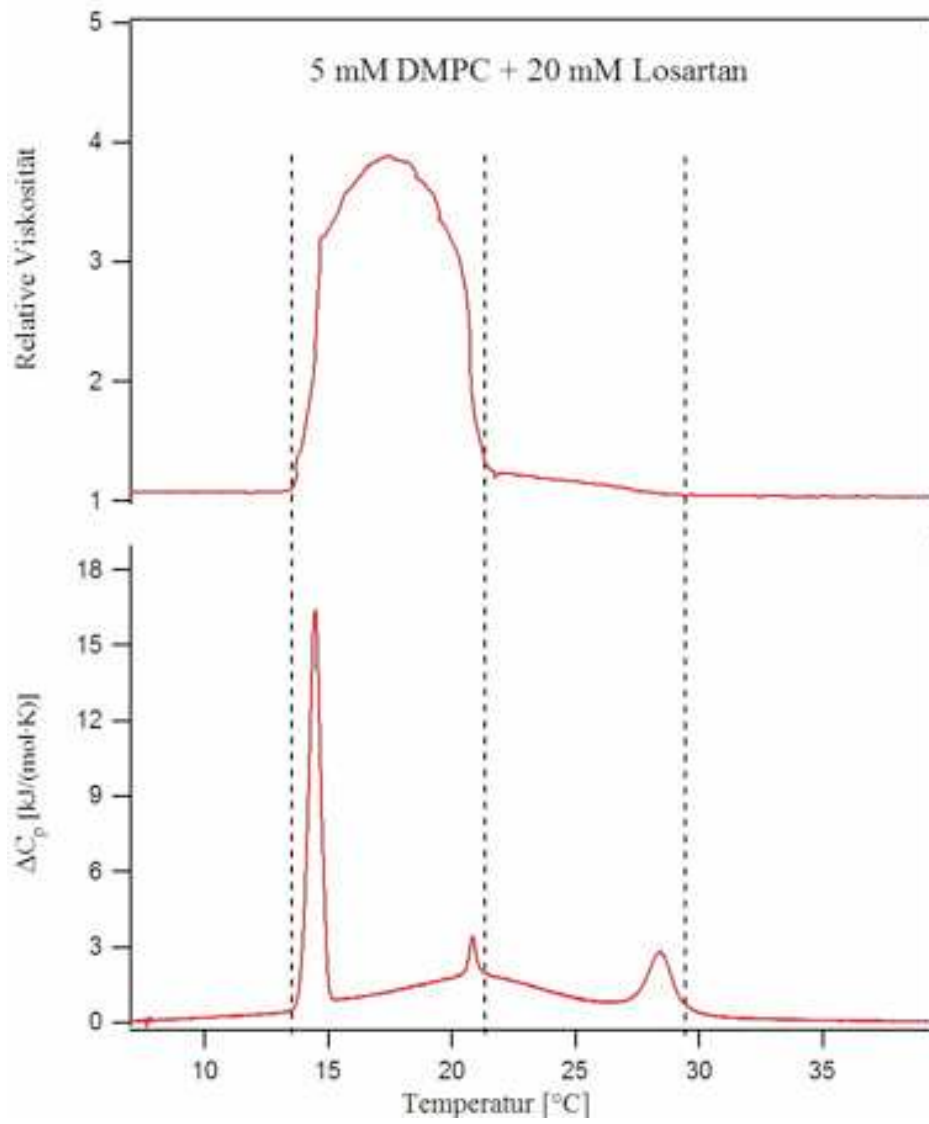


Abbildung 3.18: Viskositäts- und Wärmekapazitätsprofil von 5 mM DMPC mit 20 mM Losartan.

negativ geladene Kopfgruppe tragen, wo insbesondere die Phosphatidylglycerole zu nennen sind. Von einem Vertreter dieser Gruppe (DMPG) ist ein Verhalten bekannt, dass qualitativ gleichwertig zu dem hier beschriebenen von DMPC mit Losartan ist (siehe Schneider et al. [67] und Abbildung 3.19 daraus). Man kann ebenso eine 3-Spitzen-Aufspaltung des Wärmekapazitätsprofils beobachten sowie eine Erhöhung der Viskosität im entsprechenden Temperaturbereich. Schneider et al. können in dieser Arbeit den breiten Bereich der Umwandlung mit einer Fusion von Vesikeln identifizieren, so dass im Umwandlungsbereich ein langreichweitiges Membrannetzwerk vorliegt ohne vesikuläre Struktur. Diese strukturelle Umwandlung kann durch elektronenmikroskopische Aufnahmen visuell belegt werden. Dabei zeigen sich unterhalb der Umwandlung große Vesikel mit einem Durchmesser von 500 bis 1000 nm, oberhalb besitzen die Vesikel nur noch einen Durchmesser von 50 bis 200 nm. Im Bereich der Umwandlung können keine Vesikel erkannt werden, statt dessen ziehen sich große netzwerkartige Strukturen durch das Bild. Messungen der Lichtstreuung bestätigen die an den elektronenmikroskopischen Aufnahmen gewonnenen Erkenntnisse.

Nicht alle Autoren sind hingegen von dieser Interpretation des Wärmekapazitätsprofils überzeugt. Lamy-Freund & Riske [68] führen ein Experiment an, in dem ein Volumenteil einer DMPG-Dispersion mit einem Spin-Label versehen wurde, zwei weitere Volumenteile hingegen nicht. Eine Verdünnung des Spin-Labels konnte nach Zusammenführen der drei Teile nicht beobachtet werden, weshalb sie eine Fusion ausschlossen. Ob dieses Ergebnis vielleicht auch anders zu erklären ist, diskutieren sie nicht. Auch versuchen sie nicht, die elektronenmikroskopischen Aufnahmen anders als in [67] zu interpretieren, dies würde sicherlich auch schwer möglich sein. Auch die höhere Viskosität in dem ausgedehnten Bereich der Umwandlung kann nur in der Ausbildung größerer Aggregate begründet liegen. Eine eventuelle „Clustering“ der Vesikel ohne eigentliche Fusion wäre die einzig denkbare Alternative zu der Entstehung eines Netzwerkes. Dies ist wegen der elektrostatischen Abstoßung der negativ geladenen Membranoberflächen allerdings extrem unwahrscheinlich. Die Vesikelstruktur selbst ist eben wegen dieser Abstoßung der einzelnen Lipidmoleküle untereinander in sich auch nicht stabil, was auch für eine Fusion spricht. Dies wird beispielsweise durch Erkenntnisse der pharmazeutisch orientierten Liposomenforschung bestätigt. Dabei ist es eine Standardprozedur, den verwendeten Lipidformulierungen 10 bis 15 Prozent geladene Lipide beizumischen, um die Lagerungsstabilität zu gewährleisten. Eine vorzeitige Freisetzung des im Vesikel eingeschlossenen pharmazeutischen Wirkstoffes wird so verhindert. Andererseits führt ein noch höherer Prozentsatz an geladenen Lipiden zu einer verfrühten Freisetzung, die Vesikel geben ihren Inhalt schneller an die Umgebung ab. Diese rein praktischen Erfahrungswerte un-

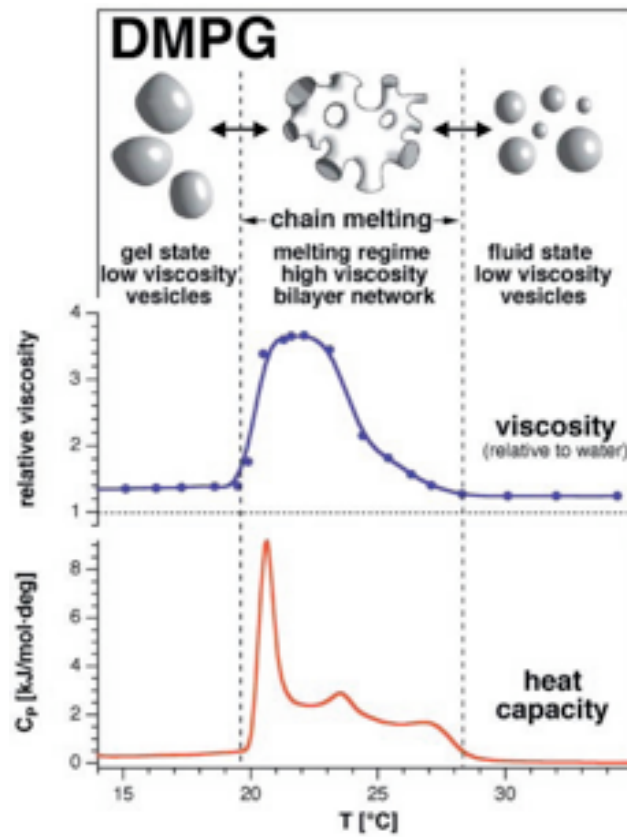


Abbildung 3.19: Wärmekapazitätsprofil und Viskositätsmessung des negativ geladenen Phospholipids DMPG. Es ist eine große Übereinstimmung mit den jeweiligen Größen für die hier vorgestellten Messungen an DMPC + Losartan zu erkennen. Für DMPG wurde dies mit dem Auftreten großer netzwerkartiger Strukturen identifiziert. Diese Strukturumwandlung ist ganz oben schematisch angedeutet. (aus [67])

terstützen die oben gemachten Aussagen, denn sie lassen sich nur dadurch erklären, dass der geringe Prozentsatz an geladenen Lipiden in den Membranen gerade so viel elektrostatische Abstoßung hervorruft, dass einzelne Vesikel nicht miteinander in Kontakt kommen, ein höherer Prozentsatz allerdings dazu führt, dass die nun stärkeren elektrostatischen Abstoßungskräfte innerhalb der Lipiddoppelschicht Überhand über die die Vesikelform stabilisierenden Kräfte gewinnen und so die Herausbildung neuer Formen erlauben.

Inwiefern dieses Ergebnis den Wirkmechanismus von Losartan beeinflussen kann, ist eine schwierige Frage. Falls (zumindest lokal) Konzentrationen am Wirkungsort entstehen, die ausreichen, eine solche Netzwerkstruktur hervorzurufen, könnte dies dramatische physiologische Effekte bewirken.

Interessanter ist hingegen die Frage, wo in der Biologie solche Prozesse ausgenutzt werden können. Endo- und Exocytose spielen für viele Zellen eine lebenswichtige Rolle, Vesikelfusion ist allgegenwärtig in den Synapsen von Neuronen. Hierfür werden in der Regel komplizierte Erklärungsmodelle herangezogen, die Wechselwirkungen vieler Proteine beinhalten (der sogenannte SNARE-Komplex). Der eigentliche, unterliegende biophysikalische Mechanismus ist hingegen wenig verstanden. Die Ausbildung von Netzwerkstrukturen durch geladene Lipide oder eine Induzierung dieser Ladung durch andere Moleküle scheint hier interessante Ansatzpunkte zu geben. Es ist noch anzumerken, dass diese Netzbildung abhängig von der Ionenkonzentration des umliegenden Milieus ist [56]. Da die synaptische Vesikelfusion begleitet ist von einer Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, ergibt sich hier eine weitere Verbindung.

## 3.2 Umwandlungen in biologischen Membranen

### 3.2.1 *Escherichia coli*

#### Einführung

*Escherichia coli* (*E. coli*) ist ein Bakterium, das vor allem im Darm von Säugetieren lebt und daher im Normalfall einer Temperatur von  $37^\circ\text{C}$  ausgesetzt ist. Verglichen mit anderen Bakterien ist *E. coli* relativ klein, es ist etwa  $2,5\ \mu\text{m}$  lang und hat einen Durchmesser von  $1\ \mu\text{m}$ . Es ist eins der einfachsten und daher bestverstandenen Lebewesen überhaupt.

*E. coli* hat wie alle gramnegativen Bakterien zwei Zellmembranen.<sup>4</sup> Da-

---

<sup>4</sup>Bakterien mit einer doppelten Membran werden deshalb gramnegativ genannt, da sie bei der von Hans Christian Gram 1884 eingeführten Färbung die dabei charakteristi-





Abbildung 3.20: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Escherichia coli. (Wadsworth Center, New York State Department of Health)

zwischen befindet sich das Periplasma mit dem sogenannten Peptidoglycan, das aus Proteinen und Polysacchariden aufgebaut ist. Die äußere Membran hat vermutlich überwiegend eine Schutzfunktion, während die innere Membran eine typische Zytoplasmamembran ist.

### Experimentelle Ergebnisse

Escherichia coli wurde bei  $15^{\circ}\text{C}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  und  $50^{\circ}\text{C}$  gezüchtet. Membranpräparationen wurden von der inneren Membran erstellt. Von diesen wurden die Wärmekapazitätsprofile aufgezeichnet, bei der  $37^{\circ}\text{C}$ -Probe zusätzlich in Abhängigkeit von pH-Wert und Kochsalzkonzentration. Da die genaue Zusammensetzung der Membran nicht bekannt ist, kann auch nicht die molare Masse bestimmt werden. Dies verhindert die Angabe absoluter Wärmekapazitätswerte.

**Abhängigkeit der Umwandlung von der Wachstumstemperatur** Die Wärmekapazitätsprofile der Proben zeigen eine Abhängigkeit der Lipidphasenumwandlung von der Wachstumstemperatur wie aus den Abbildungen

---

sche tiefblaue Farbe nicht beibehalten. Im Gegensatz dazu bleibt bei Bakterien mit einer Zellmembran (die dann aber im Allgemeinen eine dickere Zellwand besitzen) wie etwa Staphylokokken und Streptokokken diese Färbung erhalten, weshalb man sie grampositiv nennt. Die Einzelmembran solcher Bakterien entspricht in ihrer Funktion der inneren Membran der gramnegativen Bakterien.

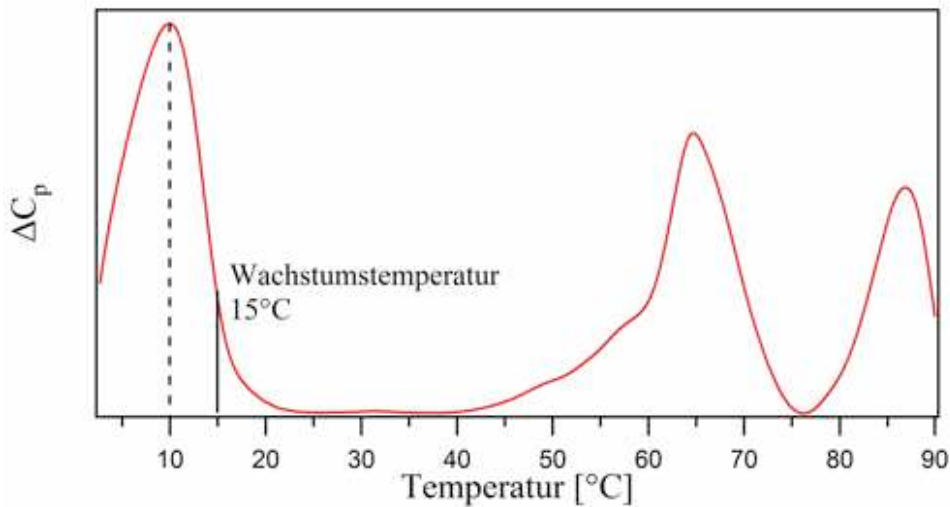


Abbildung 3.21: Wärmekapazitätsprofil der inneren Membran von *E. coli*, die bei  $15^\circ\text{C}$  gewachsen sind. Das Wärmekapazitätsmaximum liegt bei  $10^\circ\text{C}$ , die Wachstumstemperatur von  $15^\circ\text{C}$  liegt gerade noch innerhalb der Umwandlung. Die Wärmekapazitätsspitzen bei höheren Temperaturen sind auf Denaturierungen von Proteinen zurückzuführen.

3.21, 3.22 und 3.23 zu erkennen ist. Dabei liegt die obere Grenze des Schmelzregimes gerade bei der Wachstumstemperatur. Dies trifft für die  $37^\circ\text{C}$ -Probe exakt zu, für die Proben, die bei  $15^\circ\text{C}$  bzw.  $50^\circ\text{C}$  gewachsen sind mit Einschränkungen, auf jeden Fall ist eine klare Tendenz zu erkennen. Neben der Lipidumwandlung sind in jeder Probe mehrere weitere Umwandlungen bei höheren Temperaturen zu sehen. Dies sind die Denaturierungspunkte von Membranproteinen. Bei wiederholten Messungen an der gleichen Probe werden diese Spitzen kleiner, bis sie schließlich ganz verschwinden. Dies hat seinen Grund darin, dass Proteindenaturierungen nicht reversibel sind.

**pH- und Salzabhängigkeit der Umwandlung** Die Zytoplasmamembran von *E. coli* enthält geladene Lipide, weshalb die Umwandlung sensitiv auf Schwankungen des pH-Wertes und der Ionenkonzentration reagiert. Es wurden mehrere pH-Werte und  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen untersucht, wie in den Abbildungen 3.24 und 3.25 zu erkennen ist. In diesen Abbildungen ist nur der Temperaturbereich der reinen Lipidumwandlung dargestellt. Dabei verschiebt sich die Umwandlung bei höherem pH-Wert bzw. höherer Ionenkonzentration zu niedrigeren Temperaturen und bei niedrigerem pH-Wert bzw. niedrigerer Ionenkonzentration zu höheren Temperaturen, wie dies auch all-

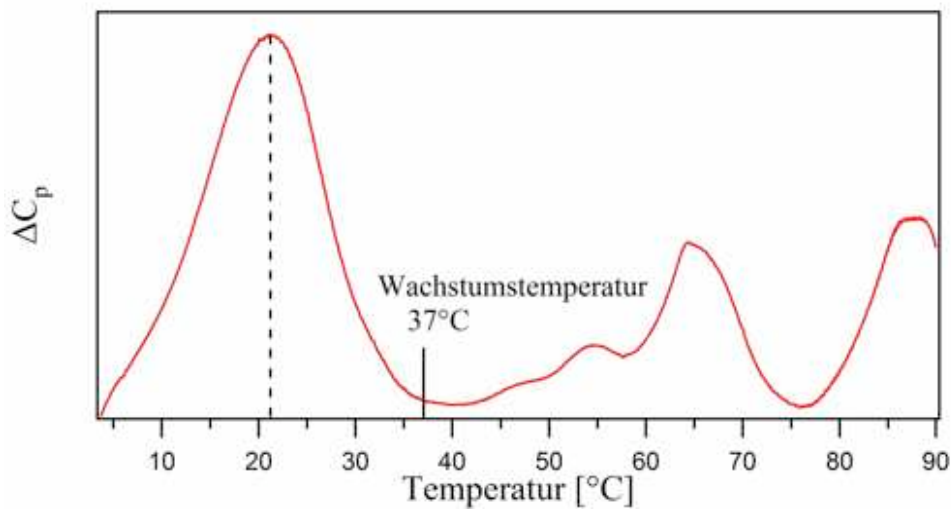


Abbildung 3.22: Wärmekapazitätsprofil der inneren Membran von *E. coli*, die bei  $37^{\circ}\text{C}$  gewachsen sind. Das Maximum der Wärmekapazität liegt hier bei ca.  $21,5^{\circ}\text{C}$ . Bei  $37^{\circ}\text{C}$ , also der natürlichen Umgebungstemperatur, liegt die Membran beachtenswerterweise genau auf dem Rand ihrer Umwandlung. Bei höheren Temperaturen sind Denaturierungen von Proteinen zu beobachten.

gemein für geladene Lipide gilt [19].

## Diskussion

Die kalorimetrische Untersuchung von biologischen Membranen hat fast eine genau so lange Tradition wie die von Modellmembranen. Die ersten solchen Messungen wurden von Steim et al. bereits 1969 an *Mycoplasma laidlawii* durchgeführt [69]. Solche frühen Messungen dienten vor allem auch dazu, die Doppelschichtnatur der Lipidmembran zu demonstrieren (anhand von Vergleichen mit Messungen an künstlichen Membranen). In den siebziger Jahren explodierte das Feld geradezu und unzählige Arbeiten zum Schmelzverhalten von Biomembranen, vor allem von *Acholeplasma laidlawii* und *Escherichia coli* wurden publiziert. Sinensky [70] zeigte die Abhängigkeit der Phasenumwandlung von der Wachstumstemperatur mittels Elektronenspinresonanz und erklärte sie mit einer homeoviskosen Adaption. Jackson und Sturtevant [71] konnten erste wirklich gute kalorimetrische Messungen machen.

Dass sich die Natur die Mühe macht, die Lipidzusammensetzung der Membran so zu steuern, dass ihr Schmelzregime immer knapp unterhalb der vorherrschenden Umgebungstemperatur liegt, ist erstaunlich. Wenn lediglich

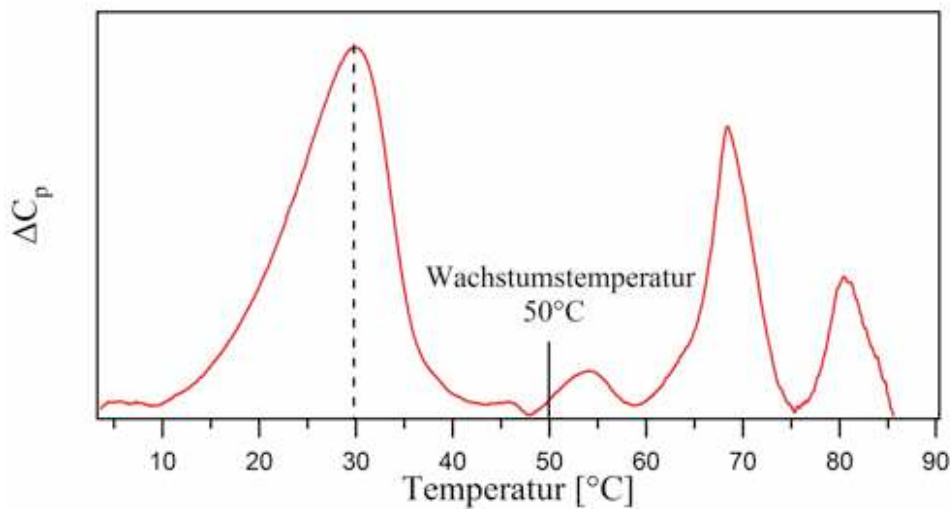


Abbildung 3.23: Wärmekapazitätsprofil der inneren Membran von *E.coli*, die bei  $50^{\circ}\text{C}$  gewachsen sind. Das Maximum liegt hier bei ziemlich genau  $30^{\circ}\text{C}$ , die Wachstumstemperatur liegt allerdings schon ca.  $8^{\circ}\text{C}$  überhalb des Endes der Umwandlung. Bei höheren Temperaturen sind wieder Proteindenaturierungen zu beobachten.

die Fluidität wichtig wäre wie im vorherrschenden Membranmodell von Singer und Nicolson postuliert wird, dann müsste nicht eine so genaue Anpassung verwirklicht werden. Die Nähe zum Schmelzregime macht es auch gerade möglich, unter bestimmten Voraussetzungen wie verändertem pH-Wert oder anderer Ionenkonzentration in den Bereich der Umwandlung zu gelangen. Wie schon mehrfach angeführt, verändern sich hier die physikalischen Eigenschaftend der Membran ganz erheblich. *E. coli* ist eventuell auf diese Veränderungen angewiesen. Der natürliche Lebensraum dieses Bakteriums ist der Darm. Durch Nahrungsaufnahme des Wirts verändert sich das chemische Milieu in der Umgebung von *E. coli* mitunter drastisch. Das bedeutet, dass die gemessenen Verschiebungen so stattfinden können. Durch die dann erhöhte Membranpermeabilität könnte das Bakterium möglicherweise eine Art von biochemischen Ausgleich schaffen. Es wurde beispielsweise auch gezeigt, dass sich die Lactosepermeabilität der Membran von *E. coli* im Bereich der Phasenumwandlung verändert [72].

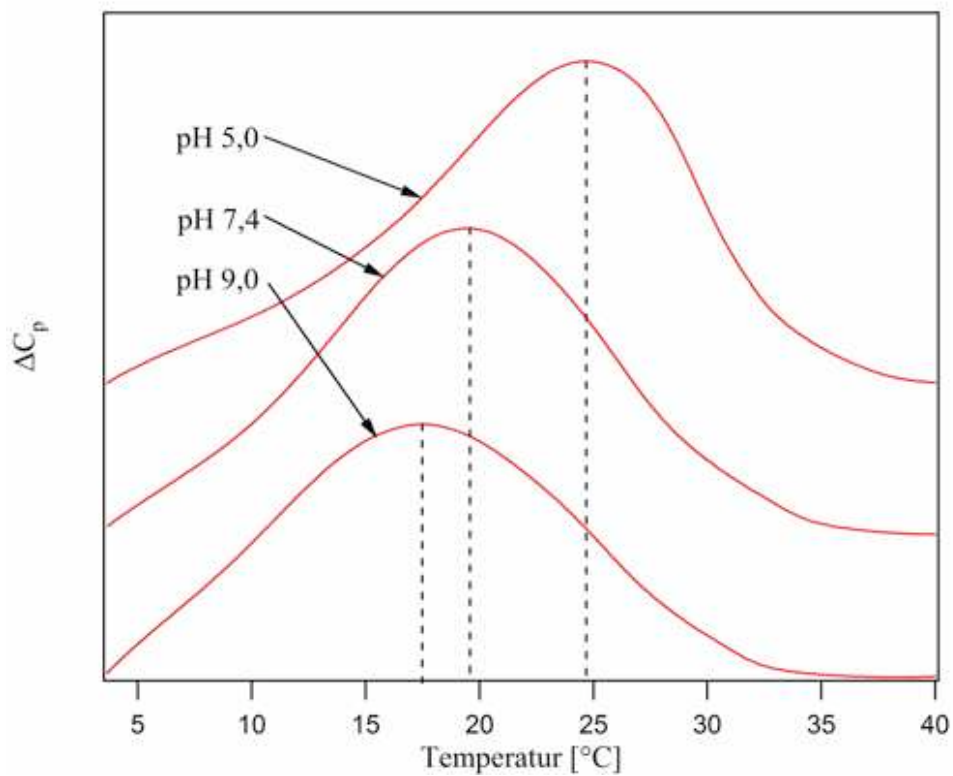


Abbildung 3.24: pH-Abhängigkeit der Lipidphasenumwandlung der inneren Membran von *E. coli*. Die Schmelztemperatur kann sich dabei um mehrere Grad verschieben. So kann die Membran bei Umgebungstemperatur von  $37^\circ\text{C}$  in das Schmelzregime gelangen oder sich weiter von ihm entfernen.

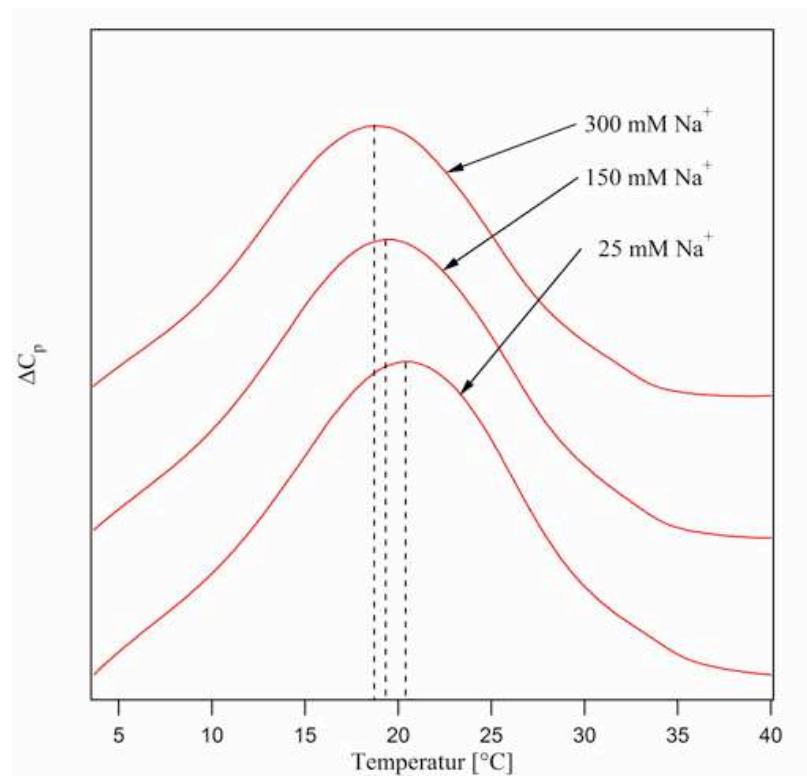


Abbildung 3.25: Der Schmelzpunkt der inneren Membran von *E. coli* zeigt neben der pH-Abhängigkeit erwartungsgemäß auch eine Abhängigkeit von der  $\text{Na}^+$ -Konzentration. Bei höheren Ionenkonzentrationen liegt er tiefer als bei niedrigen Ionenkonzentrationen.

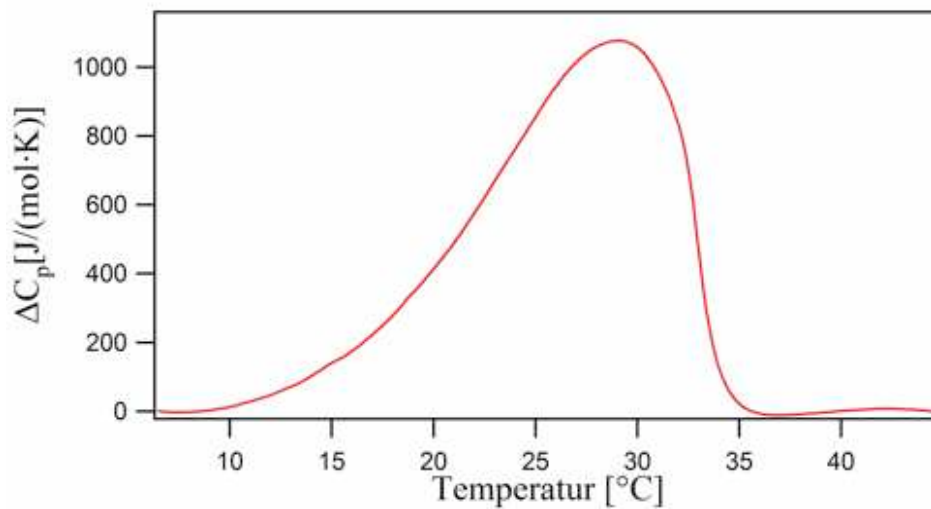


Abbildung 3.26: Wärmekapazitätsprofil von BLES (*bovine lipid extract surfactant*), dem Lipidfilm der Lunge. Die Umwandlung endet unmittelbar unterhalb der Körpertemperatur von  $37^\circ\text{C}$ . Darin zeigt sich eine erstaunliche Parallele zu der Membran von *E. coli*.

### 3.2.2 Lungensurfactant

#### Einführung

Lungensurfactant ist der Oberflächenfilm der Lunge. Surfactant steht dabei für *surface active agent*. Er besteht zum größten Teil aus Lipiden, wobei hier DPPC vorherrschend ist. Desweiteren bestehen etwa zehn Massenprozent des Surfactants aus Proteinen. Diese unterteilen sich in vier Gruppen, Surfactantprotein A bis D [73]. Die eigentliche Grenzschicht zur Luft wird durch eine Monoschicht gebildet. Diese steht aber im Gleichgewicht mit einem Surfactantreservoir, das vermutlich Doppelschichtstrukturen beinhaltet. Das hier untersuchte BLES (*bovine lipid extract surfactant*) ist der reine Lipidextrakt. Es liegt in wässriger Lösung vor, bildet somit vesikuläre Strukturen.

#### Experimentelle Ergebnisse

Der Lipidextrakt von Lungensurfactant zeigt im Wärmekapazitätsprofil eine erstaunliche Übereinstimmung mit der Probe von *E. coli*, die bei  $37^\circ\text{C}$  gewachsen ist. Bei beiden endet das Schmelzregime unmittelbar unter der Körpertemperatur bzw. Wachstumstemperatur. Das Maximum der Wärmekapazität liegt im Fall von BLES bei etwa  $29^\circ\text{C}$ .

## Diskussion

Lungensurfactant adaptiert die Lipidzusammensetzung ähnlich wie *E. coli* so, dass ein relativ breites Schmelzregime vorliegt, was nahe der Körpertemperatur endet. Auch hier sei wieder auf die veränderten mechanischen Eigenschaften der Membran im Schmelzregime verwiesen. In diesem Fall erscheint insbesondere die veränderte Kompressibilität und Elastizität interessant. Falls die Monoschicht des Oberflächenfilms der Lunge bei sich plötzlich verändernden Anforderungen „Nachschub“ aus dem Reservoir braucht, um etwa einen erhöhten Flächenbedarf zu decken, könnte dies solche veränderten mechanischen Eigenschaften im Reservoir erfordern.

### 3.2.3 Sphingomyelin

#### Einführung

Sphingomyeline unterscheiden sich von Glycerophospholipiden, wie in Kapitel 1 beschrieben, dadurch, dass sie anstelle des Glycerols ein Sphingosinmolekül als Bindeglied zwischen Kohlenwasserstoffketten und Kopfgruppe haben. Sie kommen hauptsächlich in Nervenmembranen vor, aber auch in Ei und Milch. In Nervengeweben machen sie oft den Großteil der Lipide aus. Insbesondere die schon so genannte Myelinscheide besteht fast ausschließlich aus Sphingomyelin. Diese Myelinscheide besteht aus konzentrischen Schichten von Membranen, die um ein Axon liegen. Das Axon ist der Teil eines Neurons, in dem das Aktionspotential über teilweise lange Strecken weitergeleitet wird. Die Myelinschicht ist dabei nicht zellulärer Bestandteil des Neurons, zu dem das Axon gehört, sondern eine eigene Zelle (sogenannte Schwannsche Zelle). Ein Querschnitt durch ein Axon mit umliegenden Myelinschichten ist in Abbildung 3.27 gezeigt.

#### Experimentelle Ergebnisse

Das hier verwendete Sphingomyelin wurde aus Schweinehirn gewonnen und enthält Lipide unterschiedlicher Kettenlänge. *Avanti Polar Lipids*, von denen es bezogen wurde, gibt die Zusammensetzung wie folgt an: 2% von 16:0, 46% von 18:0, 5% von 20:0, 7% von 22:0, 6% von 24:1 und 34% andere. Dabei steht die Zahl vor dem Doppelpunkt für die Anzahl der C-Atome pro Kohlenwasserstoffkette, die Zahl hinter dem Doppelpunkt gibt die Anzahl der Doppelbindungen in einer Kette an. Diese Variation der Kettenlänge verursacht eine im Vergleich zu den künstlichen Einkomponentenvesikeln verbreiterte Umwandlung, wobei sie aber immer noch deutlich schmaler und ausgeprägter ist als bei den meisten Biomembranen, da die einzelnen Lipidmoleküle sich





Abbildung 3.27: Elektronenmikroskopische Aufnahme durch den Querschnitt eines Axons mit der umliegenden Myelinschicht. Die einzelnen Schichten sind gut zu erkennen. (aus [1] entnommen)

eben nur in dieser Kettenlänge unterscheiden, sonst aber identisch sind. Das Wärmekapazitätsmaximum liegt bei knapp unter  $39^{\circ}\text{C}$ . Der weitaus größte Anteil der Umwandlung liegt zwischen ca.  $30$  und  $45^{\circ}\text{C}$ , Ausläufer erstrecken sich bis  $20$  bzw.  $45^{\circ}\text{C}$ . Bei Körpertemperatur von etwa  $37^{\circ}\text{C}$  befindet sich eine so zusammengesetzte Sphingomyelinmembran also fast genau in der Mitte der Umwandlung (siehe Abbildung 3.28).

Dopamin verschiebt die Phasenumwandlung von Sphingomyelin zu tieferen Temperaturen wie in Abbildung 3.29 gezeigt. Dabei beträgt die Verschiebung lediglich ca.  $1^{\circ}\text{C}$  bei einer Konzentration von  $200\text{ mM}$  Dopamin auf  $5\text{ mM}$  Sphingomyelin. In dem reinen Lipidsystem DMPC beträgt die Verschiebung bei identisch konzentrierten Komponenten ca.  $2,5^{\circ}\text{C}$  (siehe Abbildung 3.4).

## Diskussion

Die hier dargestellten Ergebnisse des Phasenverhaltens von natürlichen Sphingomyelinmembranen stimmen im Prinzip mit den ersten kalorimetrischen Untersuchungen an Sphingomyelinen überein [74][75], wobei diese Messungen aus den siebziger Jahren eine nicht annähernd so gute Auflösung zeigen.

Grundsätzlich hat die Myelinscheide der Axone in der gängigen Vorstellung die Funktion eines Isolators. Sie ist dabei in regelmäßigen Abständen unterbrochen von den sogenannten Ranvierschen Schnürringen. In diesen Bereichen hat also die axonale Membran Kontakt mit dem wässrigen extrazellulären Raum. Ein im Soma (dem Hauptzellkörper) ausgelöstes Aktionspotential

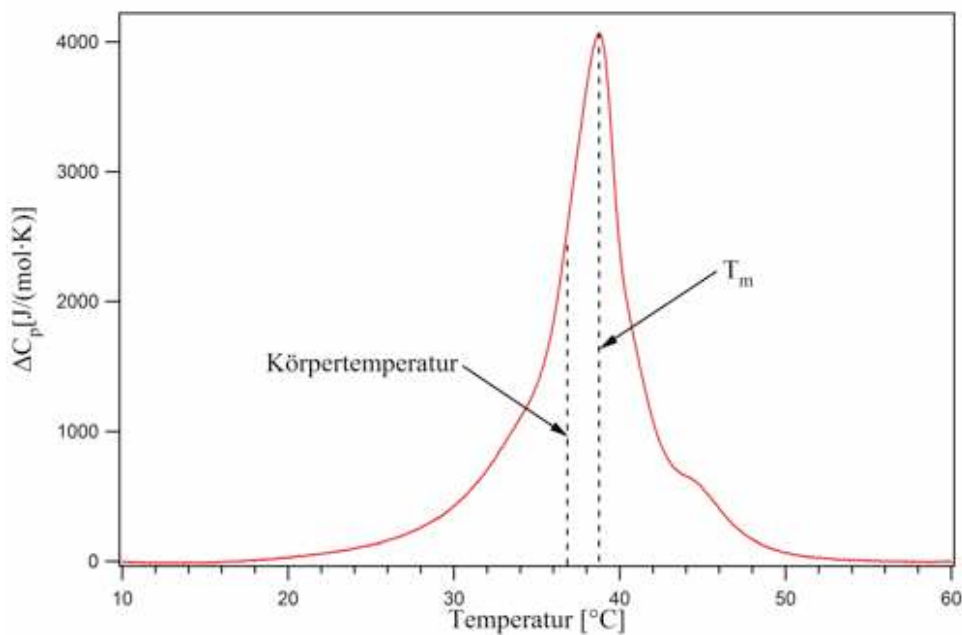


Abbildung 3.28: Wärmekapazitätsprofil von aus Schweinehirn gewonnenem Sphingomyelin. Dieses ist ein Gemisch aus Sphingolipiden unterschiedlicher Kettenlängen, weshalb die Umwandlung recht breit ist, aber nicht so breit wie bei anderen biologischen Proben. Das Wärmekapazitätsmaximum liegt bei knapp unter  $39^{\circ}\text{C}$ . Bei Körpertemperatur befindet sich dieses Lipidgemisch daher noch im Bereich der Umwandlung. Die kleine „Erhebung“ am rechten Ausläufer der Umwandlung ist vermutlich auf die (nicht reversible) Denaturierung eines in der Membran enthaltenen Proteins zurückzuführen, da sie bei wiederholten Scans nicht mehr zu erkennen ist.

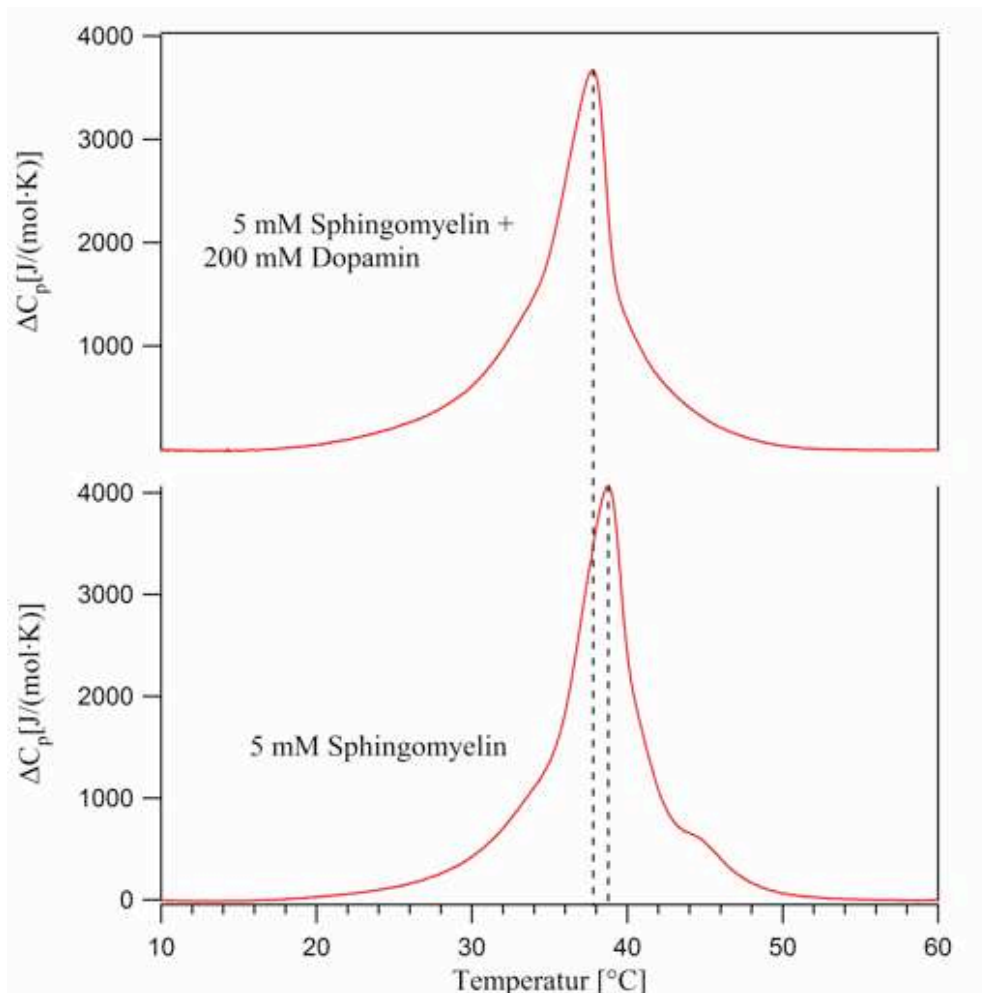


Abbildung 3.29: Einfluss von Dopamin auf das Schmelzverhalten einer Sphingomyelinmembran. Dopamin hat dabei die physiologisch relevante Konzentration von 200 mM. Bei einer Sphingomyelinkonzentration von 5 mM beträgt so die Phasenverschiebung ca.  $1^\circ\text{C}$ . Dies ist etwa  $1,5^\circ\text{C}$  weniger als bei einer DMPC-Dispersion (bei identischen Konzentrationen).

wird durch das Axon weitergeleitet. Dabei ist die Abschwächung des Ionenflusses gerade so groß, dass in den Ionenkanälen der Ranvierschen Schnürringe wieder eine Depolarisation erfolgt, die ausreicht, um an dieser Stelle ein neues Aktionspotential zu generieren. Dieses springt quasi von Schnürring zu Schnürring. Dieser Mechanismus soll die Weiterleitung beschleunigen, denn wenn die gesamte axonale Membran hinunter Aktionspotentiale generiert werden müssten, wäre dies bedeutend langsamer als der so über weite Strecken stattfindende passive Ionenfluss. Dabei spielt die Myelinscheide die Rolle des elektrischen Isolators, um eine verfrühte Depolarisation zu verhindern. Wenn dies die ganze Funktion der Myelinscheide ist, verwundert es aber doch sehr, dass die Natur sie gerade so aufbaut, dass ihre Lipide sich im Bereich der Phasenumwandlung befinden. Die genaue Zusammensetzung aus den unterschiedlichen Kettenlängen bestimmt gerade das Schmelzregime. Mit hochspezifischer Lipidsynthese kann die Natur dieses genau steuern. Wenn die elektrische Isolation der Myelinschicht die einzige Funktion wäre, sollte sie sich besser im gelförmigen oder fluiden Zustand befinden, da im Bereich der Umwandlung die Membran eine deutlich erhöhte Permeabilität aufweist, auch für Ionen wie  $\text{Na}^+$  [15][17], die außerhalb der Umwandlung kaum die hydrophoben Teile der Lipiddoppelschicht passieren können. Weiterhin zeigt die Membran im Bereich der Umwandlung verstärkte Flächen- und Volumenkompressibilität sowie Elastizität, wie bereits in Kapitel 1 beschrieben (eine detaillierte thermodynamische Begründung für diese Veränderungen findet sich in [10]). Dies kann Nährstoff für Spekulationen in die Richtung sein, dass die Weiterleitung des Aktionspotentials nicht von allein elektrischer Natur ist, sondern dass dabei auch eine mechanische Komponente involviert sein könnte, etwa in Form einer Welle. Tasaki [76] konnte auch ein gleichzeitig zum elektrischen Aktionspotential entstehendes Anschwellen des umliegenden Gewebes beobachten.

Es sei noch angemerkt, dass Dopamin die Umwandlung in den hier dargestellten Konzentrationen gerade so weit verschiebt, dass sich bei Körpertemperatur etwa die Mitte der Umwandlung befindet, bei der 50% der Lipide eine Umwandlung durchlaufen haben. Da diese nicht exakt symmetrisch ist, fällt dieser zentrale Schmelzpunkt nicht genau mit dem Wärmekapazitätmaximum zusammen, wie man aus Abbildung 3.29 sehen kann. Die eben erwähnten Steigerungen in Permeabilität und Kompressibilität würden hier also ihr Maximum erfahren. Dopamin wird normalerweise als Neurotransmitter primär in der Synapse auftreten, hat aber generell eine weite Verbreitung im zentralen Nervensystem. Ob er eventuell auch Einfluss auf die Myelinscheide der Axone nehmen kann, ist eine offene Frage.

# Kapitel 4

## Zusammenfassung und Ausblick: „Der große Bogen“

Diese Arbeit hatte zwei große Themenblöcke. Zum einen wurden Substanzen, von denen man allgemein annimmt, dass ihre Wirkung über Rezeptorproteine vermittelt wird, daraufhin untersucht, ob sie auch einen Effekt auf Lipide ausüben. Da Proteine immer in die Lipidmembran eingebettet sind, gehen Wirkung auf einen Rezeptor und die umliegende Lipidmembran also Hand in Hand und es ist nicht sinnvoll, dieses System voneinander losgelöst zu betrachten. Besonders interessant sind hier die Ergebnisse von Neurotransmittern, die im Fall von Dopamin und Serotonin eine Verschiebung der Schmelztemperatur bewirken. Fluoxetin, dessen Wirkung noch nicht verstanden wird, zeigt eine geradezu extreme Verschiebung der Phasenumwandlung. Im Gegensatz zu dieser reinen Verschiebung der Umwandlungstemperatur konnte Losartan, das eine Ladung in die Membran einbaut, sogar eine strukturelle Umwandlung induzieren. Es ist denkbar, dass solche Phänomene auf zellulärer Ebene auf vielfältige Weise geschehen. Die synaptische Vesikelfusion ist hier ein Beispiel. Die Aminosäure Glutamat, die auch als Neurotransmitter fungiert, ist bei physiologischen pH-Werten geladen. Es wäre also denkbar, dass sie auf neuronaler Ebene solche Fusionsvorgänge initiiert. Es ist bekannt, dass Glutamat in die Prozesse von LTD (long term depression) und LTP (long term potentiation) involviert ist, also gerade solche, die strukturelle Veränderungen beinhalten (LTD und LTP liegen dem Lernen zu Grunde).

Der andere große Themenblock war die Untersuchung von biologischen Membranen. Über diese besteht nach wie vor die Lehrmeinung, dass sie grundsätzlich im fluiden Zustand sind und auch sein müssen, damit die Zelle am Leben sein kann. Frühe Arbeiten, die die Fluidität von biologischen Mem-

branen zu beweisen schienen, übersahen dabei, dass Membranen nur „gerade so“ im fluiden Zustand sind, dabei aber eventuell die „Option für das Eintauchen“ in das Schmelzregime haben, wie dies in dieser Arbeit für Membranen von *E. coli* demonstriert wurde. Die Nähe zur Umwandlung wurde in zwei so völlig verschiedenen biologischen System wie dem Oberflächenfilm der Lunge und einer bakteriellen Membran gefunden. Es ist schwer vorstellbar, dass dies reiner Zufall ist. Die Sphingomyelinmembran, deren Aufgabe normalerweise darin gesehen wird, ein elektrischer Isolator zu sein, befindet sich sogar gerade in dem Zustand, in dem sie ein schlechter Isolator ist, nämlich im Bereich der Umwandlung.

Abschließend kann man sicher sagen, dass ein Bild der biologischen Membran, in der ihre einzelnen Komponenten wie Lipide, Proteine und Kohlenhydrate feste Aufgaben ausführen, wobei sie weitestgehend unabhängig voneinander agieren, nicht mehr haltbar ist. Wenn in einem isolierten Experiment beispielsweise für ein spezielles Protein eine bestimmte Funktion gefunden wurde, so war die Biologie bisher geneigt anzunehmen, dass diese Funktion im Wesentlichen auch in der Gesamtmembran auftritt. Die Biomembran ist jedoch ein hochkomplexes Gebilde, in der alle Teile miteinander wechselwirken und sich gegenseitig beeinflussen. Rückkopplung ist allgegenwärtig. Diese Arbeit hat gerade Beispiele dafür gesammelt, wie die Natur offensichtlich die nächste Umgebung der Membranproteine (also gerade die Lipide) in einem Zustand hält, der starke Fluktuationen aufweist und damit eine große Variabilität in vielen physikalischen Größen zeigt. Es erscheint nur logisch, wenn dahinter System steckt, um die Funktion von Proteinen gezielt zu modulieren. Desweiteren kann die Lipidmembran als solche höchstwahrscheinlich auch mehr Funktionen direkt übernehmen als man ihr im Allgemeinen zugesteht. Da sich Eigenschaften wie Permeabilität oder Elastizität und Kompressibilität im Bereich der Phasenumwandlung stark verändern und die untersuchten Biomembranen sich immer dicht an oder im Bereich der Umwandlung befinden, müssen diese Veränderungen „zwangsläufig“ eine Rolle spielen. Die Lipidsynthese in Zellen erlaubt durch ihre immensen Variationsmöglichkeiten eine genaue Anpassung der Membran an die Erfordernisse der Zelle. Diese kann sich also ihre Membran so bauen wie sie will, und sie will sie offensichtlich nahe bei der Phasenumwandlung.

# Literaturverzeichnis

- [1] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & J. D. Watson (1994): *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc., New York und London, 3rd edition
- [2] H. G. L. Coster (2003): *The physics of cell membranes*. J. Biol. Phys. 29:363–399
- [3] S. Razin (1975): *The mycoplasma membrane*. In J. F. Danielli, M. D. Rosenberg & D. A. Cadenberg, editors, *Progress in surface and membrane science, vol. 9*. Academic Press Inc., New York
- [4] S. Razin (1975): *Cholesterol incorporation into bacterial membranes*. J. Bacteriol. 124:570–572
- [5] H. S. Frank & M. W. Evans (1945): J. Chem. Phys. 13:507–515
- [6] C. Tanford (1980): *The Hydrophobic Effect. Formation of Micelles and Biological Membranes*. Wiley, New York, 2nd edition
- [7] B. de Kruijff (1997): *Lipid polymorphism and biomembrane function*. Curr. Opin. Chem. Biol. 1:564–569
- [8] M. J. Janiak, D. M. Small & G. G. Shipley (1979): *Temperature and compositional dependence of the structure of hydrated dimyristoyl lecithin*. J. Biol. Chem. 254:6068–6078
- [9] T. Heimburg (2000): *A model for the lipid pretransition: coupling of ripple formation with chain-melting transition*. Biophys. J. 78:1154–1165
- [10] T. Heimburg (1998): *Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry*. Biochim. Biophys. Acta 1415:147–162

- [11] J. H. Ipsen, G. Karlstrom, O. G. Mouritsen, H. Wennerstrom & M. J. Zuckermann (1987): *Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system*. Biochim. Biophys. Acta 905:162–172
- [12] F. H. Anthony, R. L. Biltonen & E. Freire (1981): *Modification of a vibrating-tube density meter for precise temperature scanning*. Anal. Biochem. 116:161–167
- [13] H. Ebel, P. Grabitz & T. Heimburg (2001): *Enthalpy and volume changes in lipid membranes. I. The proportionality of heat and volume changes in the lipid melting transition and its implication for the elastic constants*. J. Phys. Chem. B 105:7353–7360
- [14] S. Halstenberg, T. Heimburg, T. Hianik, U. Kaatz & R. Krivanek (1998): *Cholesterol-induced variations in the volume and enthalpy fluctuations of lipid bilayer*. Biophys. J. 75:264–271
- [15] D. Papahadjopoulos, K. Jacobsen, S. Nir & T. Isac (1973): *Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability experiments concerning the effect of temperature and cholesterol*. Biochim. Biophys. Acta 311:330–348
- [16] C. W. M. Haest, J. de Gier, G. A. van Es, A. J. Verkley & L. L. M. van Deenen (1972): Biochim. Biophys. Acta 288:43–53
- [17] M. C. Blok, E. C. M. van der Neut-Kok, L. L. M. van Deenen & J. de Gier (1975): Biochim. Biophys. Acta 406:187–196
- [18] R. B. Gennis (1989): *Biomembranes. Molecular Structure and Function*. Springer-Verlag, New York
- [19] H. Träuble, M. Teubner, P. Woolley & H. Eibl (1976): *Electrostatic interactions at charged lipid membranes. I. Effect of pH and univalent cations on membrane structure*. Biophys. Chem. 4:319–342
- [20] P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien & W. C. Wescott (1962): Circulation 26:1167–1171
- [21] P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien & W. C. Wescott (1963): *Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solutions*. J. Phys. Chem. 67:534–535
- [22] M. Winterhalter (2000): *Black lipid membranes*. Curr. Opin. Coll. Interf. Sci. 5:250–255



- [23] A. D. Bangham, M. M. Standish & J. C. Watkins (1965): *Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids*. J. Mol. Biol. 13:238–252
- [24] A. D. Bangham (1992): *Liposomes: the Babraham connection*. Chem. Phys. Lipids 64:275–285
- [25] G. Gregoriadis & B. E. Ryman (1972): *Fate of protein-containing liposomes injected into rats. An approach to the treatment of storage diseases*. Eur. J. Biochem. 24:485–491
- [26] G. Gregoriadis & B. E. Ryman (1972): *Lysosomal localization of fructofuranosidase-containing liposomes injected into rats*. Biochem. J. 129:123–133
- [27] C. Nägeli & C. Cramer (1855): *Pflanzenphysiologische Untersuchungen*. Schulthess, Zürich
- [28] E. Overton (1899): *Über die allgemeinen osmotischen Eigenschaften der Zelle, ihre vermutlichen Ursachen und ihre Bedeutung für die Physiologie*. Vierteljahresschr. Naturforsch. Ges. Zürich 44:88–114
- [29] I. Langmuir (1917): *The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids..* J. Am. Chem. Soc. 39:1848–1906
- [30] E. Gorter & F. Grendel (1925): *On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood*. J. Exp. Med. 41:439–443
- [31] D. W. Deamer & D. G. Cornwell (1966): *Surface area of human erythrocytes: reinvestigation of experiments on plasma membrane*. Science 153:1010–1012
- [32] J. F. Danielli & E. N. Harvey (1935): *The tension at the surface of mackerel egg oil, with remarks on the nature of the cell surface*. J. Cell. Comp. Physiol. 5:483
- [33] J. F. Danielli & H. Davson (1935): *A contribution to the theory of permeability of thin films*. J. Cell. Physiol. 5:495–508
- [34] S. J. Singer & G. L. Nicolson (1972): *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes..* Science 175:720–731
- [35] J. D. Robertson (1957): *New observations on the ultrastructure of the membranes of frog peripheral nerve fibers*. J. Biophys. Biochem. Cytol. 3:1043–1047

- [36] J. D. Robertson (1959): *The ultrastructure of cell membranes and their derivatives*. Biochem. Soc. Symp. 16:3–43
- [37] W. D. Stein & J. F. Danielli (1956): *Structure and function in red cell permeability*. Discuss. Faraday Soc. 21:238–251
- [38] D. F. H. Wallach & P. H. Zahler (1966): *Protein conformations in cellular membranes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56:1552–1559
- [39] J. Lenard & S. J. Singer (1966): *Protein conformation in cell membrane preparations as studied by optical rotatory dispersion and circular dichroism*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56:1828–1835
- [40] O. G. Mouritsen & M. Bloom (1984): *Mattress model of lipid-protein interactions in membranes*. Biophys. J. 46:141–153
- [41] M. K. Jain & H. B. White (1977): *Long-range order in biomembranes*. Adv. Lipid Res. 15:1–60
- [42] D. E. Wolf, W. K. and W. Lennarz & M. Edidin (1981): *Changes in the organization of the sea urchin egg plasma membrane upon fertilization: indications from lateral diffusion rates of lipid-soluble fluorescent dyes*. Dev. Biol. 81:133–138
- [43] E. Yechiel & M. Edidin (1987): *Micrometer scale domains in fibroblast plasma membranes*. J. Cell Biol. 105:755–760
- [44] K. Simons & G. van Meer (1988): *Lipid sorting in epithelial cells*. Biochemistry 27:6197–6202
- [45] D. A. Brown & E. London (1997): *Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes?*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 240:1–7
- [46] K. Simons & E. Ikonen (1997): *Functional rafts in cell membranes*. Nature 387:569–572
- [47] K. Jacobson & C. Dietrich (1999): *Looking at lipid rafts?*. Trends Cell Biol. 9:87–91
- [48] H. Heerklotz (2002): *Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures*. Biophys. J. 83:2693–2701
- [49] M. Edidin (2003): *The state of lipid rafts: from model membranes to cells*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 32:257–283

- [50] M. Baily (1994): *A Survey of Thermodynamics*. American Institute of Physics, New York
- [51] W. Hemminger & G. Höhne (1979): *Grundlagen der Kalorimetrie*. Verlag Chemie, Weinheim
- [52] C. Sykes (1935): *Methods for investigating thermal changes occurring during transformations in a solid solution*. Proc. R. Soc. London Ser. A 148:422–446
- [53] L. M. Clarebrough, M. E. Hargreaves, D. Michell & G. W. West (1952): *The determination of the energy stored in a metal during plastic deformation*. Proc. R. Soc. London Ser. A 215:507–524
- [54] V. V. Plotnikov, J. M. Brandts, L. Lin & J. F. Brandts (1997): *A new ultrasensitive scanning calorimeter*. Anal. Biochem. 250:237–244
- [55] R. Glaser (2001): *Biophysics*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
- [56] P. Grabitz (2001): *Dynamische Vorgänge in Phospholipidmembranen. Relaxationsprozesse und Viskoelastizität in der Nähe der Schmelzwandlung*. Diplomarbeit, Universität Göttingen
- [57] S. Maiti, J. B. Shear, R. M. Williams, W. R. Zipfel & W. W. Webb (1997): *Measuring serotonin distribution in live cells with three-photon excitation*. Science 275:530–532
- [58] D. Bruns & R. Jahn (1995): *Real time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles*. Nature 377:62–65
- [59] J. M. Finnegan, K. Pihel, P. Cahill, L. Huang, S. E. Zerby, A. G. Ewing, R. T. Kennedy & R. M. Wightman (1996): *Vesicular quantal size measured by amperometry at chromaffin, mast, pheochromocytoma, and pancreatic beta-cells*. J. Neurochem. 66:1914–23
- [60] R. M. Woodward, M. M. Panicker & R. Miledi (1992): *Actions of dopamine and dopaminergic drugs on cloned serotonin receptors expressed in Xenopus oocytes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4708–4712
- [61] D. T. Wong, J. S. Horng, F. P. Bymaster, K. L. Hauser & B. B. Molloy (1974): *A selective inhibitor of serotonin uptake: Lilly 110140, 3-(p-Trifluoromethylphenoxy)-n-methyl-3-phenylpropylamine*. Life Sci. 15:471–479

- [62] W. R. Schafer (1999): *How do antidepressants work? Prospects for genetic analysis of drug mechanisms*. Cell 98:551–554
- [63] J. Garcia-Colunga, J. N. Awad & R. Miledi (1997): *Blockage of muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors by fluoxetine (Prozac)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2041–2044
- [64] B. Erdlenbruch, V. Jendrossek, H. Eibl & M. Lakomek (2000): *Transient and controllable opening of the blood-brain barrier to cytostatic and antibiotic agents by alkylglycerols in rats*. Exp. Brain Res. 135:417–422
- [65] E. Theodoropoulou & D. Marsh (1999): *Interactions of angiotensin II non-peptide AT1 antagonist losartan with phospholipid membranes studied by combined use of differential scanning calorimetry and electron spin resonance spectroscopy*. Biochim. Biophys. Acta 1461:135–146
- [66] P. Zoumpoulakis, I. Daliani, M. Zervou, I. Kyrikou, E. Siapi, G. Lamprinidis, E. Mikros & T. Mavromoustakos (2003): *Losartan’s molecular basis of interaction with membranes and AT1 receptor*. Chem. Phys. Lipids 125:13–25
- [67] M. F. Schneider, D. Marsh, W. Jahn, B. Kloesgen & T. Heimburg (1999): *Network formation of lipid membranes: Triggering structural transitions by chain melting*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:14312–14317
- [68] M. T. Lamy-Freund & K. A. Riske (2003): *The peculiar thermostructural behavior of the anionic lipid DMPG*. Chem. Phys. Lipids 122:19–32
- [69] J. M. Steim, M. E. Tourtellotte, J. C. Reinert, R. N. McElhaney & R. L. Rader (1969): *Calorimetric evidence for the liquid-crystalline state of lipids in a biomembrane*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63:104–109
- [70] M. Sinensky (1974): *Homeoviscous adaption - a homeostatic process that regulates viscosity of membrane lipids in Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:522–525
- [71] M. B. Jackson & J. M. Sturtevant (1977): *Studies of the lipid phase transitions of Escherichia coli by high sensitivity differential scanning calorimetry*. J. Biol. Chem. 252:4749–4751
- [72] W. Zhang & H. R. Kaback (2000): *Effect of the lipid phase transition on the lactose permease from Escherichia coli*. Biochemistry 39:14538–14542

- [73] J. Goerke (1998): *Pulmonary surfactant: functions and molecular composition*. Biochim. Biophys. Acta 1408:79–89
- [74] G. G. Shipley, L. S. Avecilla & D. M. Small (1974): *Phase behavior and structure of aqueous dispersions of sphingomyelin*. J. Lipid. Res. 15:124–131
- [75] Y. Barenholz, J. Suurkuusk, D. Mountcastle, T. E. Thompson & R. L. Biltonen (1976): *A calorimetric study of the thermotropic behavior of aqueous dispersions of natural and synthetic sphingomyelins*. Biochem. 15:2441–2447
- [76] I. Tasaki (1999): *Evidence for phase transition in nerve fibers, cells and synapses*. Ferroelectrics 220:305–316